

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Veronika ZUBIN

**DOLOČANJE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN  
NITRATA V ZELJU cv. DESTINY IN cv. CACO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID AND NITRATE  
IN CABBAGE cv. DESTINY AND cv. CACO**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

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

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

Mentor: prof. dr. Marjan Simčič

Somentor: doc. dr. Blaž Cigić

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Marjan Simčič

Član: doc. dr. Blaž Cigić

Član: prof. dr. Rajko Vidrih

Datum zagovora:

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

Veronika Zubin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

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

KG skladiščenje zelenjave/kontrolirana atmosfera/zelje/*Brassica oleracea* L./  
cv. Destiny/cv. Caco/vitamini/vitamin C/nitrati

AV ZUBIN, Veronika

SA SIMČIČ, Marjan (mentor)/CIGIČ, Blaž (somentor)/VIDRIH, Rajko (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2010

IN DOLOČANJE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU  
cv. DESTINY IN cv. CACO

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 54 str., 7 pregl., 18 sl., 86 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Različni kultivarji zelja (*Brassica oleracea* L.) imajo različne vsebnosti nitrata in L-askorbinske kisline (L-AK). Namen diplomske naloge je bil določiti vsebnost L-AK in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco, ugotoviti njuno razporeditev v različnih delih rastline (zgornji in spodnji del) ter spremljati vpliv skladiščenja na vsebnost L-AK in nitrata ter določiti izgubo mase. Analize L-AK in nitrata smo opravili takoj po obiranju zelja in po 120 dneh skladiščenja (pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti). Zanimala nas je morebitna povezava med vsebnostjo L-AK in nitrata v posameznih kultivarjih zelja. Vsebnost L-AK smo določili z metodo HPLC, vsebnost nitrata smo določali spektrofotometrično. Raziskava je pokazala, da se v različnih kultivarjih in posameznih delih zeljne glave (zgornji, spodnji del) vsebnosti L-AK in nitrata razlikujejo. V obeh kultivarjih je bila vsebnost L-AK in nitrata višja v spodnjem delu, podobna je bila tudi izguba mase. Povprečna vrednost L-AK v cv. Destiny znaša 34,9 mg/100 g v cv. Caco smo določili 27,4 mg/100 g. Zaradi izgube vode in s tem povečanja suhe snovi, vsebnost L-AK v 100 g zelja s skladiščenjem ostaja enaka oz. rahlo naraste. Povprečna izguba mase je pri zelju cv. Destiny znašala po 120 dneh skladiščenja 51,2 % pri zelju cv. Caco pa 53,1 %. Glede vsebnosti nitrata so med kultivarjema velike razlike. Več nitrata vsebuje zelje cv. Destiny, povprečna vrednost je 122,0 mg/kg svežega vzorca. V zelju cv. Caco je vsebnost nižja, takoj po obiranju znaša 38,3 mg/kg. Cv. Destiny s skladiščenjem kaže tendenco naraščanja nitrata, pri cv. Caco pa ni bilo opaziti zaznavnih sprememb. Hipotezo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna vsebnosti L-askorbinske kisline v določeni vrsti zelja oz. določenem delu rastline, lahko ovržemo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

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

CX storage vegetables/controlled atmosphere/cabbage/*Brassica oleracea* L./  
cv. Destiny/cv. Caco/vitamins/vitamin C/nitrates

AU ZUBIN, Veronika

AA SIMČIČ, Marjan (supervisor)/CIGIČ, Blaž (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2010

TI DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID AND NITRATE IN CABBAGE cv.  
DESTINY AND cv. CACO

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 54 p., 7 tab., 18 fig., 86 ref.

LA sl

AL sl/en

**AB** In the thesis, we tried to determine the content of L-ascorbic acids (L-AC) and nitrates, as well as their distribution throughout the plant (upper and lower parts), in two varieties of cabbage (*Brassica oleracea* L.): cv. Destiny and cv. Caco. We also monitored the influence of storage on the content of L-AC and nitrates as well as water during storage. L-AC and nitrate analysis were done twice: right after picking and after 120 days of storage (at 1 °C and 80 % humidity). We were particularly interested in possible correlation between L-AC and nitrates within individual cultivars. L-AC contents were determined using the HPLC method, nitrate contents were determined spectrophotometrically. The results show that the content of L-AC and nitrate differs in cultivars as well as in different parts of the cabbage head (upper, lower part). Lower parts of cabbage heads of both cultivars have higher contents of L-AC and nitrates. Cultivars has similar water loss pattern during storage. The average value of L-AC was found to be 34,9 mg/100 g in cv. Destiny and 27,4 mg/100 g in cv. Caco. The amount of L-AC does not change significantly during storage due to the loss of water, which increases the amount of dry matter in the cabbage. The average water loss during 120 days of storage was 51,2 % in cv. Destiny and 53,1 % in cv. Caco. Nitrate amounts vary within cultivars – the average amount of nitrates in freshly picked cv. Destiny cabbage was 122,0 mg/kg, while cv. Caco contained in average 38,3 mg/kg. The nitrate contents in cv. Destiny tend to increase during storage, while the amount in cv. Caco does not show any change. Our hypothesis, which states that the content of nitrates is inversely proportional to the amount of L-AC within a specific cabbage cultivar and different parts of the cabbage plant, can be refuted.

## KAZALO VSEBINE

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

## KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 ZELJE	2
2.1.1 Izvor	2
2.1.2 Kemijska sestava	3
2.1.3 Prehranska vrednost	4
2.1.4 Opis kultivarjev	5
2.1.4.1 Zelje cv. Destiny	5
2.1.4.2 Zelje cv. Caco	6
2.1.5 Rast in obiranje zelja	6
2.1.6 Postopki pred skladiščenjem	7
2.1.7 Pogoji skladiščenja	8
2.1.8 Spremembe med skladiščenjem	8
2.2 L-ASKORBINSKA KISLINA	9
2.2.1 Definicija in splošne lastnosti	9
2.2.2 Nomenklatura in struktura	10
2.2.3 Struktura L-askorbinske kisline	10
2.2.4 Fizikalno kemijske lastnosti	11
2.2.5 Biosinteza L-askorbinske kisline	12
2.2.6 Funkcije v organizmu	13
2.2.7 L-askorbinska kislina v živilih	14
2.2.8 Izgube L-askorbinske kisline	16
2.2.9 Metode določanja	18
2.3 NITRATI	19
2.3.1 Izvor nitratov	20
2.3.2 Nitrat in nitrit v rastlinah	20
2.3.3 Vpliv tehnološke obdelave živil na vsebnost nitrata	22
2.3.4 Nitrat in nitrit v človeškem metabolizmu	23
2.3.5 N-nitrozo spojine	24
2.3.6 Vpliv nitrata na zdravje	25

2.3.7	Metode določanja nitrata in nitrita.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1	MATERIAL .....	28
3.2	POTEK DELA.....	28
3.2.1	Priprava vzorcev.....	28
3.3	ANALITSKE METODE .....	30
3.3.1	Določanje izgube mase med skladiščenjem zelja .....	30
3.3.2	Določanje nitrata .....	30
3.3.2.1	Priprava vzorca .....	30
3.3.2.2	Spektrofotometrično določanje nitrata .....	30
3.3.3	Določanje L-askorbinske kisline .....	31
3.3.3.1	Priprava reagentov za HPLC analizo.....	31
3.3.3.1.1	Priprava standarda .....	31
3.3.3.1.2	Priprava 2 % metafosforne kisline .....	31
3.3.3.1.3	Priprava fosfatnega pufra (pH 2,9).....	31
3.3.3.2	Priprava vzorca .....	32
3.3.3.3	Kromatografski pogoji.....	32
3.3.3.4	Izračun koncentracije L-askorbinske kisline .....	32
3.3.4	Statistična obdelava podatkov.....	32
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>33</b>
4.1	IZGUBA MASE ZELJA MED SKLADIŠČENJEM.....	33
4.2	POVPREČNA VSEBNOST L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU cv. DESTINY IN cv. CACO V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA.....	34
4.2.1	L-askorbinska kislina .....	35
4.2.2	Nitrat.....	35
4.3	PRIMERJAVA POVPREČNIH VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZGORNJEM IN SPODNJEM DELU POSAMEZNIH KULTIVARJEV ZELJA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA.....	36
4.3.1	Cv. Destiny .....	37
4.3.2	Cv. Caco.....	38
4.4	PRIMERJAVA ZGORNJEGA IN SPODNJEGA DELA ZELJA cv. DESTINY IN cv. CACO GLEDE NA POVPREČNE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA.....	39
4.4.1	L-askorbinska kislina.....	39
4.4.2	Nitrat.....	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>41</b>
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.1.1	Izguba mase med skladiščenjem zelja cv. Destiny in cv. Caco .....	41
5.1.2	Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco glede na čas skladiščenja .....	41
5.1.2.1	L-askorbinska kislina.....	41
5.1.2.2	Nitrat.....	42
5.1.3	Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v zgornjem in spodnjem delu posameznih kultivarjev zelja v odvisnosti od časa skladiščenja .....	43
5.1.3.1	Cv. Destiny .....	43
5.1.3.2	Cv. Caco .....	44

<b>5.1.4</b>	<b>Primerjava zgornjega in spodnjega dela zelja cv. Destiny in cv. Caco glede na povprečne vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v odvisnosti od časa skladiščenja .....</b>	<b>44</b>
5.1.4.1	Vsebnost L-askorbinske kisline.....	44
5.1.4.2	Vsebnost nitrata .....	45
<b>5.1.5</b>	<b>Povezava med nitratom in L-askorbinsko kislino v obeh kultivarjih zelja</b>	<b>46</b>
<b>5.1.6</b>	<b>Prehranski vidiki rezultatov .....</b>	<b>46</b>
5.2	SKLEPI.....	48
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>50</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Nekatera za prehrano pomembna makrohranila v g/100 g očiščenega belega zelja (Černe, 1998).....	3
<b>Preglednica 2:</b> Fizikalno – kemijske lastnosti L-askorbinske kisline (Bender, 1993).....	12
<b>Preglednica 3:</b> Klasifikacija zelenjave glede na vsebnost nitrata (mg/kg svežega vzorca) (Santamaria, 2006 ) .....	22
<b>Preglednica 4:</b> Spremembe v vsebnosti nitrata v zelenjavi zaradi vpliva tehnoloških postopkov priprave (Leszczyńska in sod., 2009) .....	22
<b>Preglednica 5:</b> Masa pred in po 120 dnevnom skladiščenju ter izguba mase za 6 glav zelja posameznega kultivarja ( cv. Destiny in cv. Caco) .....	33
<b>Preglednica 6:</b> Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline (L-AK) in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja.....	34
<b>Preglednica 7:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja, cv. Destiny in cv. Caco, v odvisnosti od časa skladiščenja.....	36



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Askorbinska kislina (Gobec, 2001) .....	10
<b>Slika 2:</b> Oksidacija L-askorbinske kisline (Basu in Dickerson, 1996) .....	11
<b>Slika 3:</b> Biosinteza L-askorbinske kisline (Goodhart in Shils, 1980).....	13
<b>Slika 4:</b> Mehanizem reakcije L-askorbinske kisline z NO <sup>·</sup> v kislem mediju (Myshkin in sod., 1996) .....	18
<b>Slika 5:</b> Pretvorba nitrita v NO in NO <sub>2</sub> v želodcu (Du in sod., 2007) .....	23
<b>Slika 6:</b> Nastajanje nitrozaminov (Du in sod., 2007).....	24
<b>Slika 7:</b> Nastajanje nitrozamidov (Du in sod., 2007).....	24
<b>Slika 8:</b> Pridelovanje zelja na poskusnem polju Biotehniške fakultete. ....	28
<b>Slika 9:</b> Skica priprave vzorcev iz zeljne glave. 1A, 1B zgornji del; 2A, 2B spodnji del (A, B sta paralelki). ....	29
<b>Slika 10:</b> Shema priprave vzorca za nadaljnje analize.....	29
<b>Slika 11:</b> Povprečna izguba mase zelja cv. Destiny in cv. Caco po skladiščenju 120 dni..	34
<b>Slika 12:</b> Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline (L-AK ) v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja .....	35
<b>Slika 13:</b> Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja.....	36
<b>Slika 14:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline (L-AK ) v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny v odvisnosti od časa skladiščenja .....	37
<b>Slika 15:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny v odvisnosti od časa skladiščenja.....	37
<b>Slika 16:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline (L-AK ) in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja .....	38
<b>Slika 17:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L- askorbinske kisline (L-AK) v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja .....	39
<b>Slika 18:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja.....	40

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
A,B	oznaki za paralelki zgornjega oz. notranjega dela posamezne glave
Cu(II)	bakrov ion
cv.	kultivar
DHAK	dehidro-L-askorbinska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
L-AC	L-ascorbic acid
L-AK	L-askorbinska kislina
NH <sub>3</sub>	amonijak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amonijev ion
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitratni ion
SD	standardna deviacija

## 1 UVOD

Zelje (*Brassica oleracea convar. capitata var. capitata*) je najbolj razširjen predstavnik družine kapusnic. Zastopano je v večini Evropskih držav. Pri nas je pridelovanje zelja izredno pomembno, saj smo v preteklosti zelju namenili eno tretjino vseh površin, namenjenih pridelovanju vrtnin. Čeprav se v zadnjih letih pridelovanje zmanjšuje je še vedno najpomembnejša slovenska vrtnina, ki jo pridelujemo v vsakem vrtu in na kmetijah. Del pridelka je namenjen sveži porabi, večina pa kisanju. Zelje so pridelovali in konzervirali že v Antiki, konzerviranje s kisanjem je slovanski način, ki je še vedno uporaben in zelo razširjen. Vse kapusnice so kot zdravilne rastline uporabljali že od davnih časov. Cenili so jih za zdravljenje gnojnih ran, bolečin v glavi in zobeh ter oteklin ter pri želočnih težavah. (Černe, 1998).

Zelje je hranilo z nizko energetsko vrednostjo a vendar bogato z vitamini, minerali in vlakninami. Vse kapusnice vsebujejo izredno veliko kalija, manj kalcija, magnezija in fosforja ter precejšnje količine žvepla, ki daje kapusnicam značilen vonj in okus. Zelje sodi med zelenjavo z veliko vitamini. Med njimi so najpomembnejši C vitamin (20-100 mg/100 g), vitamin B<sub>1</sub> ali tiamin, B<sub>2</sub> ali riboflavin, B<sub>3</sub> ali pantotenska kislina, B<sub>6</sub> ali piridoksin in folna kislina. Belo zelje v primerjavi z drugimi kapusnicami vsebuje precej folne kisline in biotina ali vitamina H. Zelje je pomemben vir vitaminov zlasti v zimskih mesecih. Ne vsebuje veliko ogljikovih hidratov, kot sta škrob in sladkor, zato je še posebno primerno za prehrano diabetikov. Ker vsebuje velike količine vlaknin ugodno vpliva na prebavo. (Černe, 1998).

Prehranska vrednost zelja je odvisna od njegove sestave, predvsem od vsebnosti vitaminov in mineralov. Količina le-teh se je odvisna od kultivarja in načina priprave (Fordham, Hadley, 2003). Zaradi splošne razširjenosti in velikih količin zaužitega zelja v tradicionalni prehrani smo v nalogi vzeli pod drobnogled dva izredno pomembna parametra; vitamin C in nitrat. Oba imata pomembno funkcijo in vpliv na metabolizem kar posredno vpliva na zdravje.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen raziskave je bil:

- določiti vsebnost nitrata in L-askorbinske kisline v zelju cv. Destiny in cv. Caco
- ugotoviti razporeditev nitrata in L-askorbinske kisline v različnih delih rastline (zgornji in spodnji del zeljne glave)
- spremljati vpliv skladiščenja na količino merjenih parametrov
- poiskati morebitno povezavo med vsebnostjo nitrata in L-askorbinske kisline.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Različni kultivarji zelja imajo različno vsebnost nitrata in L-askorbinske kisline.

Znotraj istega kultivarja so razlike v količini merjenih parametrov med posameznimi deli rastline (zgornji, spodnji).

Predvidevamo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna vsebnosti L-askorbinske kisline v določeni vrsti zelja oz. določenem delu rastline.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZELJE

V večini Evropskih držav je zelje pomembna kapusnica. Pri nas je pridelovanje zelja izredno pomembno, saj smo v preteklosti zelju namenili okoli 4000 ha zemljišč. Ta zemljišča so pomenila eno tretjino vseh površin, namenjenih pridelovanju vrtnin. Ker daje zelje velik hektarski pridelek je pomenilo v skupnih pridelkih kar 60 % vseh količin. Čeprav se v zadnjih letih zelju namenjena zemljišča zmanjšujejo, je še vedno najpomembnejša slovenska vrtnina, ki jo pridelujemo v vsakem vrtu in na kmetijah. Del pridelka je namenjen sveži porabi, večina pa kisanju (Černe, 1998).

Družina *Brassicaceae* (Cruciferae)-križnice, obsega 350 rodov, v katerih je razvrščenih približno 3000 vrst. Belo zelje sodi v vrsto *Brassica oleracea* L. -kapusnice (Černe, 1998).

#### 2.1.1 Izvor

Kapusnice izvirajo iz Sredozemlja, predvsem iz Male Azije, kjer uspevajo številne samorasle križnice. Te se nahajajo tudi na obalah Atlantika, zato nekateri avtorji menijo, da izvirajo iz obeh območij.

Kapusnice so poznali že stari Grki. Aristotelov učenec Teofrast je opisal tri tipe kapusnic, ki so predhodniki kodrolistnega ohrovta, ohrovta in zelja. V tistem času so kapusnice pripravljali surove ali kuhane. Način kisanja kapusnic s soljo, da bi se razvila mlečna kislina, so začeli uporabljati stari Slovani. V 18. stoletju je v Angliji delovala kisarna zelja, saj so ugotovili ugoden vpliv kislega zelja na preprečevanje skorbuta. Ugoden vpliv kislega zelja na zdravje so izkoriščali predvsem pomorščaki na dolgih plovbah.

V zahodni Evropi so se razvile številne populacije zelja, iz teh pa krajevne sorte. Nekatere teh krajevnih sort pridelujejo še dandanes (Černe, 1998).

## 2.1.2 Kemijska sestava

Zelje je hranilo z nizko energetske vrednostjo a vendar bogato z vitamini, minerali in vlakninami.

Preglednica 1: Nekatera za prehrano pomembna makrohranila v g/100 g očiščenega belega zelja (Černe 1998)

Makrohranilo	g/100 g belega zelja
Voda	91,0-95,0
Surove beljakovine	0,4-2,2
Surove maščobe	0,1-0,2
Ogljikovi hidrati	3,3-4,3
Vlaknine	1,0-2,5
Minerali	0,37-0,80
Energijska vrednost (kJ)	96-113

Vse kapusnice vsebujejo izredno veliko kalija, manj kalcija magnezija in fosforja ter precejšnje količine žvepla, ki daje kapusnicam značilen vonj in okus. Natrija je veliko v kislem zelju. Belo zelje vsebuje v 100 g 177-294 mg kalija, 17-76 mg kalcija, 21,4-67 mg fosforja, 12-25 mg magnezija, 90 mg žvepla, 6-20 mg natrija, 0,4-2,05 mg železa. Zelje sodi med zelenjavo z veliko vitamini. Med njimi so najpomembnejši C vitamin (20-100 mg/100 g), vitamin B<sub>1</sub> ali tiamin, B<sub>2</sub> ali riboflavin, B<sub>3</sub> ali pantotenska kislina, B<sub>6</sub> ali piridoksin in folna kislina. Belo zelje v primerjavi z drugimi kapusnicami vsebuje precej folne kisline in biotina ali vitamina H (Černe, 1998).

V kapusnicah so zastopane vse pomembne aminokislinae. V njih je veliko arginina, izolevcina, levcina, valina, lizina, histidina in treonina. Zelje vsebuje tudi organske kisline, predvsem jabolčno in citronsko. Zunanji listi vsebujejo več jabolčne, notranji pa več citronske kisline (Černe, 1998).

Glukozinolati so sekundarni metaboliti rastlin, ki jih najdemo izključno v križnicah. Ti žveplovsebuječi glikozidi se pojavljajo v največjih koncentracijah v družinah *Resedaceae*, *Capparaceae* in *Brassicaceae* (križnice). V humani prehrani predstavljajo zelje, brstični ohrovt, brokoli in cvetača največji vir glukozinolatov (Verkerk, 2002).

Glukozinolati, katerih skupna količina je večja v belem kot v rdečem zelju, dajejo zelju okus. Mednje uvrščamo 2-propenil-, 3-metilsulfinilpropil-, 4-metilsulfinilbutil-, indol-glukozinolat. Količina teh snovi zelo varira glede na kultivar zelja, vrsto tal, vremenske razmere med rastjo in način pridelovanja. Vonj daje zelju S-metilcistein, ki med termično obdelavo razpade v dimetildisulfid. K aromi zelja bistveno prispevajo tudi izotiocianat, tiocianat, sulfid in dialkoholi (Černe, 1999).

### 2.1.3 Prehranska vrednost

Glede na užitni del rastline sodi zelje v skupino listnate zelenjave. Kot že samo ime pove je užitni del predvsem listna masa. Po hranilni vrednosti ga uvrščamo med vrtnine z nižjo energijsko vrednostjo. 100 g svežega belega zelja vsebuje 69-113 kJ (23-27 kcal), kisló zelje pa 63-92 kJ (15-22 kcal) (Černe, 1998).

Prehranska vrednost zelja je odvisna od njegove sestave, predvsem od vsebnosti vitaminov in mineralov. Količina le-teh se zelo spreminja in je odvisna od kultivarja in načina priprave (Fordham in Hadley, 2003).

Zelje je pomemben vir vitaminov, zlasti v zimskih mesecih. Zelje ne vsebuje veliko ogljikovih hidratov, kot so škrob in sladkorji, zato je še posebno primerno za prehrano diabetikov (Černe, 1998).

Vse kapusnice so kot zdravilne rastline uporabljali že od davnih časov. V antični Grčiji in Rimu so jih cenili za zdravljenje gnojnih ran, bolečin v glavi in zobeh ter oteklin. Iz kapusnic pripravljene jedi so priporočali, podobno kot zdaj, pri želodčnih in črevesnih tegobah (Černe, 1998).

Veliko raziskav je bilo osredotčenih na fitokemikalije iz zelja, ki ugodno vplivajo na zdravje. Predvsem indol-3-karbinol, sulforafani in indoli. Te komponente pomagajo pri aktivaciji in stabilizaciji antioksidativnih in detoksifikacijskih mehanizmov v telesu, ki uničujejo rakotvorne substance (Singh in sod., 2006).

Kapusnice, med njimi tudi zelje, vsebujejo precejšnje količine žvelpa. Žveplo vsebujoče snovi dajejo zelju značilen vonj in okus (Černe, 1998). Nekateri glukozinolati so znani kot antikancerogeni. Encim mirozinaza (trivialno ime), ob prisotnosti vode, hidrolizira glukozinolate do izotiocianatov in drugih produktov. Encim obstaja v mnogih oblikah v različnih rastlinah. Glukozinolati se pri encimski hidrolizi pretvorijo v biološko aktivne produkte, kot so že omenjeni izotiocianati, organski cianidi in ionski tiocianati ter drugi produkti, ki inducirajo različne encime za detoksifikacijo prostih radikalov (Verkerk, 2002).

Raziskava opravljena na cvetači kaže, da zamrzovanje s predhodnim blanširanjem zniža skupne glukozinolate za 31-37 %, nadaljno dolgo zamrzovanje pri -20 do -30 °C pa bistveno ne vpliva na količino glukozinolatov (Volden in sod., 2009).

Balastne snovi so zelo pomembne v sodobni prehrani. Pospesujejo prebavo in iztrebljanje, znižujejo količino holesterola in vežejo toksične snovi. Ker kapusnice vsebujejo precej vlaknin, so priporočljive pri želodčnih in črevesnih tegobah, spodbujajo prebavo in ohranjajo normalno črevesno floro. Presni sok zelja je zelo dober za zdravljenje rane na dvanajstniku ter želodčnih in črevesnih čirov. Biološko kisanje zelja poveča njegovo prebavljivost in obstojnost, ohrani vse bistvene sestavine, tudi vitamin C. Kisló zelje vsebuje mlečno kislino, ki preprečuje gnilobne procese v želodcu in črevesju in pomaga pri izločanju strupenih snovi iz telesa. Acetilholin iz kislega zelja širi ožilje, zmanjšuje

poapnenje žil, znižuje krvni tlak in je odgovoren za peristaltiko ali gibanje črevesja, zato ga priporočajo pri urejanju prebave (Černe, 1998; Černe 1999).

Obkladek iz zelja ali drugih kapusnic lajša revmatične bolečine, otekle ude, migreno, glavobol, astmo, bronhitis, zobobol, vnetje grla, boleče menstruacije, vnetje jeter in žolčne napade, opekline, pike žuželk, bolečine v očeh in zatrdline po operacijah (Černe, 1998).

#### **2.1.4 Opis kultivarjev**

V Sloveniji imamo avtohtone sorte, ki so jih gojili naši predniki. Za seme so odbirali najboljše glave, jih semenili in tako izboljševali kakovost zelja. Iz domačih avtohtonih sort kot so Ljubljansko, Kašeljško, Zaloško in Bloško zelje so po drugi svetovni vojni vzgojili sorti Emona in Kranjsko okroglo. Danes pri pridelovanju zelja prevladujejo hibridi. Pred običajnimi sortami imajo naslednje prednosti:

- večja izenačenost in s tem možnost sočasnega pobiranja
- večji pridelki, zato večja učinkovitost pri pobiranju
- bolj primerni za skladiščenje
- odpornost proti boleznim
- odpornost proti pokanju glav (Černe, 1998).

Poznamo veliko kultivarjev zelja, ki se med seboj ločijo po:

- obliki glave (okrogle, podolgovate, ploščate)
- po barvi
- glede na čas pobiranja
- po teksturi listov
- po namenu porabe
- po rasti.

Pri izbiri sort je potrebno upoštevati namen pridelave, čas prodaje ter zahteve kupcev. Glede na namen porabe razlikujemo:

- sorte za neposredno prodajo na trgu
- sorte za kisanje
- sorte za skladiščenje.

Glede na čas pobiranja ločimo:

- zgodnje sorte, ki potrebujejo od presajanja do tehnološke zrelosti 50 do 70 dni
- srednje zgodnje sorte, ki potrebujejo od presajanja do tehnološke zrelosti 71 do 100 dni
- pozne sorte, ki rastejo od presajanja do pobiranja več kot 131 dni (Černe, 1998).

Zelje ima relativno močno razvito glavno korenino, ki je lahko dolga do 1,5 m z mnogimi stranskimi koreninicami. Nad tlemi razvije glavo z vretenom in kocenom. Glavo okrožajo listi imenovani vehe (Osvald in Kogoj-Osvald, 2003).

##### **2.1.4.1 Zelje cv. Destiny**

Destiny je srednje zgodnji hibrid. Glave so okrogle, zelo odporne na pokanje, zato lahko ostanejo na polju daljše obdobje. Dozori približno 75 dni po presajanju. Je razmeroma dobro odporen na sušo. Glave so v povprečju težke 1,8 kg.

#### 2.1.4.2 Zelje cv. Caco

Je eden najbolj odpornih in vsestransko uporabnih hibridov belega zelja. Primeren je za svežo potrošnjo, zgodnje kisanje, če ga sejemo in presajamo nekoliko kasneje ga lahko tudi skladiščimo. Dozori 85 do 95 dni po presajanju. Glave so okrogle oblike in imajo odlično notranjo zbitost kvaliteto listov, ki so zelo tanki. Priporočljiva gostota sajenja je 25.000 do 60.000 sadik/ha, odvisno od nadaljnje uporabe in zelene teže glave, ki tehtajo 2 do 6 kg. V tehnološki zrelosti zdrži na polju tudi do 4 tedne.

#### 2.1.5 Rast in obiranje zelja

Zelje in ohrovt uspevata zelo dobro v letih z obilo padavin in nižjimi temperaturami, manjše pridelke pa dobimo v sušnih in toplih letih, če nimamo urejenega namakanja. Ker zelje zahteva veliko vlage, optimalna vlaga tal je od 80-90 % poljske kapacitete, vlažnost zraka 85-90 % relativne zračne vlage, zelo dobro uspeva v kotlinah in ob rekah (Černe, 1999).

Za rast in razvoj kapusnic je optimalna temperatura od 15 do 20 °C. Uspešno rastejo v zmerno vlažnem podnebju, kjer ob primerni oskrbi dajejo visoke in kakovostne pridelke (Osvald in Kogoj-Osvald, 2003).

Rast zelja je se zaustavi pri temperaturah nad 25 °C in pod 0 °C, kljub temu lahko rastline odporne na nizke temperature preživijo tudi krajša obdobja tudi pod 0 °C brez večjih poškodb (Fordham in Hadley, 2003).

Največje pridelke dobimo na srednje težkih peščenno-ilovnatih tleh. Optimalna reakcija tal je nevtralna pH 6,5-7,5. Velike pridelke dobimo pri gnojenju z organskimi gnojili (Černe, 1999).

Zelje potrebuje za svojo rast obilno gnojenje, ki pa ga je potrebno prilagoditi glede na oskrbljenost tal s hranili, kultivar, vremenske razmere, kakovost zemlje in razvojni stadij posevka. Rastline črpajo hranila iz zemlje le ko ima zemlja primerno vlažnost. Zelje zahteva globoko obdelana tla, bogata z organsko snovjo. Zelje potrebuje harmonično gnojenje, drugače prihaja do fizioloških motenj. Za gnojenje zelja uporabljamo organska gnojila, N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, CaO in MgO. Posamezna hranila značilno vplivajo na rast in razvoj rastlin zelja. Od količine dodanega dušika sta odvisni količina in kakovost pridelka. Pri premočnem gnojenju z dušikom razvije rastlina veliko rozeto z velikimi listi in debelimi listnimi žilami. Rastline razvijejo rahle glave, rade pokajo, listi so svetlo zeleni in sčasoma posamezni odpadajo, zelje ima grenak okus in ni primerno za skladiščenje. Preobilica dušika povzroča notranjo gnilobo in pokanje glav. Pomanjkanje dušika vpliva na slabšo rast, glave so netržne, majhne, kasneje dozorevajo, v skladišču zelje ni obstojno, kislo pa je grenko. Pomanjkanje fosforja pa na razvoj in barvo. Pravilna oskrba s kalijem vpliva na čvrstost glav, pri pomanjkanju se pojavi neprijeten vonj pri pripravi zelja. (Osvald in Kogoj-Osvald, 1998).

Prevelike količine dušičnih gnojil lahko zmanjšajo vsebnost C vitamina v različnih vrstah sadja in zelenjave (Seung in Adel, 2000).



Zelje pobiramo, ko so glave čvrste in primerno razvite. Pri poznih sortah, ki jih nameravamo skladiščiti, je izredno pomembno, da jih pravočasno pobereemo, kajti premalo dozorelo zelje v skladišču izgubi precej mase, preveč dozorelo pa gnije. Dozorelost lahko ugotovljamo z merjenjem količine disaharidov v vretenu ali gostote (Černe, 1998).

Študije na kitajskem zelju dokazujejo, da ob normalnih pogojih obiranje zelja ob določenem delu dneva in kratek zamik pri ohlajevanju ne vplivata da dogajanje v zeljnih glavah med skladiščenjem. To lahko razložimo z zaščitno funkcijo ovojnih listov, ki zmanjšujejo stres zaradi nihanja temperatur (Klieber in sod., 2002).

### 2.1.6 Postopki pred skladiščenjem

Pred skladiščenjem je potrebno pridelek pripraviti na skladiščenje. Ustrezni postopki pred skladiščenjem prispevajo k ohranjanju kakovosti pridelka. Pridelek dobro osušimo, odberemo le lepše plodove in jim odstranimo vse poškodovane dele, potrebno pa je tudi ohlajanje pridelka. Z glav, ki jih nameravamo skladiščiti ne odstranimo vseh veh. Del zunanjih, zdravih veh pustimo, da se osušijo in tako ščitijo glavo pred izgubljanjem vlage v času skladiščenja.

Hitro ohlajanje pridelka je potrebno zato, da se upočasnijo biokemijski procesi staranja in zorenja, razvoj mikroorganizmov, čezmerna izguba vode, upočasnimo spremembo barve, izboljšamo kakovost in podaljšamo uporabnost skladiščenega pridelka. Hitro ohlajene vrtnine uspešneje skladiščimo in so bolj čvrste, kar je pogoj za transport hitro pokvarljivih živil. Poznamo več načinov hitrega ohlajanja pridelka (Hibar, 1999):

- predhlajenje s hladnim zrakom: Za ta namen uporabljamo manjše celice ali tako imenovane tunele, v katerih hladen zrak intenzivno kroži, tako da se celotna količina pridelka hitro ohladi. Pomembno je, da v času hitrega ohlajanja ohranjamo v prostoru visoko relativno vlažnost, saj nastanejo največje transpiracijske izgube med ohlajanjem s 25 na 0 °C. Te izgube preprečimo tako, da zagotovimo v hladilnih celicah zadostno površino izmenjevalnika toplote v majhni razliki med temperaturo celice in temperaturo hladilnega sredstva.
- Predhlajenje v ledeni vodi: ohlajanje z ledeno vodo (hydrocooling) poteka bistveno hitreje kot ohlajanje s hladnim zrakom, ker je pridelek v neposrednem stiku z ohlajenim medijem. Problem nastane pri pridelkih, ki so težji od vode in pri listnati zelenjavi, ker lahko pride do gnilobnih procesov, zaradi zadrževanja vode med listi. Uporaba te tehnike zahteva tudi sanitacijo vode (hipoklorid), kar prepreči hitrejši razvoj mikroorganizmov in okužbo zdravih rastlin.
- Predhlajenje v vakuumu: postopek je primeren za ohlajevanje predvsem listnatih vrtnin oziroma vrtnin z veliko površino. Odvzemanje toplote poteka po principu intenzivnega izparevanja vode na površini vrtnin. Tlak v komorah je od 6 do 30 milibarov, pri tem se za izparevanje porabi toplota pridelka. Izparevanje 1 % vode zniža temperaturo v pridelku za 5,5 °C. Da preprečimo velike izgube teže pridelka in ovenelosti listov, jih pred postopkom ohlajanja dodatno navlažimo in s tem omogočimo, da se za ohlajanje porabi dodana voda, pridelek pa ostane svež.

### 2.1.7 Pogoji skladiščenja

Za skladiščenje so primerne palete, ki imajo na stranskih stenah odprtine (10-25 % površine). Tako dosežemo dobro zračenje pridelka, kar je pogoj za ohranjanje kakovosti (Černe, 1999).

V normalni atmosferi skladiščimo vrtnine v celicah pri temperaturi od -0,5 do +15 °C, odvisno od vrste in njihove fiziološke sposobnosti. Zelje skladiščimo pri temperaturi 0 °C, relativni vlažnosti med 90 in 95 %, do 5 mesecev. Upoštevati moramo fiziološko stanje glav ob obiranju, njihovo zrelost ter predvideni čas skladiščenja (Hribar, 1999).

Pri skladiščenju v spremenjeni atmosferi moramo biti pozorni, da ne presežemo mejnih vrednosti O<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>, saj to privede do poškodb, kot je na primer sprememba okusa. Mejna sestava plinov pri skladiščenju zelja: O<sub>2</sub> < 2,5 %, CO<sub>2</sub> > 5,5 % (Hribar, 1999).

Fordham in Hadley (2003) navajata, da lahko belo zelje skladiščimo pri temperaturi 0-1 °C in 95 % relativni vlažnosti največ 6 mesecev. Shranjevanje za daljša obdobja, do 9 mesecev, lahko dosežemo v kontrolirani atmosferi. Optimalni pogoji so pri koncentraciji O<sub>2</sub> 2,5-3 % in 2-5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.1.8 Spremembe med skladiščenjem

Med skladiščenjem kapusnic se najpogosteje pojavljajo nekatere bolezni, ki jih povzročajo bakterije, med glivami črnoba kapusnic (*Alternaria*), siva plesen, kapusna plesen (*Peronospora*), virusne okužbe in druge (Hribar, 1999).

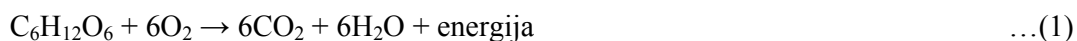
Med skladiščenjem živil, prihaja do zelenih in neželenih sprememb. S shranjevanjem lahko postanejo živila okusnejša, boljša ali pa pride do nezaželenih procesov in postanejo za prehrano ljudi neprimerna. Vzroke, ki povzročajo spremembe v živilih lahko razdelimo v tri skupine (Gliha in Kodele, 1990):

- Mikroorganizmi: prispevajo tako h koristnim kot tudi k škodljivim spremembam v živilih. Določeni mikroorganizmi, ki se prehranjujejo z organskimi snovmi, se torej tudi z živilom. Organsko snov najprej razgradijo do enostavnejših komponent in nato iz le-teh sintetizirajo lastne snovi. Razgradnja organskih snovi poteka v dveh fazah. Hidroliza poteče s pomočjo hidrolitičnih encimov zunaj celic mikroorganizmov. Encime začne sproščati mikroorganizem, ko pride v stik z živilom. Nadaljnja razgradnja molekul organskih snovi poteče znotraj celic mikroorganizma.
- Encimi: povzročajo biološko-kemične spremembe v živilih (zorenje, staranje). Delovanje encimov pospešujejo toplota, voda, zrak in svetloba. V živilih lahko prihaja do zelenih sprememb kot so tvorba aromatičnih snovi med fermentacijo ali spremembe med zorenjem mesa. Nezaželeni spremembe lahko preprečimo ali vsaj upočasnimo z nizko temperaturo skladiščenja, shranjevanjem živil v temnejših prostorih in delno odstranitvijo kisika.
- Fizikalni dejavniki iz okolice: do teh sprememb prihaja predvsem zaradi neprimerne vlage v skladiščih in prisotnosti raznih nespecifičnih arom. Pri

preprečevanju teh sprememb je pomembno, da skladiščimo suha živila ločeno od bolj vlažnih, da uravnavamo vlago v skladišču glede na vrsto živila in da so aromatična živila ločena oziroma v embalaži, ki ne prepušča zraka.

relativna vlažnost = 100 %\* absolutna vlažnost/maksimalna vlažnost

Dihanje je metabolni proces, ki se odvija v vsakem živem organizmu in predstavlja merilo za metabolno aktivnost določenega organizma. Predstavlja oksidativno razgradnjo kompleksih sestavin (ogljikovih hidratov, proteinov, lipidov) v preprostejše molekule, kot so ogljikov dioksid in voda. Sprošča se energija in molekule, ki jih celice potrebujejo za reakcije sinteze (Lee s sod., 1995). Procese lahko opišemo z naslednjo kemijsko reakcijo.



Na hitrost dihanja med skladiščenjem vpliva več dejavnikov (Požrl, 2001). Različne vrste sadja in zelenjave imajo različno intenziteto dihanja. Zelje spada med zelenjavo z nižjo intenziteto dihanja, zato se lahko skladišči praktično do naslednjega pridelka. Pri višjih temperaturah in višji relativni vlažnosti se poveča intenziteta dihanja in pride do sprožitve določenih reakcij. Zato skladiščimo živila pri nižjih temperaturah in nižji relativni vlažnosti, kjer so ti procesi upočasneni. Temperatura je odvisna od vrste pridelka, ki ga skladiščimo. Na dihanje vpliva tudi sestava atmosfere, predvsem vsebnost kisika, ogljikovega dioksida in etilena. Pri mehanično obdelanem sadju in zelenjavi se pojavi mehanski stres. Poveča se površina in izboljša difuzija plinov. Pri tem iz sadja in zelenjave izstopa ogljikov dioksid, olajšan pa je dostop kisika iz atmosfere do celic. Raziskave kažejo na to, da se zaradi mehanične obdelave sadja in zelenjave pospeši dihanje za 3-5 krat. Intenziteta dihanja je večja pri mlajših celicah (Plestenjak, 1995).

## 2.2 L-ASKORBINSKA KISLINA

### 2.2.1 Definicija in splošne lastnosti

Vitamini so organske spojine, ki v majhnih količinah omogočajo nemoten potek različnih metabolnih procesov (Gobec, 2001).

Vitamini so biološko aktivne snovi, ki delujejo že v izredno majhnih količinah. Njihovo delovanje je podobno delovanju katalizatorjev, zato jih tudi štejemo med biokatalizatorje. Za razliko od drugih biokatalizatorjev, jih človeški in živalski organizem pretežno ne more tvoriti, zato jih mora dobiti s hrano (Golob, 1987).

Beseda vitamin je sestavljena iz besed VITA (življenje) in AMIN (dušikova spojina). V hrani se nahajajo v izredno majhnih količinah. Lahko so sestavni deli koencimov, predvsem vitamini skupine B (tiamin, nikotinamid, piridoksin) (Mali, 1999).

Vitamini morajo biti prisotni v hrani, ker jih organizem bodisi ne more sintetizirati ali pa jih sintetizira v nezadostnih količinah (Basu in Dickerson, 1996).

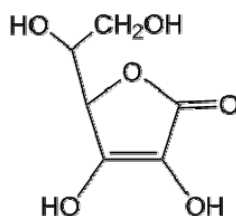
Vitamin C najdemo v različnih vrstah živil, še posebej v sadju in zelenjavi. Obstaja v dveh oblikah L-askorbinska kislina in dehidro-L-askorbinska kislina, oksidacijsko redukcijski sistem, ki ni le osnova številnih fizioloških aktivnosti ampak tudi številnim tehničnim aplikacijam (Bender, 1993).

Zaradi antioksidativne lastnosti je vitamin C ali L-askorbinska kislina v živilski industriji vsestransko uporaben, predvsem kot konzervans, ki ohranja barvo aromo in teksturo proizvodov ter izboljša splošno obstojnost prehrabnenih izdelkov. Kot antioksidacijsko sredstvo (tudi v obliki natrijeve in kalcijeve soli) ga npr. dodajajo pri proizvodnji piva, sadnih sokov, vina, konzerviranega sadja in zelenjave, pri prekajevanju mesnih izdelkov, v industriji moke za povečevanje pecilne kvalitete in videza kruha. Estri L-askorbinske kisline se uporabljajo za antioksidativno zaščito maščob (Rudan-Tasič, 2000).

### 2.2.2 Nomenklatura in struktura

V literaturi najdemo vitamin C pod različnimi imeni: L-askorbinska kislina, antiskorbutni vitamin, heksuronska kislina, skorbutamin, cevitaminska kislina. Njeno kemijsko ime je 1,4-lakton 2,3- dehidroglukonske kisline (Golob 1987).

Strukturno formulo askorbinske kisline prikazuje slika 1 (Gobec, 2001).

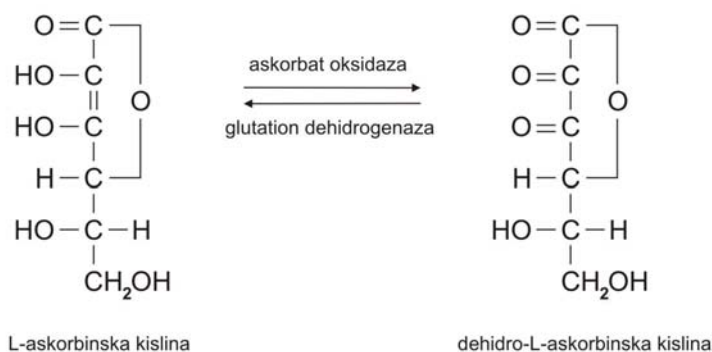


Slika 1: Askorbinska kislina (Gobec, 2001)

### 2.2.3 Struktura L-askorbinske kisline

Vitaminski učinek imata L-askorbinska kislina, ki je močan reducent in njena oksidirana oblika L-dehidroaskorbinska kislina. Čeprav se vitamin C v telesnih tekočinah nahaja večinoma v reducirani obliki, imata obe obliki biološko aktivnost in se pretvarjata iz ene v drugo obliko v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije (Basu in Dickerson, 1996).

Za to pretvorbo so odgovorni encimi. Dva izmed teh encimov sta glutatation-dehidrogenaza in askorbat-oksidaaza (Basu in Dickerson, 1996).



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

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

Dehidro Laskorbinska kislina kristalizira v obliki drobnih iglic. Vodna raztopina DHAK reagira nevtralnno in je slabše obstojna kot vodna raztopina L-AK. V naravnem materialu (rastlinskem tkivu) se DHAK s HS-glutationatom in drugimi HS-spojninami reducira do L-AK. Vodikov sulfid reducira dehidro askorbinsko kislino v askorbinsko kislino. (Golob, 1987).

Potrebno je omeniti diasteromeri askorbinske kisline, D-izoaskorbinsko kislino in dehidro-D-izoaskorbinsko kislino. Ti komponenti najdemo v predelanih živilih, oksidacijsko redukcijski sistem se izkorišča v živilski industriji kot konzervans (Bender, 1993).

Molekula L-AK vsebuje na četrtem in petem ogljikovem atomu dva kiralna ogljikova atoma in prav zaradi tega teoretično obstajajo 4 stereoizomere AK (Kall in Ball, 2003). Enantiomera L-AK je D-askorbinska kislina. Ostali dve stereoizomeri, D- in L-eritro-2-heksenono-1,4 laktone, lahko imenujemo z enim od njunih štirih trivialnih imen, in sicer D- in L-araboaskorbinska, D- in L-izoaskorbinska ali eritorbična kislina (Seib, 1985).

L-izomera ima biološko aktivnost, medtem ko D-izomera kaže slabši terapevtski učinek pri zdravljenju skorbuta, vendar ima podoben redoks potencial. Obe izomeri se uporabljata v preventivi nastajanja nitrozamina iz nitratov, ki se uporabljajo kot konzervansi (Medić-Šarić, 2002).

#### 2.2.4 Fizikalno kemijske lastnosti

L-askorbinska kislina je bela kristalinična snov, biološko in kemično sintetizirana iz D-glukoze. Ima prijeten kiselkast okus in je brez vonja. Čista L-askorbinska kislina je na zraku relativno dobro obstojna. V vodnih raztopinah pa na obstojnost vplivajo: temperatura, pH, težke kovine Cu in Fe, kisik, amino kisline, encimi in način pakiranja. L-askorbinska kislina je najbolj stabilna pri pH=2-3. Vitamin C, izpostavljen zraku in svetlobi, se oksidira. L-askorbinska kislina je netopna v etru, kloroformu, benzenu,

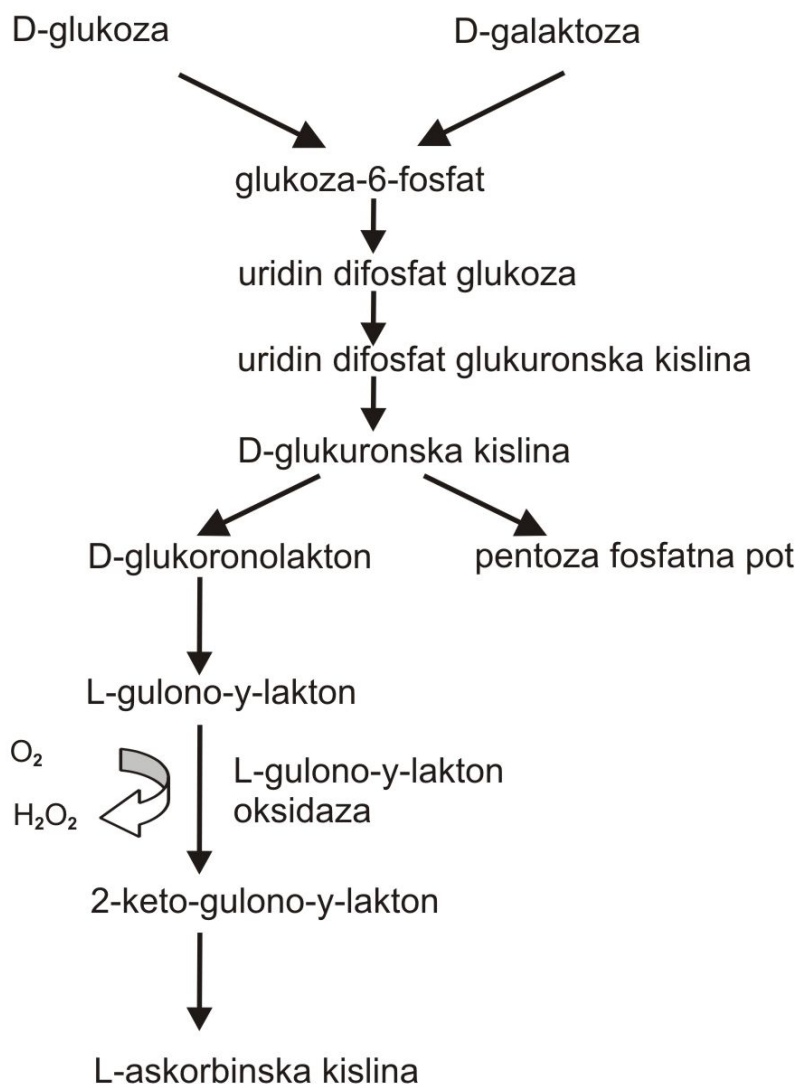
petroletru, oljih, maščobah in maščobnih raztopinah. Fizikalno – kemijske lastnosti so povzete v spodnji preglednici 2 (Bender, 1993).

Preglednica 2: Fizikalno – kemijske lastnosti L-askorbinske kisline (Bender, 1993)

Lastnost	Značilnost
formula	$C_6H_8O_6$
relativna molekulska masa	176,12 g/mol
videz	bela kristalinična snov, brez vonja
oblika kristala	monoklinski, navadno v obliki ploščic, včasih iglic
temperatura tališča	190-192 °C
gostota	1,65 g/cm <sup>3</sup>
redoks potencial (E0')	+ 0,127 (pH = 5)
optična rotacija	$[\alpha]_D^{25} = +20,5-21,5^\circ$ (c = 1 v vodi) $[\alpha]_D^{23} = +48^\circ$ (c = 1 v metanolu)
pH	3 (5 mg/ml), 2 (50 mg/ml)
pK <sub>1</sub>	4,17
pK <sub>2</sub>	11,57
UV ( $\lambda_{max}$ )	245 nm (kisla raztopina) 265 nm (nevtralna raztopina)
topnost L-AK (1g)	topna v 3 ml vode, v 30 ml alkohola, v 100 ml glicerola, v 20 ml propilenglikola; netopna v etru, kloroformu, benzenu, petroletru, oljih, maščobah in maščobnih raztopinah

### 2.2.5 Biosinteza L-askorbinske kisline

Večina rastlin in živali ima sposobnost sinteze vitamina C iz D-glukoze ali D-galaktoze preko glukuronske kisline. Vrste, ki niso sposobne sinteze vitamina C, so primati, vključujoč človeka, morskega prašička, postrvi in šarenke. Vzrok za to je pomanjkanje encima L-gulonolakton-oksidade, ki je potreben za pretvorbo 2-keto-L-gulonolaktone v L-askorbat. Zato so te vrste odvisne od eksogenega vira tega vitamina (Basu in Dickerson, 1996).



Slika 3: Biosinteza L-askorbinske kisline (Goodhart in Shils, 1980)

### 2.2.6 Funkcije v organizmu

Vitamin C sodeluje pri tvorbi veznega tkiva, predvsem kolagena, steroidov, lipidov ter pri sintezi kateholaminov. Pomemben je pri razgradnji aminokislin in sodeluje pri presnovi (mikrosomski biotransformaciji) zdravil. Kot oksido-redukcijsko sredstvo je sprejemnik in oddajnik elektronov in je zato pomemben pri večini fizioloških procesov (Pokorn, 1996).

Fiziološko delovanje vitamina C je posledica njegovih kemijskih lastnosti: je donor elektronov oz. reductent in sodeluje v reakcijah, kjer se prenašajo elektroni. Askorbat je

kofaktor za vsaj osem encimov, ki sodelujejo pri sintezi kolagena, karnitina, noradrenalina, tirozina in peptidnih hormonov (Gobec, 2001).

Askorbinska kislina je potrebna za redukcijo trivalentnega železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) v dvovalentno železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in za redukcijo bakra. Absorpcija železa iz rastlinske hrane je boljša ob prisotnosti C vitamina (Medić-Šarić, 2002).

Vitamin C je bil odkrit kot antiskorbutni faktor pred slabim stoletjem. Je v vodi topen vitamin, ki ima tako encimske kot kemijske funkcije ter sodeluje kot kofaktor v številnih kemijskih reakcijah. Je eden najpomembnejših lovilcev prostih radikalov pri rastlinah, živalih in človeku (Kall in Ball, 2003).

Pri običajnem vnosu askorbinske kisline (100 mg na dan) je v telesu absorpcija 80-95 %. Pri večjih količinah zaužitega vitamina C je absorpcija nižja. Neabsorbirana askorbinska kislina postane substrat v metabolizmu črevesnih bakterij (Bender, 1993).

Medtem, ko je minimalna količina askorbinske kisline trdno določena, se mnenja o priporočenem dnevnem vnosu razlikujejo in sicer med 30 in 80 mg na dan. Sheffieldova študija dokazuje, da manj kot 10 mg vitamina C na dan prepreči pojav skorbuta ali zdravi klinične znake. Svetovna zdravstvena organizacija priporoča 30 mg na dan (Bender, 1993).

Dnevni vnos askorbinske kisline mora nadomestiti količine, ki se izločijo ali uničijo z oksidacijo, kar znaša 60 mg. V zadnjem času priporočajo povečanje dnevnega vnosa vitamina C na vsaj 100-120 mg. Znanе so povečane potrebe pri nekaterih bolezenskih stanjih (peptična razjeda, diabetes, karcinom, psihični in fizični stres). Potrebe so povečane pri alkoholikih in kadilcih, koncentracija askorbata v krvi je zmanjšana tudi ob uporabi oralnih kontraceptivov (Gobec, 2001).

Tablice referenčnih vrednosti za vnos hranil določajo vnos vitamina C za otroke stare od 10 do manj kot 13 let 90 mg/dan, za otroke nad 13 let in odrasle 100 mg/dan. Povečane potrebe po vitaminu C imajo nosečnice in doječe matere ter ljudje v določenih življenjskih okoliščinah kot so hudi telesni napor, stres, nekatera obolenja, kajenje in zloraba zdravil. Zrcalo preskrbljenosti je koncentracija vitamina C v krvni plazmi. Zaželen preventivna koncentracija vitamina C v krvni plazmi  $> 50 \mu\text{mol/l}$  (Referenčne vrednosti..., 2004).

Škodljivi učinki vitamina C so povezani z odmerkom. Če bolnik vzame večji odmerek se pojavita napenjanje in driska. Produkt razgradnje vitamina C je oksalat. Izločanje oksalata se po jemanju gramskih odmerkov vitamina C poveča. Ker to poveča razvoj ledvičnih kamnov, ne priporočajo odmerkov večjih od 1 g (Gobec, 2001).

### **2.2.7 L-askorbinska kislina v živilih**

Vitamin C najdemo predvsem v sadju in zelenjavi. Podatki kažejo velike razlike med posameznimi vrstami ter znotraj posamezne vrste. Razlike znotraj vrst so značilne za veliko vitaminov v sadju in zelenjavi. Te razlike so posledica tako genetskih lastnosti kot tudi ravnih pogojev (tla, izpostavljenost sončni svetlobi, gnojenje). Na vsebnost vitaminov



vplivajo tudi pogoji in čas skladiščenja. Prav tako je jasno, da kakršnakoli obdelava živil lahko povzroči izgubo vitamina C. Tako je po raziskavi (Saxsholt and Moller) razlika v količini C vitamina v zelju: sveže 45 mg/100 g, kuhano 25 mg/100 g, zamrznjeno 24 mg/100 g (Kall in Ball, 2003).

Najboljši vir vitamina C so sadje in zelenjava in iz njih izdelani sokovi. Posebej bogati viri so jagode rakitovca in njihov sok, rdeča in zelena paprika, brokoli, črni ribez, kosmulje, koromač in citrusi. Količinsko pa so za preskrbo z vitaminom C pomembni tudi krompir, ohrovč, brstični ohrovč, rdeče in belo zelje, špinača in paradižnik. Dnevne vnosa 200 mg z ustrezno izbiro živil ni težko doseči (Referenčne vrednosti..., 2004).

Analize vitamina C v različnih vrstah zelenjave (Kobovc, 2000) kažejo, da se vsebnost vitamina C v sveži zelenjavi razlikuje glede na lokacijo pridelave. Garjetović (2006) navaja, da vsebuje največ vitamina C cv. Hinova F1, 67,6 mg/100 g, najmanj pa Holandsko pozno 36,3 mg/100 g. Rezultati analize 18 kultivarjev zelja na vitamin C kažejo, da količina niha od 5,66 do 23,5 mg/100 g svežega zelja (Singh in sod., 2006).

Količina vitamina C je pogojena z različnimi faktorji kot so vrsta in del rastline, stopnja zrelosti, klima, sončna svetloba, metode obiranja in skladiščenja. Tako vsebuje npr. glava brokolija več vitamina C (158 mg/100 g) kot njegovo steblo (110 mg/100 g), se ga pa v stebelu pri termični obdelavi več ohrani. V sadju se vitamin C kopiči dokler ne doseže sadež stopnje zrelosti, v nasprotju pa nezrela semena kot sta grah in fižol vsebujejo več vitamina C kot dozorela. Med živili živalskega izvora razen ledvic nobeno ni poznano kot značilen vir vitamina C. Najdemo ga v mesnih izdelkih, ker je dodan kot stabilizator (Basu in Dickerson, 1996).

Raziskave o obstojnosti L-askorbinske kisline nam dajejo različne rezultate. Hounsome in sod. (2009) navaja, da sveže zelje, takoj po obiranju vsebuje najvišjo koncentracijo C vitamina v obliki askorbinske in dehidroaskorbinske kisline. Po treh mesecih skladiščenja izgubi približno 80 %. Proti koncu skladiščenja se vsebnost C vitamina poveča, kar lahko pripisujemo pripravi rastline na ponovno rast. Druga raziskava navaja, da se je pri zamrznjenem brokoliju ohranilo 80 % C vitamina, med skladiščenjem se je izgubilo še manj kot 10 %. Shranjevanje na nizkih temperaturah je po 21 dneh ohranilo 80 % vitamina, medtem ko je brokoli shranjen na sobni temperaturi že po 7 dneh ohranil le še 44 % C vitamina (Favell, 1998). Pri shranjevanju zelenjave iz družine križnic avtorji navajajo minimalne izgube C vitamina. To povezujejo z visoko vsebnostjo skupnega žvepla in glutationa. Slednji je vpleten v mehanizme odgovorne za redukcijo DHA do AA v križnicah (Seung in Adel, 2000).

Izsledki nekaterih raziskav kažejo, da svetloba pri skladiščenju zelja prepreči izgubo vitamina C in poveča nivo topnih sladkorjev. Kitajsko zelje je bilo med skladiščenjem izpostavljeno svetlobi z uporabo fluorescenčnih cevi (tok fotonov z gostoto  $21,8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Rezultati kažejo, da je imelo zelje izpostavljeno svetlobi večjo izgubo mase, izguba C vitamina je bila polovična v primerjavi z zeljem v temi, povečala se je koncentracija sladkorjev, fruktoze in glukoze (Noichinda in sod., 2007).

Kravje mleko vsebuje malo vitamina C in čeprav tudi materino mleko ni bogato z vitaminom C, le-to vsebuje 3 do 4 krat več vitamina kot kravje. Posebno bogata je z vitaminom C acerola, šipek, sledijo črni ribez, pomaranča, limona, jagoda, kivi, večina zelene listnate zelenjave in krompir, predvsem neskladiščen. Krompir predstavlja pomemben vir vitamina C na račun velikih količin, ki jih zaužijemo (Basu in Dickerson, 1996).

Vitamin C uporabljamo tudi kot dodatek pri predelavi sadja za inhibicijo encimske oksidacije fenolnih spojin, ki povzročajo porjavenje. Tu vitamin deluje kot antioksidant. Kot dodatek je askorbat na voljo v obliki tablet in praškov. Askorbat najdemo v dodatkih z izbranimi vitamini in se prodajajo skupaj kot antioksidativni dodatki. Absorbcija vitamina C iz dodatkov je odvisna od količine in vezave v tableti (Kobovc, 2002).

Askorbinska kislina je najpomembnejši antioksidant v ekstracelularni tekočini. Organizem varuje pred reaktivnimi prostimi radikali. Učinkovito odstanje hipoklorite, hidroksilne radikale, vodikov peroksid in superokside. Lahko zaščiti biomembrane pred peroksidativno poškodbo (Baloh, 2002).

Analize antioksidativnih komponent v sadnih sokovih so pokazale, da nekateri fenolni antioksidanti ščitijo vitamin C pred oksidativno razgradjo. Najbolj aktivno antioksidativno komponento so našli v soku črnega ribeza (Miller in Rice-Evans, 1997).

### **2.2.8 Izgube L-askorbinske kisline**

Askorbinska kislina je zelo podvržena kemijski in encimski oksidaciji med obdelavo, kuhanjem in shranjevanjem živil. Blanširanje in pasterizacija prepreči delovanje AA oksidaze. Vendar so največje izgube vitamina C prisotne pri blanširanju v vodi zaradi izgub v vodo in termičnega razpada. Količina C vitamina v zamrznjeni špinaci je bila višja po blanširanju z vodno paro kot v mikrovalovni pečici, zaradi krajšega časa, nižje energije in manj vode (Seung in Adel, 2000).

Pri neprimernem skladiščenju in pripravi sadja in zelenjave lahko izgubimo tudi do 100 % vitamina C. Srednja vrednost za izgube ob skrbni pripravi živil pri običajni prehrani znaša 30 % (Referenčne vrednosti..., 2004).

Sveža zelenjava je lahko med shranjevanjem in distribucijo izpostavljena različnim pogojem, ki lahko vplivajo na njeno kvaliteto vključujoč vsebnost hranilnih snovi. Zelenjava namenjena zamrzovanju je zamrznjena takoj po obiranju. Največje spremembe nastenejo v primeru blanširanja, sicer je med nadaljnjim shranjevanjem globoko zamrznjene zelenjave pričakovati le majhne spremembe (Favell, 1998).

Razlike v izgubi vitamina med različnimi vrstami zelenjave lahko pripišemo izpostavljeni površini, mehanskim poškodbam, nekatere vrste zelenjave so bolj občutljive na poškodbe, vsebnosti sulfhidrilnih komponent kot tudi njihovim različnim encimskim aktivnostim (Favell, 1998).

Temperatura po obiranju zelja je najpomembnejši faktor za ohranjanje vitamina C v sadju in zelenjavi. Izgube so povečane pri shranjevanju pri visokih temperaturah in daljšem času (Seung in Adel, 2000).

Vitamin C je občutljiv za oksidacijo. Stopnja oksidacije se poveča ob prisotnosti različnih faktorjev kot so: alkalije, svetloba in bakerovi ioni. Nekateri avtorji domnevajo, da je določena zelenjava dovzetnejša za oksidacijo askorbinske kisline (Bushway in sod., 1989).

Vitamin C je topen v vodi, zato se med kuhanjem hitro izgublja. Kadarkoli uživamo živila rastlinskega izvora v presnem stanju je razpoložljivost vitamina C v splošnem visoka. Zato si lahko z uživanjem svežega sadja in zelenjave najbolje zagotovimo potrebne količine vitamina. Vsebnost vitamina C v sveže pobranem krompirju je več kot 30 mg/100 g, medtem ko se s skladiščenjem do pomladi zniža na 7-8 mg/100 g (Basu in Dickerson, 1996).

Razgradnja L-AK je eden največjih vzrokov za spremembo kvalitete in barve med proizvodnjo in skladiščenjem prehrabnih izdelkov. Razgradnja askorbinske kisline je zelo kompleksen proces, ki vključuje vrsto reakcij. Odvisne so od pH in temperature. Rezultati kažejo, da nižje temperature lahko upočasnijo razgradnjo L-AK in tako omejijo akumulacijo različnih razgradnih produktov. DHA je v vodi zelo nestabilna in se pretvarja v različne produkte kot so 2-furonska kislina, 3-hidroksi-2-piron, furfural,... V anaerobnih pogojih se AA namesto v dehidroaskorbinsko kislino pretvori skozi več korakov do furfurala. Ta lahko polimerizira ali pride do interakcije furfurala z amino kislinami to formira rjave melanoidne pigente, kar povzroča porjavenje sokov (Yuan in Chen, 1998).

Tudi Sawamura in Takemoto s sod. (1994) navajata, da je porjavenje sokov iz citrusov večinoma posledica razgradnje askorbinske kisline.

Razgradnjo askorbinske kisline v pomarančnih sokovih je raziskoval Kennedy in sod. (1992). Količina raztopljenega kisika v vzorcih po pakiranju poleg temperature shranjevanja pomembno vpliva na količino askorbinske kisline. Količina kisika, ki je normalno prisotna v sokovih pri temperaturi 37 °C, je dovolj, da povzroči občutno izgubo vitamina C.

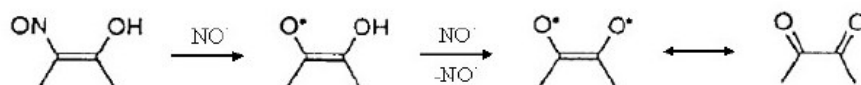
L-AK je bolj stabilna v kislem okolju. Nestabilna postane, ko se pH dvigne nad 4,0. Pri nizkem pH nastane furfural, 2-furojska kislina in 3-hidroksi-2-piron, medtem ko pri ekstremno nizkem pH (npr. pH 1) nastane predvsem furfural. V bazični vodni raztopini (pH > 7) je glavni razgradni produkt nepoznana sestavina. Pri pH 10 so prisotne samo še zelo majhne količine furfurala in 3-hidroksi-2-pirona brez 2-furojske kisline (Yuan in Chen, 1998).

Askorbinska kislina je izjemno nestabilna v vodovodni vodi, verjetno zaradi prisotnosti kovinskih ionov, ki lahko katalizirajo njeno oksidacijo. Raziskave kažejo, da se ob konstantni koncentraciji Cu(II) ionov hitrost oksidacije askorbinske kisline povečuje z višanjem pH acetatnega pufra do pH 6,0 ter v katerem koli območju z večanjem koncentracije Cu(II). Pri poizkusu stabilnosti askorbinske kisline v vzorcu zelja je po dveh minutah homogenizacije v vodovodni vodi oksidiralo 60 % askorbinske kisline. Najbolj je

obstoja v metafosforni kislini. Tudi pri homogenizaciji vzorca zelja v metafosforni kislini je bil določen največji delež askorbinske kisline. Določene vrednosti askorbinske kisline na dan homogenizacije vzorca obroka (brez dodatka reducenta) so precej večje kot naslednji dan (Wechtersbach, 2005).

Pri preučevanju vpliva pH na stabilnost askorbinske kisline Wechtersbach (2005) ugotavlja, da je askorbinska kislina relativno stabilna v kislem do pH 3, medtem ko pri višjih pH vrednostih relativno hitro razpada. Že pri pH 4 po 20 urah preostane manj kot 15 % začetne koncentracije askorbinske kisline. Askorbinska kislina je izjemno nestabilna v prisotnosti kisika in pri pH vrednostih višjih od 3 in se hitro oksidira v dehidroaskorbinsko kislino.

Pri ekologiji hrane je eden največjih problemov interakcija toksičnih snovi z vitamini. Visoka vsebnost nitrita v nekateri zelenjavi poveča možnost problema negativnega vpliva nitritnega iona na vitamine, predvsem na vitamin C. Če je raztopina dovolj kislja (pH raztopine < 7) in je koncentracija nitrita vsaj 0,05 M ali več, potem je edini mehanizem, ki poteka pod aerobnimi pogoji, reakcija prve stopnje. Poteče reakcija L-AK z NO, ki je radikal (NO<sup>•</sup>). Za kinetično reakcijo drugega reda lahko označimo tisto, pri kateri pride do močne pospešitve konverzije L-AK, kar je posledica zvišanja kislosti medija. L-AK v kislem mediju hitro reagira z NO in tvori se O-nitrozil askorbinske kisline. Kot rezultat nekaj kasnejših in hitrih korakov konverzije se tvori nestabilna DHAK (Myshkin in sod., 1996). Mehanizem reakcije L-AK z NO<sup>•</sup> v kislem mediju je prikazan na sliki 4 (Myshkin in sod., 1996).



Slika 4: Mehanizem reakcije L-askorbinske kisline z NO v kislem mediju (Myshkin in sod., 1996)

Reakcija je odvisna od pH. To kaže eksperiment z uporabo 0,05 M Tris pufru in dodatkom 0,2 M NaNO<sub>2</sub> pri mejnem pH 7,3. Pri pH < 7,3 je askorbinsko-kislinska reakcija z NO<sup>•</sup> dominantna, medtem ko pri višjih pH postane ta mehanizem nepomemben. Prisotnost nitrita pri skladiščenju zelenjave v kislem mediju močno poveča razpad vitamina C (Myshkin in sod., 1996).

### 2.2.9 Metode določanja

Za določanje vitamina C so sprva uporabljali biološke metode, ki so temeljile na preprečevalnem ali profilaktičnem testu ter na zdravljenju ali kurativnem testu na morskih prašičkih. Dolgotrajne, drage in zapletene biološke metode so zamenjali z bolj uporabnimi kemijskimi, fizikalno kemijskimi, kromatografskimi in encimskimi metodami. Te zagotavljajo natančno, hitrejšo in cenejšo analitiko. Seveda se biološka metoda še vedno uporablja takrat, ko želijo ugotoviti biološko specifičnost in antiskorbutne lastnosti novih izdelkov (Golob, 1987).

Prvo kemijsko metodo za določanje L-askorbinske kisline sta razvila Tillmans in Hirsch leta 1932. Bessey je metodo modificiral leta 1938. To je oksidacijska reakcija z 2,6-diklorfenilindofenolom (ID). L-askorbinska kislina reducira indikator DI, ki se pri tem razbarva. Prebitek indikatorja je v kisli raztopini rožnate barve. Ta metoda je hitra in občutljiva, pomanjkljivosti so v tem, da lahko askorbinska kislina reducira tudi druge snovi (cistein, sulfidi,..), ne določimo oksidirane oblike dehidro-L-askorbinske kisline, vse možne prisotne oksidante moramo prej odpraviti. Pri obarvanih vzorcih je nejasna končna točka titracije, pri vzorcih z nizko vsebnostjo vitamina C je natančnost slabša (Golob, 1987).

Na redukcijski lastnosti L-askorbinske kisline je osnovana tudi jodometrična titracija. To je preprosta in hitra metoda, vendar je potrebno titracijo izvesti čim hitreje, da preprečimo oksidacijo drugih snovi (Golob, 1987).

Naslednja metoda je kolorimetrična. Razvila sta jo Roe in Kuether. Princip te metode je oksidacija askorbinske kisline v dehidroaskorbinskokislino, ki tvori z 2,4-difenilhidrazinom obarvan osazon topen v močni žvepleni kislini. Intenzivnost obarvanega produkta se meri spektrofotometrično (Golob, 1987).

Med sodobnimi metodami dajejo kromatografske metode najbolj zanesljive rezultate, saj omogočajo popolno ločbo L-askorbinske kisline od vseh ostalih spojin, ki motijo reakcijo. V te smeri so razvili postopke s papirno kromatografijo, tankoplastno, tekočinsko in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

Metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti HPLC so razvili številni analitiki. Primerna je za hitro določitev askorbinske kisline kot tudi dehidroaskorbinske kisline. Macrae (1982) je razvil HPLC metodo z elektrokemijskim detektorjem, vendar je uporaben le za askorbinsko kislino. Osnova HPLC metode z UV detektorji in fluorescenčnimi detektorji je reakcija dehidroaskorbinske kisline z o-fenildiaminom. Izmed teh dveh je fluorescenčni detektor bolj občutljiv in zahteva manj vzorca (Golob, 1987).

S HPLC metodo dobimo nekoliko nižje rezultate, kar pripisujejo večji selektivnosti metode. HPLC metoda je hitra, selektivna, visoko občutljiva, zahtevale malo vzorca, primerna je za rutinske analize. Njena pomanjkljivost je v dragi aparaturi (Golob, 1987).

### 2.3 NITRATI

Nitrat je običajna kemična komponenta v naravi, ki je splošno razširjena v zemlji, vodi in hrani (Du in sod., 2007).

V okolju nastaja nitrat v naravnem procesu fiksacije dušika s pomočjo nitrifikacijskih bakterij in s človekovim delovanjem, z uporabo dušikovih gnojil. Relativno velike količine nitrata se lahko pojavijo v zelenjavi, ki je glavni vir nitrata v humani prehrani (Marshall in Trenerry, 1996).

Nitrat je naravno prisoten v različnih živilih. Sadju in zelenjavi, žitaricah, ribah, mleku in mlečnih izdelkih ter v vodi kot posledica gnojenja z dušičnimi gnojili. Nitrat in nitrit sta dovoljena kot aditiva v živilstvu, predvsem za preprečevanje botulizma (Dennis in Wilson, 2003).

### 2.3.1 Izvor nitratov

Zelje potrebuje za svojo rast obilno gnojenje. Z dušikom dognojemo v nitratni in amonijevi obliki. Nitrat je rastlinam hitreje in bolje dostopen, kar je pomembno predvsem pri zgodnejših kultivarjih zelja (Černe, 1997). Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) je najpomembnejši vir minerala dušika (N) potrebnega za rast rastlin v aerobnih tleh (Sun in sod., 2008).

Glavni vir dušika v zemlji predstavlja atmosferski dušik, ki preide v zemljo z vgrajevanjem v organske komponente zemlje v procesu nitrifikacije. Mineralizacija je biokemijski proces, sestavljen iz procesov amonifikacije in nitrifikacije, s katerima prehaja dušik v sestavine zemlje. Pri procesu amonifikacije dušik, ki izhaja v procesih razpadanja plodov in mikrobnih tkiv v obliki  $\text{NH}_3$ , prehaja v  $\text{NH}_4^+$ , ki ga porabijo rastline in mikrobi. Del amonjaka se oksidira v procesu nitrifikacije. Nitrifikacija je proces fermentativne oksidacije amonjaka, ki jo povzročajo nitrifikacijske bakterije. V prvi fazi nastanejo nitriti pod vplivom bakterij, v naslednji fazi pa poteče oksidacija do nitrata. Nitratne bakterije najbolje delujejo pri temperaturi 25-30 °C in pH 6,8-7,3. Potrebujejo dobro prezračeno zemljo in primerno vlažnost. Nitrit se lahko akumulira le v primerih, ko je zemljišče močno alkalno (Cirič, 1986).

Katera oblika dušika bo prevladovala ( $\text{NH}_4^+$  ali  $\text{NO}_3^-$ ) je odvisno od pogojev v zemlji. V zemljiščih z zrelim humusom so pogoji ugodni za tvorbo nitrata, na višjih nadmorskih višinah pa prevladuje amoniakalni dušik. Nitrat in nitrit se slabo absorbirata in se lahko izpirata v vode (Markelc, 2002).

### 2.3.2 Nitrat in nitrit v rastlinah

Na vsebnost nitrata in nitrita vplivajo številni dejavniki, med njimi: osvetlitev (pomanjkanje svetlobe), temperatura (previsoka ali prenizka), talna vlaga (suša ali stoječa voda), oskrba s hranili (pomanjkanje ali preobilica razpoložljivih hranil), struktura in kislost tal, napad boleznih in škodljivcev kot tudi mehanske poškodbe vrtnin, uporaba sredstev za varstvo rastlin (na primer motnje v rasti zaradi uporabe herbicidov, čas setve in pobiranja). Vseh teh dejavnikov pri pridelovanju ni mogoče predvideti, zato vsakoletne količine nitratov in nitritov izredno nihajo. Manjše so v letih, ko imajo rastline izredno dobre razmere za razvoj. Prav tako je količina nitratov odvisna od izbire kultivarjev in od ravnanja s pridelkom po pobiranju (Černe in sod., 1997).

Dušik v obliki nitrata je primarni vzrok za nitratno akumulacijo v rastlinah. Presežek nastane zaradi prekomernega gnojenja predvsem z gnojili v nitratni obliki, ki jih rastline zlahka asimilirajo. Količina nitrata, ki je ob določenem času v rastlini, je odvisna od relativne hitrosti absorpcije nitratov s koreninami in redukcije nitrata v celicah rastline zaradi sinteze beljakovin. Če je hitrost absorpcije nitrata večja od hitrosti sinteze beljakovin, se nitratni akumulirajo. Nitratni so v različnem sadju in zelenjavi različno

razporejeni, predvsem zaradi različne fiziologije rastlin. Sinteza lastnih proteinov poteka v listnih delih rastlin, zato je vsebnost nitrata v steblih, listnih pecljih ter listnih žilah večja. V koreninskem delu rastline količina nitrata zelo varira. Vsebnost nitrata je odvisna od vrste sadja in zelenjave. Zelenjava, ki raste tik nad zemljo, vsebuje več nitrata kot ostala zelenjava (Markelc, 2002).

Černe in sod. (1997) navaja količino nitrata pri biološkem pridelovanju zelja kultivarja kranjsko okroglo 74,8 mg/kg pred in 69,6 mg/kg po skladiščenju. Kultivar emona je vseboval nitrata 60,9 mg /kg pred in 53,1 mg/kg po skladiščenju. Pri integralnem pridelovanju je bilo pri kultivarju kranjsko okroglo pred skladiščenem 85,6 mg/kg  $\text{NO}_3^-$  in 69,6 mg/kg po njem in v kultivarju emona 59,5 mg/kg pred skladiščenjem in 39,2 mg/kg po njem. Pri intenzivnem pridelovanju je bilo pri cv. kranjsko okroglo 60,2 mg/kg pred in 44,6 mg/kg po skladiščenju in pri cv. emona 54,4 mg/kg pred in 86,6 mg/kg po skladiščenju.

Markelc (2002) na osnovi dobljenih rezultatov ugotavlja, da je vsebnost nitrata v zelju zelo odvisna od kultivarja zelja, razlike so tudi znotraj rastline. Zelju cv. Caid so določili v vretenu pred skladiščenjem dva krat več nitrata kot v cv. Guard. V listih pa je bila količina nitrata v primerjavi z vretenom tri do pet krat manjša.

Kontaminacija zelenjave z nitratom nastane, ko ga rastlina absorbira več kot ga potrebuje za rast. Špinača, endivja, brokoli, zelje, redkev, pesa, itd. imajo tendenco, da akumulirajo nitrat (Prasad in Chetty, 2008).

Raziskava na repi, zelju in špinači je pokazala, da so rastline dosegle optimalno rast pri 0.3 gNkg<sup>-1</sup> zemlje, količina nitrata je bila v koreninah svežega zelja 32,16  $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1}$ , v stebelu 82,24  $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1}$ , v listih 30,19  $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1}$ . Nitrat na celotno rastlino je znašal 61,98  $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1}$ . Visoke količine nitrata delujejo na rastlino toksično (Chen in sod., 2004).

Prasad in Chetty (2008) poročata o znatnih razlikah pri določanju količine nitrata v različnih vzorcih enake zelenjave. Zelenjava z višjo vsebnostjo nitrata kaže manjše razlike med vzorci. Vsebnost nitrata v zelju, endiviji, zeleni in kitajskem zelju se giblje med 1297 do 5658 mg kg<sup>-1</sup>. Kitajsko zelje ima višje vsebnosti nitrata.

Vnos in razporeditev nitrata v rastlinah je pomembna tako za vprašanje okolja kot kvalitete pridelka. Zaloga nitrata v zemlji ima pomemben vpliv na akumulacijo v rastlini. S povečevanjem zalog v zemlji se povečuje količina nitrata v različnih delih rastline razen v koreninah. Raziskave različnih vrst listnate zelenjave so pokazale skupne značilnosti. Največ nitrata vsebujejo pecelj in steblo rastline, najmanj pa korenine (Chen in sod., 2004).

Poleg genetskih faktorjev vplivajo na akumulacijo tudi rastni pogoji. Dušik se absorbira v obliki nitrata, ki se postopoma reducira s pomočjo nitrat-reduktaze, nitrit-reduktaze glutamin-sintaze in glutamat-sintaze. Neenakomerna porazdelitev nitrata v posameznih delih rastline je posledica različne količine nitrata in encima nitrat-reduktaze v celicah (Du in sod., 2007). Glede na vsebnost nitrata so bile različne vrste zelenjave razporejene v pet razredov, ker prikazuje spodnja preglednica 3 (Santamaria, 2006).

Preglednica 3: Klasifikacija zelenjave glede na vsebnost nitrata (mg/kg svežega vzorca) (Santamaria, 2006 )

Vsebnost nitrata (mg/kg)	Vrste zelenjave
Zelo nizka (<200)	Artičoke, beluši, bob, jajčevce, česen, čebula, grah, gobe, paradižnik, lubenica
Nizka (200-500)	Brokoli, korenček, cvetača, kumare, cikorijski, radič
Srednja (500-1000)	Zelje, brokoli, koper, repa
Visoka (100-2500)	Kitajsko zelje, endivja, por, koleraba
Zelo visoka (>2500)	Zelena, solata, špinata, rdeča pesa

### 2.3.3 Vpliv tehnološke obdelave živil na vsebnost nitrata

Živila, predvsem sveže sadje in zelenjava so pred in po zaužitju lahko podvržena določenim tehnološkim postopkom. Začetni postopki pri pripravi živila ter tehnike priprave in toplotne obdelave vplivajo na količino nitrata in nitrita, ki ga zaužijemo v pripravljem živilu (Leszczyńska in sod., 2009).

Raziskava nekaterih vrst zelenjave iz družine križnic je pokazala naslednje. Začetna priprava živil, pranje, lupljenje ter termična priprava lahko vplivajo na količino nitrata, ki ga nato zaužijemo. Blanširanje, kuhanje in zamrzovanje sveže zelenjave – vsi ti tehnološki procesi so povzročili znatno znižanje nitrata v živilih (Leszczyńska in sod., 2009). Vpliv nekaterih postopkov prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Spremembe v vsebnosti nitrata v zelenjavi zaradi vpliva tehnoloških postopkov priprave (Leszczyńska in sod., 2009)

Vrsta zelenjave	Vsebnost nitrata (mg/kg)			
	Sveža zel.	Blanširanje	Kuhanje	Zamrzovanje
Kodrasti ohrovt	302,0	61,9	59,1	153,5
Brokoli	277,7	94,3	115,1	89,5
Bela cvetača	171,2	47,6	108,9	134,7
Zelena cvetača	61,0	37,9	55,7	31,8
Brstični ohrovt	37,6	18,1	6,78	28,7

Pri shranjevanju v hladilniku poteka mikrobiološka redukcija nitrata v nitrite, v stanju globoke zamrznjenosti ti procesi ne potekajo. Izguba nitrata po 7 dneh skladiščenja v zamrznjenem stanju so znašale od 2,02 % (kitajsko zelje) do 10,94 % (belo zelje). Manjše izgube lahko pripišemo delovanju bakterij v času ko vzamemo vzorce iz skrinje do obdelave (Prasad in Chetty, 2008).

Blanširanje povzroči značilno večje izgube v primerjavi s kuhanjem vendar te razlike razen pri zeleni cvetači niso pomembne. Sklepamo lahko da so posledica izpostavljenosti daljši čas v vodi in visoki temperaturi, kar povzroči prodor vode v tkiva in s tem povečanje mase.



Pri blanširanju se je količina nitrata znižala od 35-72 %, največ pri ohrovtu, na proces ima vpliv tudi temperatura (Leszczyńska in sod., 2009).

Kuhanje zmanjša vsebnost nitrata v zelenjavi saj je nitrat topen in prehaja v tekočino. Največje izgube so pri zeleni (59,14 %), najmanjše pri zelju (46,69 %) (Prasad in Chetty, 2008).

Leszczyńska in sod. (2009) navaja, da se po 48-urnem zamrzovanju blanširane zelenjave količina nitrata v brokoliju in zeleni cvetači ni spremenila. Pri daljšem zamrzovanju po 4 mesecih se je koncentracija nitrata v ohrovtu znižala za 14 %, v brokoliju 79 % v primerjavi z blanširanim.

### 2.3.4 Nitrat in nitrit v človeškem metabolizmu

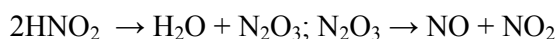
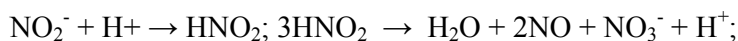
Vnos nitrata v človeški prehrani je večinoma preko zelenjave, vode in dodatkov v mesnih izdelkih. Okrog 87 % celotne koncentracije nitrata v normalni prehrani prihaja iz zelenjave (Prasad in Chetty, 2008).

Dovoljena vrednost za vnos nitrata ADI (acceptable daily intake) je bila določena 0-0,37 mg kg<sup>-1</sup>, običajno se ta vrednost preseže za 15 % pri odraslih in celo do 45 % pri otrocih (Du in sod., 2007).

Za zdravstvo je glavno vprašanje povezava med nitratom in rakom na želodcu. Nitrati sodelujejo pri nastajanju kancerogenih nitrosaminov. Dvig želodčnega pH več kot 5,5 povzroči rast bakterij, ki jim sledi hitra pretvorba nitrata v nitrit. Nitrit je prekurzor pri nastajanju nitrosaminov (Prasad in Chetty, 2008).

Mehanizem delovanja v človeškem telesu je sledeč. Ker prihaja zelenjava v telo preko požiranja, je pretvorba nitrata v nitrit v ustih še posebno pomembna. Hrbtna stran jezika skriva specializirano bakterijsko floro anaerobnih nitrat reducirajočih bakterij, ki lahko hitro reducirajo nitrat v nitrit. To dejstvo nam dokazujejo rezultati, ko je ob uporabi antibiotikov ta proces zavrt (Du in sod., 2007).

Zaradi pomanjkanja nitrit reduktaze ustni votlini se nitrit pretvori v različne nitrozne komponente v želodcu. Glavna produkta sta NO in N-nitrozo spojine. Pretvorba v NO za nastajanje NO v človeškem telesu ločimo endogeno in eksogeno pot. Nitrit, ki nastane v ustih se lahko spremeni v kislino na dva načina: direktna acidifikacija v kislem okolju okrog zob zaradi delovanja mikroorganizmov ali bolj pomembna, acidifikacija v kislem okolju želodca. Nitrit se pretvori dušikovo kislino, ki je nestabilna in razpade na različne dušikove komponente. Najpomembnejši produkt je dušikov oksid (NO) . Slika 5 prikazuje celoten poces (Du in sod., 2007).



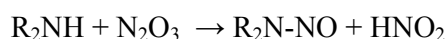
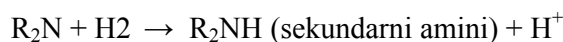
Slika 5: Pretvorba nitrita v NO in NO<sub>2</sub> v želodcu (Du in sod., 2007)

Ker NO nastaja iz nitrata v hrani lahko ta proces definiramo kot eksogena pot. Iz raziskav je razvidno, da se koncentracija nastalega NO v želodcu lahko poveča z večjim vnosom nitrata, obratno se lahko zmanjša v primeru oslabele kislosti v želodcu. Poročila raziskav kažejo tudi na to, da obstaja povezava med nastajanjem NO in količino nitrata v plazmi, v tem primeru predstavlja nitrit zalogo za nastajanje NO. K povečanem nastajanju NO v želodcu pripomorejo reducirajoče snovi kot sta askorbinska kislina in reducirani tioli, ki so tam prisotni. Ti procesi so zelo kompleksni, končni produkti so odvisni od različnih začetnih koncentracij, pH in oksidativno-redukcijskega potenciala (Du in sod., 2007).

Visoke koncentracije NO lahko nastajajo v kislem želodcu vendar le približno 10 % NO nastane iz nitrita v slini, kar najverjetneje kaže na to, da obstaja še druga pot nastajanja NO. Smatramo lahko, da je endogeni NO sintetiziran iz L-arginina s pomočjo NO sintetaze. Ta pot je bila imenovana endogena pot (Du in sod., 2007).

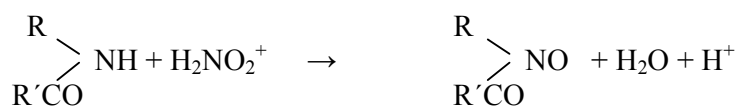
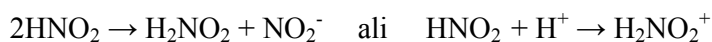
### 2.3.5 N-nitrozo spojine

N-nitrozo spojine vključujejo nitrozamine in nitrozamide. V kislem okolju se nitrit lahko pretvori v aktivne nitrozne agente, kot so dušikov (III) oksid ( $N_2O_3$ ), nitrozil izocianat, nitrozil halid (NOX), in protonirana oblika nitrita ( $H_2NO_2^+$ ). Te komponente se lahko nitrozirajo z sekundarnimi amini v N-nitrozo spojine. Spodnja slika 6 prikazuje reakcije.



Slika 6: Nastajanje nitrozaminov (Du in sod., 2007)

Nitrozacija je reakcija nukleofilne substitucije med sekundarnimi amini in nitrozirnimi sredstvi. Pretvorba do nitrozamida gre najverjetneje preko protonirane oblike nitrita, kar prikazuje slika 7.



amid

nitrozamid

Slika 7: Nastajanje nitrozamidov (Du in sod., 2007)

In vitro poizkusi kažejo, da redukcija nitrata v nitrit v kislem okolju ne poteka zaradi inhibicije delovanja bakterij. Z zmanjšanjem kislosti želodca se poveča delovanje nitrat reducirajočih bakterij in s tem nastajanje nitrata v želodcu ter pretvorba le-tega v nitrozo spojine. To se dogaja pogosto pri ljudeh z boleznimi želodca in starejših ljudeh (Du in sod., 2007).

### 2.3.6 Vpliv nitrata na zdravje

Raziskave vzorcev hrane večkrat pokažejo preveliko vsebnost nitrata in nitrita. Posebna pozornost velja pri pripravi otroške hrane, kjer je potrebno paziti na začetne količine nitrata in nitrita v surovini ter upoštevati posebne higienske ukrepe pri predelavi hrane. Že dolgo je znano, da večje količine teh snovi v organizmu povzročajo poškodbe, saj so toksične. Bolj kot sam nitrat so toksični nitrit in nitrozamini (Černe, 1997).

Svetovna zdravstvena organizacija je izdala priporočila za dovoljen dnevni vnos za nitrat in nitrit ( izražen kot  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ), ki znaša pri 60 kg težki osebi 220 mg za nitrat in 8 mg za nitrit. Te vrednosti ne veljajo za dojenčke mlajše od 6 mesecev, ker so bolj občutljivi na methemoglobinemijo (Mohri, 1993).

Evropska komisija maksimalno količino nitrata, ki jo lahko dnevno zaužijemo določila nekoliko strožje, 0-3,65 mg/kg telesne teže, kar znaša za 60 kg težkega odraslega 219 mg/dan. Nitrit 0-0,06 mg/kg telesne teže, 3,6 mg/dan (Scanlan, 2003).

Raziskave na živalih in epidemiološke študije pri človeku niso pokazale direktnega kancerogenega učinka nitrata. Študije na živalih v daljšem časovnem obdobju so pokazale le, da je nitrat kancerogen le v primeru kombiniranega vnosa z amini in posledično nastanka kancerogenih nitrozaminov (Dennis in Wilson, 2003).

Nitrit lahko ovira prenos kisika v telesu. To stanje je poznano kot methemoglobinemija, kjer je močno zmanjšana sposobnost hemoglobina za prenos kisika (Marshall in Trenerry, 1996). Nitriti oksidirajo  $\text{Fe}^{2+}$  iz hemoglobina  $\text{Fe}^{3+}$ . Nastali methemoglobin nima sposobnosti prenosa kisika in ogljikovega dioksida. Nitrit in NO, ki nastane ob redukciji nitrita, lahko nadomestita kisik v molekuli hemoglobina kar povzroča methemoglobinemijo. Pri dojenčkih lahko to privede do smrti (Prasad in Chetty, 2008).

Prevelike količine nitrata škodujejo. Nitrat znižuje prehransko vrednost živil z negativnim vplivom na dostopnost vitamina A, B vitaminov, joda in proteinov iz živil (Leszczyńska in sod., 2009).

Kancerogeneza je zapleten večstopenjski proces, za katerega je značilna nepovratna sprememba celice, mutacija, ki se nadaljuje z nenadzorovano rastjo tumorja in se neozdravljena konča s smrtjo (Primic-Žakelj, 1997).

Nitrit, ki ga zaužijemo s hrano ali nitrat, ki se pod vplivom bakterij v ustni votlini pretvori v nitrit, lahko v kislih pogojih v želodcu povzroči nastanek nitrozaminov. Zaužit nitrat se hitro absorbira, prenaša se v plazmi in se koncentrira v žlezah slinavkah. Nitrat se izloča z urinom, ledvica ga zadrži 80 %. Ti dve dejstvi dajeta slutiti, da ima nitrat v fiziologiji pomembno vlogo (Dennis in Wilson, 2003).

Problem predstavlja nastajanje kancerogenih N-nitroso spojin v reakciji nitrita z različnimi amini in amidi v živilu (Marshall in Trenerry, 1996).

Nekatere epidemiološke raziskave kažejo, da imajo populacije, ki so izpostavljene visokim koncentracijam nitrata v pitni vodi, povečano ščitnico, čeprav ne moremo izključiti drugih vzrokov. Poskusi na podganah so pokazali, da deluje nitrat v ščitnici kot kompetitivni inhibitor vnosa joda (Dennis in Wilson, 2003).

Dennis in Wilson (2003) navajata izsledke raziskav na finskem, kjer so našli pomembno povezavo med diabetesom tipa 1 in vnosom nitrata pri otrocih in njunih materah. Povezava se ni potrdila ob vnosu nitrata.

Dušikov oksid ima v pomembno vlogo v človekovem metabolizmu. V telesu nastaja iz arginina. V osnovni obliki zagotavlja konstantno vazodilatacijo in preprečuje združevanje in zlepljanje krvnih ploščic ter tako preprečuje visok krvni tlak. NO se sintetizira tudi v centralnem živčnem sistemu, vendar fiziologija delovanja v tkivu še ni pojasnjena (Dennis, Wilson, 2003).

Splošno je nitrat prepoznan kot škodljiv za telo, vendar raziskave v zadnjih letih nakazujejo, da ima nitrat tudi koristne učinke (Du in sod., 2007).

Povečan vnos nitrata v telo med drugim poveča nevarnost nastanka raka, methemoglobinemije, povečanje obščitnične žleze, otroške poliurije in hipertenzije. Epidemiološke raziskave in raziskave na živalih kažejo vpliv kancerogenih N-nitrozo spojin na pojav raka jeter, nasofaringe, raka požiralnika in želodca (Du in sod., 2007).

Mehanizem delovanja nitrozamina in nitrozamida se razlikuje. Nitrozamini so bolj stabilni, zanje ni dokazanega direktnega teratogenega vpliva na tkivo ali celice, vendar produkti razgradnje lahko poškodujejo DNA molekulo. Nitrozamidi so nestabilni pri fiziološkem pH, njegovi produkti razgradnje imajo lahko kancerogene učinke (Du in sod., 2007).

Zadnje raziskave vse bolj ugotavljajo tudi pozitivne učinke nitrata na telo. Ti se kažejo predvsem v delovanju njegovih metabolitov. Nitrat se ne izloči iz telesa takoj temveč kroži v telesu. Reciklira se iz krvi, koncentrira se v žlezah slinavkah in ponovno zakroži v telo preko želodca (Du in sod., 2007).

Pozitivne fiziološke funkcije nitrata so povezane predvsem z metabolitom NO. NO lahko nastaja zaradi eksogenega vnosa nitrata ali endogene sinteze. Študije dokazujejo, da ima NO funkcijo signalne molekule, je učinkovit vazodilatator in inhibitor agregacije krvnih ploščic ali trombocitov. Pomanjkanje NO v telesu lahko privede do pojava ateroskleroze, diabetesa, nizkega krvnega tlaka in bolezni povezanih s koagulacijo krvi. Agregacija in adhezija trombocitov je tesno povezana z boleznimi srca in ožilja. NO, S-nitrozotiol in S-nitrozoglutation, ki nastajajo v telesu v kislem okolju ob prehrani, ki vsebuje tirole, so znani kot inhibitorji agregacije in s tem preprečujejo tromboze (Du in sod., 2007).

Različne raziskave ugotavljajo protimikrobno delovanje metabolitov nitrata vključujoč nitrit, dušikovo (II) kislino in NO. Makrofagi ki so v stiku s toksičnimi produkti bakterij izločajo NO za pospeševanje fagocitoze. Poudarjena je protimikrobna aktivnost metabolitov nitrata pri preprečevanju delovanja patogenih bakterij v prebavnem traktu. Aktivnost se kaže v slabši preživelosti bakterij in vpadu diareje po vnosu nitrata v telo. Nitrate in

njihove metabolite najdemo v znoju človeka, kar deluje kot samozaščitni mehanizem telesa pri preprečevanju kožnih infekcij (Du in sod., 2007).

### **2.3.7 Metode določanja nitrata in nitrita**

Metode določevanja nitrata in nitrita v sveži zelenjavi so pomembne pri odkrivanju ostankov nitrata in nitrita v zelenjavi. Najpogosteje uporabljena metoda za določanje nitrata v rastlinah je spektrofotometrična metoda. Primerna je za hitro določevanje večjega števila vzorcev. Nitrat lahko kvantitativno izločimo iz vzorca s segrevanjem v vodi ali ga ekstrahiramo v alkalnih pogojih. Nitrit določamo po isti metodi, le da izpustimo stopnjo redukcije nitrata v nitrit. Reducirajoče spojine kot askorbinska kislina povzročijo zmanjšanje koncentracije nitrita v raztopini (Lyons in sod., 1991).

HPLC z UV detektorjem je najprimernejša pri določanju nitrata in nitrita v vodah s kmetijskih površin. Je zelo občutljiva, njena prednost je tudi v tem, da lahko hkrati v istem vzorcu določimo obe spojini (Lyons in sod., 1991).

Kapilarna ionska elektroforeza se je izkazala kot dobra alternativa kolorimetričnim testom, primerna je za določanje nitrata in nitrita v različnih živilih. V poskusih se je tiocianat kot interni standard izkazal za najprimernejšega (Marshall, 1996).

Nitrat lahko določamo tudi s pomočjo plinske kromatografije, ki temelji na pretvorbi nitrata do nitrometilena in uporabi 3,4-dimetilnitrobenzena kot internega standarda. Metoda je uporabna v širokem koncentracijskem območju. Približne rezultate za količino nitrata lahko dobimo s hitrim rastlinskim nitratnim testom. Uporaben je pri razredčevanju vzorcev in ugotavljanju potrebe po dognojevanju rastlin. Encimska metoda temelji na redukciji nitrata do nitrita (NADPH je reducent) ob prisotnosti encima nitrat-reduktaze. Količina oksidirane NADPH med reakcijo je sorazmerna količini nitrata. Merimo absorbanco pri 340-365 nm (Lyons in sod., 1991).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Kot vzorčni material smo izbrali zelje cv. Destiny in cv. Caco vzgojeni na poskusnem polju Biotehniške fakultete, Oddelka za agronomijo. Zelje je bilo po večini zdravo, za analizo smo izbrali le najbolj zdrave glave. V tekstu uporabljamo za vegetativni terminalni brst izraz glava zelja. Zelje je bilo pognojeno pred setvijo s 350,0 kg NPK na hektar. Potem pa še enkrat dognojevano s 30 kg dušika (N) na hektar.

#### 3.2 POTEK DELA

Na poskusnem polju Biotehniške fakultete smo vzgojili 4 sorte zelja. Posadili smo 50 sadik vsake sorte v treh gredicah. Vsak kultivar je dosegel optimalno tehnološko zrelost v različnih časovnih obdobjih. Spremljali smo razvoj rastlin in jih pobirali, ko je posamezna rastlina dosegla primerno zrelost. Izbirali smo najlepše in najbolj zdrave glave. Nekaj glav smo takoj porabili za pripravo vzorca ostale smo skladiščili. Zelje smo skladiščili v hladilnici z normalno atmosfero, pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti. Meritve smo opravili na vzorcih brez skladiščenja ter po približno 100 dneh skladiščenja, odvisno od sorte in posameznega vzorca. Homogenizirane vzorce in pripravljene filtrate vzorcev smo shranjevali zamrznjene pri -25 °C. Slika 8 prikazuje pridelovanje zelja na polju Biotehniške fakultete.

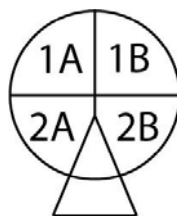


Slika 8: Pridelovanje zelja na poskusnem polju Biotehniške fakultete.

##### 3.2.1 Priprava vzorcev

Da bi ugotovili vpliv skladiščenja na količino in razporeditev L-AK in nitrata v zelju, smo vzorce analizirali takoj po obiranju in po 120-ih dnevih skladiščenja pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti. Za vsak časovni interval smo uporabili 6 glav zelja določenega kultivarja. V določenih časovnih intervalih (0 in 120 dni) smo posamezne glave kultivarja

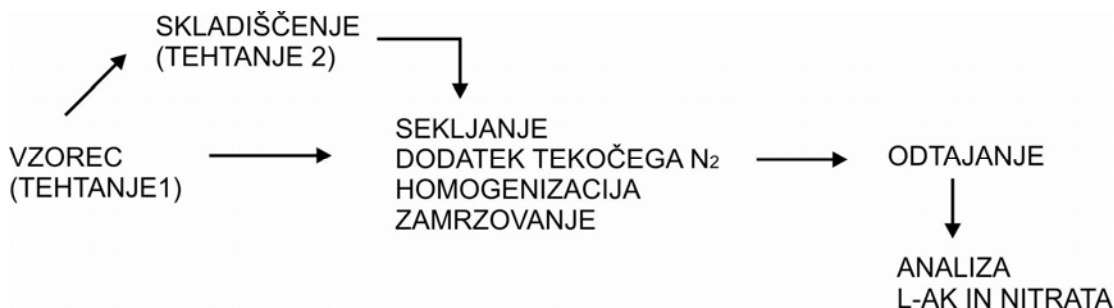
očistili in pripravili na analizo. Vzorcju – zeljni glavi smo odstranili zunanje poškodovane liste ter glavo razdelili na zgornji in spodnji del. Vzorcju smo nato odstranili večji del kocena oz. notranje liste, če so nas zanimali zunanji listi. Na Sliki 9 je razvidno, da smo pri posamezni glavi vedno vzeli po štiri vzorce, in sicer sta 1A in 1B paralelki zgornjega dela, medtem ko sta 2A in 2B paralelki spodnjega dela zelja. Glave določenega kultivarja smo tako označevali naprej po vrstnem redu. Lihe številke so pomenile zgornji del, medtem ko so sode številke pomenile spodnji del. Črki A in B pa sta pomenili paralelki zgornjega oz. spodnjega dela posamezne glave zelja (slika9). Zgornji del zajema večinoma zunanje liste, spodnji pa kocen oz. notranji del zeljne glave.



Slika 9: Skica priprave vzorcev iz zeljne glave. 1A, 1B zgornji del; 2A, 2B spodnji del (A, B sta paralelki).

Posamezne glave določenega kultivarja zelja, ki smo ga imeli namen skladiščiti, smo prej stehali, označili težo in dali na skladiščenje v hladilnico, kjer so bili pogoji normalne atmosfere (1 °C in 80 % relativna vlažnost). Po štirimesečnem skladiščenju smo posamezne glave ponovno stehali ter iz začetne in končne teže po skladiščenju izračunali delež izgube mase.

Vzorcu, vsak del zelja, smo grobo sesekljali, prelili s tekočim dušikom in homogenizirali z laboratorijskim sekljalnikom 30s, pri največji hitrosti. V plastičnih vrečkah smo vzorce zamrznili do nadaljnje analize. Da bi analiza L-AK in nitrata vseh vzorcev potekala v enakih pogojih, smo vzorce dali v PE vrečke, jih označili z ustreznimi oznakami ter jih zamrznili (-25 °C) do nadaljnje analize. Ko so bili vsi vzorci obeh kultivarjev zelja pripravljeni, smo jih odtalili na sobno temperaturo in začeli s postopkom določanja L-AK in nitrata. Slika 10 prikazuje shemo priprave vzorca za nadaljnje analize.



Slika 10: Shema priprave vzorca za nadaljnje analize

### 3.3 ANALITSKE METODE

Pripravo vzorcev in analize vsebnosti L-askorbinske kisline smo opravili v laboratoriju Katedre za tehnologijo rastlinskih živil, Biotehniške fakultete, Oddelka za živilstvo. Uporabili smo metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti HPLC. Analize vsebnosti nitrata pa so bile narejene v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, Biotehniške fakultete, Oddelka za živilstvo. Nitrat je bil določen s spektrofotometrično metodo G-016-91.

#### 3.3.1 Določanje izgube mase med skladiščenjem zelja

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

$$\% \text{ izgubljene mase} = \left( \frac{m_{zač} - m_{konč}}{m_{zač}} \right) * 100$$

$m_{zač}$  .... začetna masa

$m_{konč}$  .... končna masa

... (2)

#### 3.3.2 Določanje nitrata

##### 3.3.2.1 Priprava vzorca

Pred začetkom nadaljnje analize smo homogenizirane vzorce odtalili na sobni temperaturi. V 100 ml časo smo zatehtali 5 g vzorca in ga prelili s 50 g bidestilirane vode s temperaturo 70 °C. Vzorec smo premešali, čašo prekrili z urnim steklom, postavili v vodno kopel in inkubirali 15 minut pri 60-70 °C. Nato smo čaše ohladili na sobni temperaturi in vsebino filtrirali skozi filter papir. Filtrat smo shranili v plastične epruvete z zamaškom in jih zamrznili do končne analize (-25 °C). Ko smo imeli zbrane vse vzorce, smo jih v zamrznjenem stanju prenesli v laboratorij katedre za mikrobiologijo. Pred analizo smo vzorce odtalili na sobno temperaturo in po metodi številka G-016-91 določili količino nitrata v vzorcih. Dobljene rezultate smo preračunali na mg nitratnih ionov na kg zelja.

##### 3.3.2.2 Spektrofotometrično določanje nitrata

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



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

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

$$\gamma [\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{\text{izmerjena vrednost} * (m_{\text{vz}} + m_{\text{H}_2\text{O}})}{1000 \text{ g}} \quad \dots(3)$$

$m_{\text{vz}}$  .... masa vzorca

$m_{\text{H}_2\text{O}}$  ... masa destilirane vode

Izračun nitrata

$$\text{vsebnost nitrata} [\text{mg} / \text{kg}] = \frac{\gamma * 1000 \text{ g}}{5 \text{ g}} \quad \dots(4)$$

### 3.3.3 Določanje L-askorbinske kisline

#### 3.3.3.1 Priprava reagentov za HPLC analizo

##### 3.3.3.1.1 Priprava standarda

Pripravili smo standardno raztopino L-askorbinske kisline (7 mg/100 ml) z 2 % metafosforno kislino. Raztopino smo pripravili v treh razredčitvah. V 100 ml bučko smo zatehtali 7 mg L-AK in dopolnili z 2 % metafosforno kislino do oznake. Drugi standard smo pripravili na ta način, da smo iz prvega standarda odvzeli 50 ml raztopine in mu dodali še 50 ml 2 % metafosforne kisline. Za pripravo tretjega standarda pa smo iz prvega standarda odvzeli 25 ml raztopine, kateri smo dodali še 75 ml 2 % metafosforne kisline. Na ta način smo dobili tri standarde, in sicer S3 (1:1), S2 (1:2) in S1 (1:4). Standarde smo pripravljali tik pred analizo vzorcev.

##### 3.3.3.1.2 Priprava 2 % metafosforne kisline

20 g metafosforne kisline ( $\text{HPO}_3$ ) smo zdrobili v terilnici in dali v 1000 ml bučko ter jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Preden smo jo lahko začeli uporabljati, smo morali dobro premešati, da so se raztopili vsi kristali.

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

Za mobilno fazo smo uporabili fosfatni pufer s pH 2,9. Pripravili smo ga tako, da smo zatehtali 3,4836 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in ga raztopili v destilirani vodi ter v 1 literski bučki dopolnili do oznake. To raztopino smo prelili v litrsko čašo in s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pripravili do pH 2,9.

### 3.3.3.2 Priprava vzorca

V čašo smo zahtevali 10 g homogeniziranega vzorca in ga prelili s 30 g 2 % metafosforne kisline, premešali in inkubirali eno uro na sobni temperaturi. Metafosforno kislino uporabljamo za stabilizacijo L-askorbinske kisline, saj prepreči njeno oksidacijo. Po eni uri smo vzorce filtrirali skozi filter papir in del filtrata prelili v plastične epruvete z zamaškom. Vzorec smo zamrznili (-20 °C) do nadaljnje analize.

Za nadaljnjo analizo smo vzorce pustili odtajati na sobni temperaturi, jih prelili v 2 paralelkah v 1 ml epruvetke - ependorfke in centrifugirali 15 min pri 4000 obratih. Nato smo supernatant filtrirali skozi celulozacetatni filter Millipore 0,45 µm, v steklene vial. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na HPLC aparaturi.

### 3.3.3.3 Kromatografski pogoji

Gradientna črpalka: Maxi Star, Knauer  
Kolona: Sinergie 4 µm C18 / ODS Hydro-RP, 250 x 4.6 mm ID  
Mobilna faza: 20 mM kalijev fosfat, pH 2.9  
Pretek mobilne faze: 0.6 ml/min  
Volumen injeciranja: 20 µl  
Temperatura: sobna  
Detektor: UV-Vis (245 nm)

### 3.3.3.4 Izračun koncentracije L-askorbinske kisline

$$\text{Konc. L - AK v razt. [mg / l]} = \left( \frac{\text{površina vzorca}}{\text{površina standarda}} \right) * \text{konc. standarda} \quad \dots(5)$$

### 3.3.4 Statistična obdelava podatkov

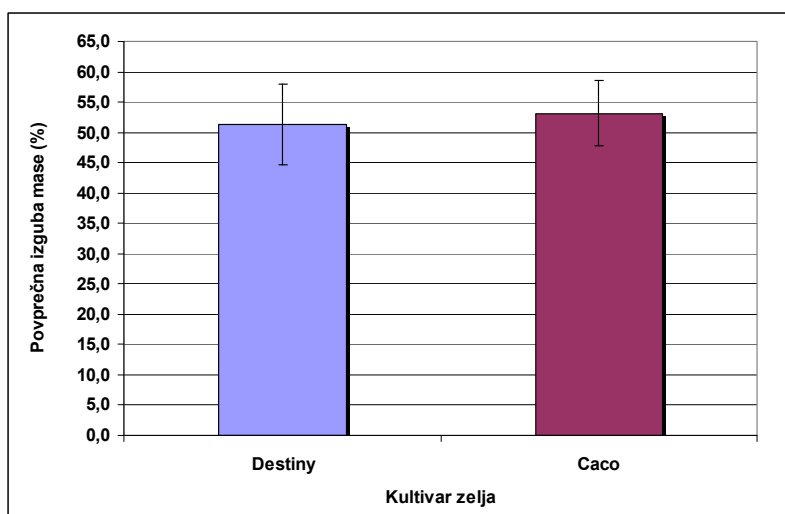
Pri statistični obdelavi podatkov smo preverili homogenost varianc ter s t-testom ovrednotili statistično značilne razlike med povprečnimi vredostmi rezultatov. Izračune smo opravili s pomočjo računalniškega programa SPSS.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZGUBA MASE ZELJA MED SKLADIŠČENJEM

Preglednica 5: Masa pred in po 120 dnevnem skladiščenju ter izguba mase za 6 glav zelja posameznega kultivarja (cv. Destiny in cv. Caco)

Vrsta kultivarja zelja	Masa pred skladiščenjem (g)	Masa po 120 dneh skladiščenja (g)	Izguba mase (%)
<b>cv. DESTINY (6 vzorčnih glav)</b>			
1D	1400,0	600,0	57,1
2D	1540,0	650,0	57,8
3D	1500,0	700,0	53,3
4D	1670,0	800,0	52,1
5D	1300,0	687,5	47,1
6D	1250,0	750,0	40,0
Povprečje			51,2
Standardni odklon (SD)			6,7
<b>cv. CACO (6 vzorčnih glav)</b>			
1C	1000,0	500,0	50,0
2C	1200,0	500,0	58,3
3C	1000,0	562,0	43,8
4C	1400,0	600,0	57,1
5C	1450,0	650,0	55,2
6C	1200,0	550,0	54,2
Povprečje			53,1
Standardni odklon (SD)			5,4



Slika 11: Povprečna izguba mase zelja cv. Destiny in cv. Caco po skladiščenju 120 dni

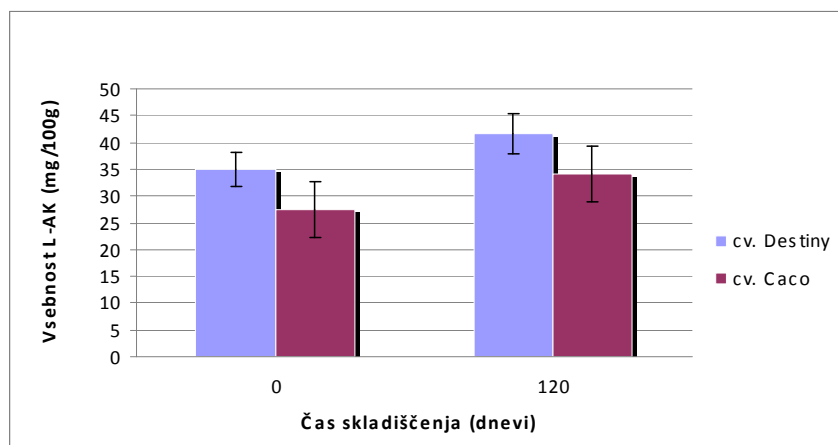
Iz Slike 11 je razvidno, da je povprečna izguba mase pri zelju cv. Destiny po 120 dneh skladiščenja 51,2 % (SD ± 6,7), pri zelju cv. Caco pa je izguba mase 53,1 % (SD ± 5,4). Izguba mase pri posameznih glavah zelja cv. Destiny se po 120 dneh skladiščenja giblje med 40,0 in 57,8 %. Izguba pri zelju cv. Caco se giblje med 43,8 in 58,3 %.

#### 4.2 POVPREČNA VSEBNOST L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU cv. DESTINY IN cv. CACO V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA

Preglednica 6: Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline (L-AK) in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

Čas skladiščenja (dnevi)	Kultivar zelja	
	cv. Destiny (± SD)	cv. Caco (± SD)
<b>L-AK (mg/100 g)</b>		
0	34,9 (±3,1)	27,4 (±5,2)
120	41,6 (±3,7)	34,1 (±5,3)
<b>NITRATI (mg/kg)</b>		
0	122,0 (± 45,6)	38,3 (±20,0)
120	158,1 (± 54,2)	33,0 (±17,6)

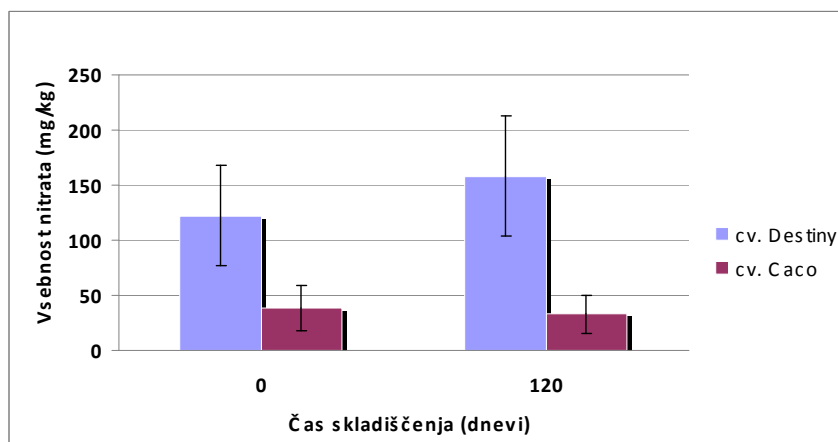
#### 4.2.1 L-askorbinska kislina



Slika 12: Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline (L-AK) v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

Iz slike 12 je razvidno, da se vsebnosti L-askorbinske kisline med kultivarji razlikujejo, vendar so razlike in spremembe v okviru standardne napake. Povprečna vsebnost zajema povprečne vsebnosti zgornjega in spodnjega dela rastline oz. kultivarja. Vsebnost L-askorbinske kisline je v zelju cv. Destiny dokaj konstantna. Pred skladiščenjem je bila povprečna vsebnost 34,9 mg/100 g in se med skladiščenjem le neznatno spreminja, v prvih štirih mesecih naraste za cca. 6 mg/100 g, in sicer na 41,6 mg/100 g na račun izgube vode. Podobna je vsebnost in trend gibanja L-askorbinske kisline v zelju cv. Caco, takoj po obiranju znaša 27,4 mg/100 g, kar je 7,5 mg manj v primerjavi cv. Destiny. S skladiščenjem se znatno ne spreminja, tudi v cv. Caco navidezno naraste in znaša 34,1 mg/100 g.

#### 4.2.2 Nitrat



Slika 13: Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

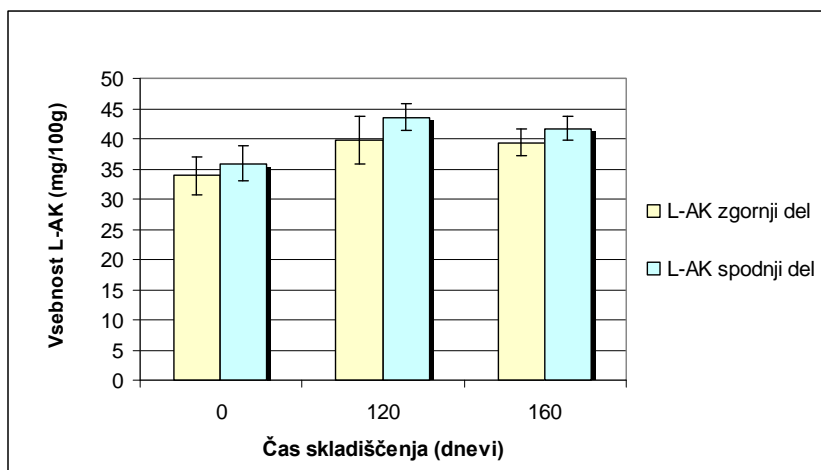
Slika 13 ponazarja primerjavo kultivarjev glede na vsebnost nitrata. Pri izračunu povprečne vrednosti smo upoštevali povprečne vsebnosti nitrata zgornjega in spodnjega dela kultivarja. Iz slike 13 je razvidno, da se vsebnost nitrata med kultivarjema razlikuje. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny znaša takoj po obiranju 122,0 mg/kg. Po 120 dneh skladiščenja naraste na 158,1 mg/kg, kar pomeni, da se je povečala za 23 % zaradi izgube vode. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Caco je nižja, takoj po obiranju znaša 38,3 mg/kg. Po 120 dneh skladiščenja se za razliko od cv. Destiny količina nitrata zniža za 14 %. Po skladiščenju znaša količina nitrata 33,0 mg/kg. Povprečna vsebnost nitrata se je ob povečanju suhe snovi, v zelju cv. Destiny povečala v zelju cv. Caco pa zmanjšala.

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

Preglednica 7: Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

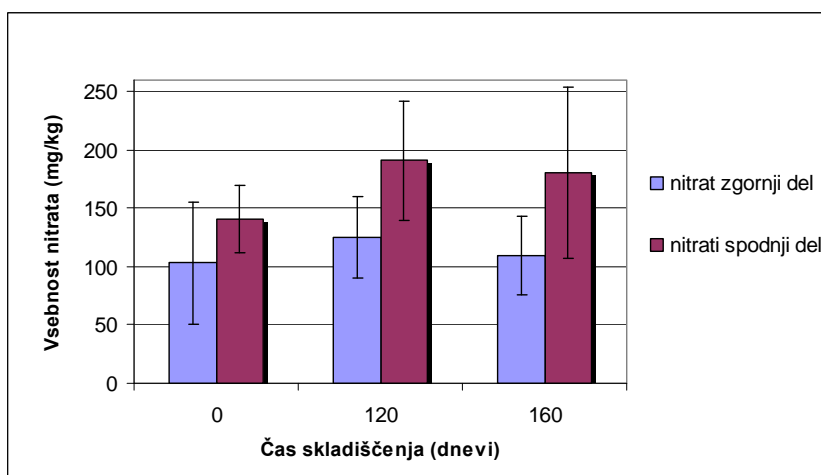
Čas skladiščenja (dnevi)	Kultivar zelja			
	cv. Destiny ( $\pm$ SD)		cv. Caco ( $\pm$ SD)	
	zgornji del	spodnji del	zgornji del	spodnji del
	<b>L-AK (mg/100 g)</b>			
0	33,9 ( $\pm$ 3,1)	35,9 ( $\pm$ 2,9)	28,0 ( $\pm$ 5,5)	26,9 ( $\pm$ 5,0)
120	39,7 ( $\pm$ 3,9)	43,6 ( $\pm$ 2,2)	32,7 ( $\pm$ 5,9)	35,1 ( $\pm$ 5,1)
160	39,4 ( $\pm$ 2,2)	41,1 ( $\pm$ 2,0)	/	/
	<b>NITRATI (mg/kg)</b>			
0	103,2 ( $\pm$ 52,1)	140,8 ( $\pm$ 29,4)	25,9 ( $\pm$ 15,8)	50,8 ( $\pm$ 15,6)
120	125,4 ( $\pm$ 35,3)	190,9 ( $\pm$ 50,9)	20,3 ( $\pm$ 8,0)	43,9 ( $\pm$ 16,4)
160	109,5 ( $\pm$ 34,1)	180,7 ( $\pm$ 73,5)	/	/

### 4.3.1 Cv. Destiny



Slika 14: Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline (L-AK) v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny v odvisnosti od časa skladiščenja

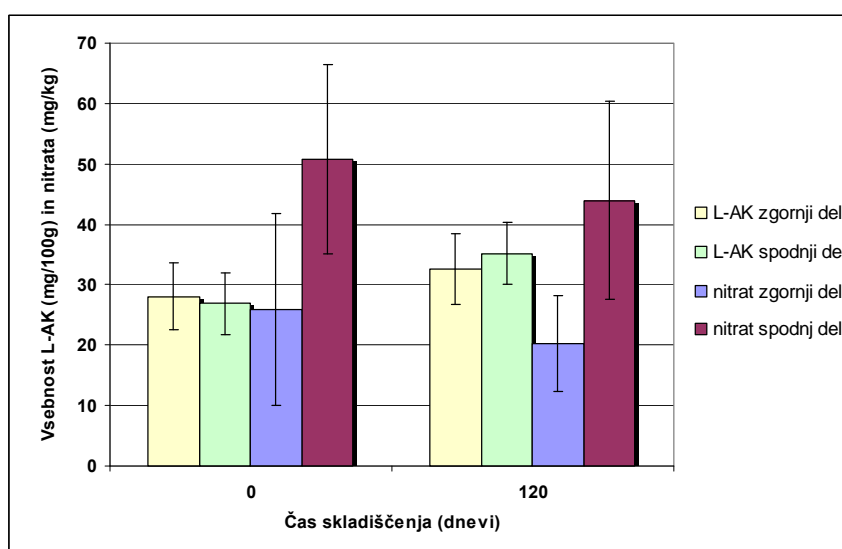
Slika 14 nam prikazuje vsebnost L-askorbinske kisline v zelju cv. Destiny. Iz nje vidimo, da so vsebnosti preiskovanih parametrov med posameznimi deli rastline različne, vendar so v okviru standardne napake. V povprečju je v spodnjem delu več vitamina C kot v zgornjem delu. Količina L-askorbinske kisline takoj po obiranju znaša 33,9 mg/100 g v zgornjem delu rastline in 35,9 mg/100 g v spodnjem delu glave vzorca. Razlika je zelo majhna, (5 %) in se med skladiščenjem bistveno ne spreminja. Zaradi dobre obstojnosti kultivarja smo opravili analize tudi po 160 dneh skladiščenja. Vsebnost L-askorbinske kisline se z daljšim skladiščenjem prične nižati, vendar razlike še vedno niso velike. Zaradi velikih sprememb v vsebnosti vode so te spremembe navidezne. Po 160 dneh znaša vsebnost L-askorbinske kisline 39,4 mg/100 g v zgornjem in 41,1 mg/100 g v spodnjem delu glave zelja.



Slika 15: Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny v odvisnosti od časa skladiščenja

Količina nitrata je, kot je razvidno iz slike 15, višja v spodnjem delu rastline. Vsebnost v zgornjem delu znaša 103,2 mg/kg, v spodnjem delu so vsebnosti višje, ob obiranju znaša vsebnost nitrata 140,8 mg/100 g. Takoj po obiranju, je razlika v vsebnosti nitrata med notranjim in zunanjim delom rastline cca. 37 mg/kg oz. 27 %. S skladiščenjem se poveča vsebnost nitrata in tudi razlika med zunanji in notranjim delom, podoben trend se pojavi po 160 dneh. V zgornjem delu se po 120 dneh količina nitrata poveča in znaša 125,4 mg/kg v spodnjem delu glave vzorca pa 190,9 mg/kg. Razlika med zgornjim in spodnji delom je 34 %. V spodnjem delu se količina nitrata poveča za 26 %. Z nadaljnjim skladiščenjem se vsebnosti pričnejo nižati. Po 160 dneh se vsebnost nitrata zniža za 5 % in znaša v spodnjem delu rastline 180,7 mg/kg.

### 4.3.2 Cv. Caco



Slika 16: Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline (L-AK) in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

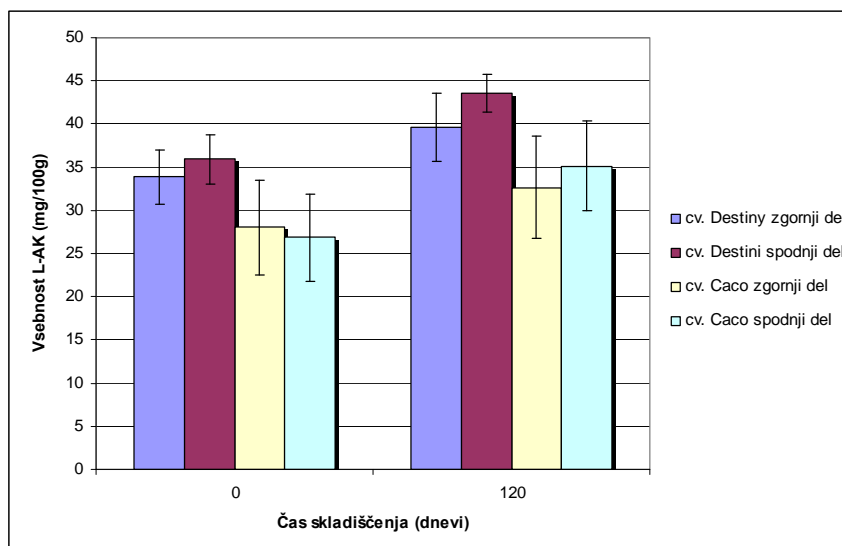
S slike 16 so razvidne razlike v količini merjenih parametrov med posameznimi deli rastline v kultivarju cv. Caco. L-askorbinska kislina ima v obeh delih rastline podobne vsebnosti, in sicer 28,0 mg/100 g zgornji in 26,9 mg/100 g spodnji del. S skladiščenjem navidezno naraste, predvsem v spodnjem delu in sicer za 2,4 mg, na račun izgube vode. Po 120 dneh smo določili vsebnost L-askorbinske kisline 35,1 mg/100 g. Razlike med zgornjim in spodnjim delom so v okviru standardne napake.

Povprečno je v spodnjem delu rastline več nitrata kot v zgornjem delu. Povprečna količina nitrata v zgornjem delu znaša 25,9 mg/kg pred in 20,3 mg/kg po skladiščenju. V notranjem delu rastline kjer je več nitrata smo ga določili ob obiranju 50,8 mg/kg po 120 dneh skladiščenja pa se vsebnost zniža na 43,9 mg/kg. Količina nitrata se s skladiščenjem znižuje, v našem primeru se je v zgornjem delu znižala za 22 % v spodnjem pa za 14 % od začetne vsebnosti.



#### 4.4 PRIMERJAVA ZGORNJEGA IN SPODNJEGA DELA ZELJA cv. DESTINY IN cv. CACO GLEDE NA POVPREČNE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA

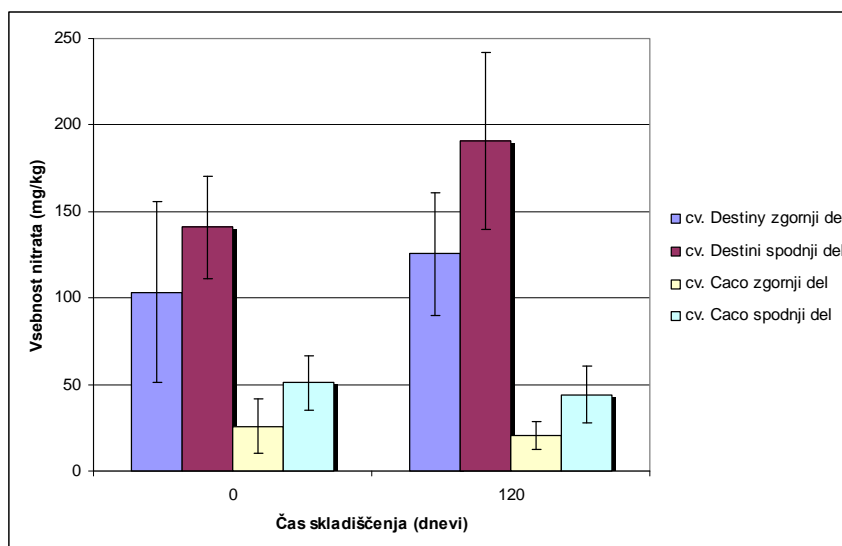
##### 4.4.1 L-askorbinska kislina



Slika 17: Primerjava povprečnih vsebnosti L- askorbinske kisline (L-AK) v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

Glede vsebnosti L-askorbinske kisline (slika 17) med sortama ni velikih razlik. Vsebnosti se gibljejo med 26,9 in 43,6 mg/100 g. Pri sorti cv. Destiny je vsebnost večja v spodnjem delu rastline. Razlika med zgornjim in spodnjim delom se tekom skladiščenja ohranja, obe vsebnosti narasteta za približno 6-8 mg. Pri zelju cv. Caco je pred skladiščenjem večja vsebnost L-askorbinske kisline v zgornjem delu zeljne glave, ki vsebuje več zunanjih listov. Majhna razlika, pod 2 mg/100 g, se med skladiščenjem izniči in po 120 dneh je vsebnost L-askorbinske kisline večja v spodnjem delu rastline, kjer doseže vsebnost 35,1 mg/100 g. Prav tako naraste količina v zgornjem delu, tako ostaja neznatna razlika pod 3 mg/100 g. Zaradi več kot 50 % izgube vode med skladiščenjem so spremembe, izgube ali povečanja le navidezna.

#### 4.4.2 Nitrat



Slika 18: Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Destiny in cv. Caco v odvisnosti od časa skladiščenja

S primerjavo sort (slika 18), ugotovimo, da je med sortama zelja cv. Destiny in cv. Caco velika razlika v vsebnosti nitrata. Podobni sta si v tem, da vsebujeta večje količine nitrata v notranjosti zeljne glave, razlikujeta pa se v količini le-teh. Zelje sorte Destiny vsebuje znatno več nitrata, in sicer 103,2 mg/kg v zgornjem in 140,8 mg/kg v spodnjem delu. Količina se v prvih 120 dneh skladiščenja zaradi izgube vode še nekoliko poveča, in sicer za 37,6 mg/kg v zgornjem in za 50,1 mg/kg v spodnjem delu. Sorta Caco vsebuje ob času obiranja 25,9 mg/kg v zgornjem in 50,8 mg/100 g v spodnjem delu glave vzorca. Razlika se s skladiščenjem ohranja, vendar se količina zmanjša na 20,3 mg/kg oziroma 43,9 mg/kg. Razlika med sortama v količini nitrata v spodnjem delu zeljne glave pri svežem neskladiščnem zelju znaša 64 %.

## **5 RAZPRAVA IN SKLEPI**

### **5.1 RAZPRAVA**

#### **5.1.1 Izguba mase med skladiščenjem zelja cv. Destiny in cv. Caco**

Oba preiskovana kultivarja zelja cv. Destiny in cv. Caco sta pokazala podobnosti pri izgubi mase med skladiščenjem. Povprečna izguba mase je pri zelju cv. Destiny znašala po 120 dneh skladiščenja 51,2 % pri zelju cv. Caco pa je izguba mase nekoliko manjša, in sicer 53,1 %. Tudi izguba v posameznih glavah je primerljiva, ta se giblje med 40,0 in 57,8 % pri zelju cv. Destiny in med 43,8 % in 58,3 % pri zelju cv. Caco. Podatki iz literature kažejo nekoliko nižje izgube mase. Močnik (2009) navaja za kultivarja cv. Delphi in cv. Hinova, ki sta rasla v enakih pogojih, izgube 24,7 % in 35,6 %. Tudi Baloh (2002) navaja izgube mase pri skladiščenju kitajskega zelja okrog 30 %.

Markelc (2002) je ugotavljala vpliv skladiščenja kitajskega kapusa brez embalažnega materiala in ugotovila, relativno velike izgube mase. Vsak mesec je kapus izgubil 10 % mase, kar je po treh mesecih skladiščenja naraslo na 30 % izgubo mase. Kot vidimo na izgube vpliva čas skladiščenja pa tudi pogoji skladiščenja predvsem temperatura in relativna vlažnost.

Glede na primerjavo s kultivarjema cv. Delphi in cv. Hinova, ki sta bila pridelana in skladiščena v enakih pogojih, lahko sklepamo, da je izguba mase odvisna tudi od kultivarja zelja. Večina izgube je posledica izgube vode na kar nakazujejo tudi vidne morfološke spremembe.

#### **5.1.2 Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco glede na čas skladiščenja**

##### **5.1.2.1 L-askorbinska kislina**

Vsebnost L-askorbinske kisline se med kultivarjema razlikuje, vendar so razlike v okviru standardne napake. V vsebnosti L-askorbinske kisline je v zelju cv. Destiny ne prihaja do velikih sprememb. Pred skladiščenjem je bila povprečna vsebnost 34,9 mg/100 g. Med skladiščenjem navidezno naraste na 41,6 mg/100 g zaradi izgube vode. Vsebnost L-askorbinske kisline v zelju cv. Caco ni bistveno drugačna, takoj po obiranju znaša 27,4 mg/100 g, kar je manj v primerjavi s cv. Destiny. S skladiščenjem se znatno ne spreminja, tudi v cv. Caco naraste za 6,6 mg /100 g in znaša 34,1 mg/100 g. Iz podatkov lahko sklepamo, da je vsebnost L-askorbinske kisline odvisna od kultivarja zelja. Med skladiščenjem prihaja med obema cv. do minimalnih razlik. Zaradi izgube vode in s tem povečanja suhe snovi, vsebnost L-AK v 100 g vzorca ostaja enaka oz. rahlo naraste.

Pri primerjavi s podobnimi raziskavami ugotavljamo, da so vsebnosti za vsebnost L-askorbinske kisline podobne oz. znotraj omenjenih mej. Černe (1998) navaja vsebnosti vitamina C od 30-60 mg/100 g za belega zelja, v drugem delu Černe in Vrhovnik (1992) navajata podatek s širšim razponom vsebnosti vitamina C in sicer 20-100 mg/100 g belega zelja. Garjetović (2006) navaja vsebnosti za cv. Destiny 37,5 mg/100 g in za cv. Caco 57,0

mg/100 g. V slednji raziskavi je vsebnost v cv. Destiny zelo podobna našim meritvam, medtem ko je vsebnost v cv. Caco nekoliko višja.

Variabilnost vitamina C v sveži zelenjavi se razlikuje glede na lokacijo pridelave, variabilnost rezultatov pripisujemo zlasti vplivu kultivarja in stopnji svežosti (Kobovc, 2000). Rezultati analize 18 kultivarjev zelja na vitamin C kažejo, da količina niha od 5,66 do 23,5 mg/100 g svežega zelja (Singh in sod., 2006), kar potrjuje variabilnost zaradi različnih kultivarjev in pogojev rasti. Našima vzorcema smo izmerili nekoliko več C vitamina, vendar so razlike zelo majhne, kar je lahko tudi posledica prej omenjenih vplivov.

Sklepamo lahko, da so razlike v vsebnosti L-askorbinske kisline posledica različnih kultivarjev, vremenskih razmer in podnebja ter različnega načina pridelave. Pri spremembah vsebnosti L-askorbinske kisline moamo upoštevati, da prihaja do izgube mase in posledično do kopičenja vseh metabolitov.

Pri obeh kultivarjih se je vsebnost L-askorbinske kisline v vzorcu, ob upoštevanju izgube vode, med skladiščenjem povečala. Proti koncu skladiščenja se vsebnost C vitamina v belem zelju poveča, kar utegne odražati pripravo rastline na ponovno rast (Hounsome in sod., 2009). Pri skladiščenju malo nad 0 °C in 80 % relativni vlažnosti, po določenem času spečega stanja, v rastline pride do povečane stopnje metabolizma, pomladitve, ponovne rasti in brstenja, saj je zelje dvoletna rastlina. Močnik (2009) navaja pri cv. Delphi porast vsebnosti L-askorbinske kisline med skladiščenjem za 33 %, medtem ko se je vsebnost pri cv. Hinova znižala za 21 %. Padec povežujemo s splošnimi izgubami antioksidantov med skladiščenjem.

Različni avtorji ugotavljajo pomen temperature pri skladiščenju zelja. Temperatura po obiranju zelja je najpomembnejši faktor za ohranjanje vitamina C v sadju in zelenjavi. Izgube so povečane pri shranjevanju pri visokih temperaturah in daljšem času (Seung in Adel, 2000). Favell (1998) navaja, da se pri zamrznjenem brokoliju ali shranjevanju na nizkih temperaturah ohranja 80 % C vitamina, medtem ko je brokoli shranjen na sobni temperaturi že po 7 dneh ohranil le še 44 % C vitamina. Pri shranjevanju zelenjave iz družine križnic avtorji navajajo minimalne izgube C vitamina. To povežujejo z visoko vsebnostjo skupnega žvepla in glutationa. Slednji je vpleten v mehanizme odgovorne za redukcijo DHA do AA v križnicah (Seung in Adel, 2000).

#### 5.1.2.2 Nitrat

Pri ugotavljanju vsebnosti nitrata vidimo, da so med med kultivarjema velike razlike. Zelje cv. Destiny vsebuje 68 % več nitrata kot cv. Caco. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny znaša takoj po obiranju 122,0 mg/kg, v zelju cv. Caco je nižja, takoj po obiranju znaša 38,3 mg/kg. Po 120 dneh skladiščenja smo v cv. Destiny izmerili 158,1 mg/kg. Zaradi izgube mase in povečevanja suhe snovi lahko govorimo le o tendenci naraščanja. Cv. Caco akumulira štiri do pet krat manj nitrata. Povprečna vsebnost se po 120 dneh skladiščenja za razliko od cv. Destiny zniža. Ugotovili smo minimalno razliko ob več kot 50 % izgubi mase in veliki standardni deviaciji. Razlika v spremembi količine nitrata v cv. Caco ni statistično značilna. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny

kaže med skladiščenjem tendenco naraščanja pri cv. Caco ni opziti te tendence. Razlika v vsebnosti nitrata med kultivarjema je narasla iz 83,7 mg/kg pred na 125,1 mg/kg po skladiščenju.

Iz literature vidimo, da posamezni avtorji navajajo zelo različne vsebnosti nitrata. Iz tega lahko sklepamo, da vsebnost nitrata med posameznimi sortami in tudi med istimi sortami zelenjave zelo niha. Prasad in Chetty (2008) poročata o znatnih razlikah pri določanju količine nitrata v različnih vzorcih enake zelenjave. Vsebnost nitrata v zelju, endiviji, zeleni in kitajskem zelju se giblje med 1297 do 5658 mg kg<sup>-1</sup>. Černe in sod. (1997) navajajo količino nitrata pri integriranem pridelovanju pri kultivarju Kranjsko okroglo pred skladiščenem 85,6 mg/kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in 69,6 mg/kg po njem in v kultivarju Emona 59,5 mg/kg pred skladiščenjem in 39,2 mg/kg po njem. Pri intenzivnem pridelovanju je bilo pri cv. Kranjsko okroglo 60,2 mg/kg pred in 44,6 mg/kg po skladiščenju in pri cv. emona 54,4 mg/kg pred in 86,6 mg/kg po skladiščenju. Močnik (2009) navaja vsebnost nitrata v kultivarju Delphi 127,5 mg/kg pred in 161,9 mg/kg po skladiščenju in v cv. Hinova 36,7 mg/kg pred in 2,5 mg/kg po skladiščenju. V cv. Delphi količina nitrata naraste v cv. Hinova pa se zniža. Tudi Markelc (2002) na osnovi dobljenih rezultatov ugotavlja, da je vsebnost nitrata v zelju zelo odvisna od kultivarja zelja.

Kultivarja cv. Destiny in cv. Caco sta rasla v enakih pogojih kot cv. Delphi in cv. Hinova. Nizka vsebnost nitrata v teh kultivarjih je lahko posledica večih dejavnikov. Vpliv ustreznih kultivacijskih tehnik in ugodnih klimatski pogojev. Razpoložljive je bilo dovolj svetlobe, saj so bili so bili dnevi zelo dolgi. Temperature so bile ugodne za rast (marec-avgust), zato je bila akumulacija nitrata nizka. Oskrba z dušikom je bila ustrezna, saj ni prišlo do velike akumulacije nitrata, ampak so iz večjega dela dušika, ki ga je zelje sprejelo, nastajali proteini. Pomemben dejavnik za nizko vsebnost nitrata je bil tudi čas pobiranja, ki je v obdobjih sončnega in suhega vremena.

Preveč vlage, premalo svetlobe in previsoke temperature povzročijo, da se dušik, ki ga rastlina sprejme, ne vgrajuje v beljakovine, ampak ostaja v celičnem soku kot nitratni ion (Černe in Vrhovnik, 1992). Vseh dejavnikov, ki vplivajo na akumulacijo nitrata, pri pridelovanju ni mogoče predvideti, zato vsakoletne količine nitrata in nitrita izredno nihajo, manjše so v letih, ko imajo vrtnine izredno dobre razmere za razvoj (Černe in sod., 1997).

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

#### **5.1.3.1 Cv. Destiny**

Vsebnost L-askorbinske kisline v zelju cv. Destiny ne kaže večjih sprememb. Vsebnosti v posameznih glavah se gibljejo med 35 in 40 mg/100 g. S skladiščenjem se ohranjajo ali malo povečajo. Tudi med zgornjim in spodnjim delom rastline ni večjih razlik vendar so prisotne. Vsebnost v spodnjem delu rastline je v posameznih zeljnih glavah 2 do 4 mg/100 g večja kot v zgornjem delu. Če ne upoštevamo nehomogenih varianc lahko govorimo o

minimalnih statistično značilnih razlikah znotraj posamezne glave vzorca. S skladiščenjem se razmerje v količini L-askorbinske kisline med spodnjim in zgornjim delom rastline ohranja. Statistično značilne razlike ugotavljamo tudi med vsebnostjo L-AK med 0 in 120 in med 0 in 160 dnevi tako za zgornji kot za spodnji del glave.

Ugotavljali smo vsebnost nitrata v različnih delih rastline, v zgornjem in spodnjem delu glave. Vsebnost nitrata je v notranjih listih oz. v spodnjem delu zeljne glave večja kot v zgornjem delu, kjer je več zelenih listov. Razlika je statistično značilna ob vseh treh časih skladiščenja. Tako smo določili v spodnjem delu posameznih glav 140-190 mg/kg, kar je približno 27 % več kot v zunanjem delu. Statistično značilna je tudi razlika med notranjim delom ob obiranju in po 120 dneh skladiščenja.

Glave zelja so bile zelo kakovostne, saj so se tudi med skladiščenjem zelo lepo ohranile. Pri tem kultivarju smo določili vsebnosti preiskovanih parametrov tudi po 160 dneh skladiščenja.

#### 5.1.3.2 Cv. Caco

Količina L-askorbinske kisline je v vseh preiskovanih delih rastline podobna. Razlike so minimalne in znašajo do 2 mg/100 g. Kultivar Caco se razlikuje po tem, da je ob obiranju več L-askorbinske kisline v zgornjem delu rastline kjer je več zelenih listov. Razlika je bila minimalna, s skladiščenjem se je izničila. Po 4 mesecih skladiščenja smo določili več L-askorbinske kisline v spodnjem delu rastline. Količina je narasla v obeh delih rastline, le da je bilo povečanje bolj izrazito v notranjem delu. Primerjava vsebnosti L-askorbinske kisline v posameznem delu glave vzorca ob obiranju in po skladiščenju je statistično značilna.

V zelju cv. Caco smo ugotovili povprečno vsebnost nitrata 38 mg/kg, s skladiščenjem se je vsebnost nekoliko znižala. V vseh preiskovanih zeljnih glavah smo ugotovili razlike med zgornjim in spodnjim delom rastline, ki so statistično značilne. V vseh rastlinah je vsebnost nitrata večja v notranjosti glave, v predelu, ki je bliže kocenu. V zgornjem delu so vsebnosti nitrata nižje. Povprečna razlika med zgornjim in spodnjim delom je cca. 25 mg/kg in se s skladiščenjem ohranja. Za kultivar Caco je značilno, da se s skladiščenjem razlike med rastlinami zmanjšajo, tako je po skladiščenju največja razlika 11 mg/kg. Glede na to, da so bili vsi postopki pri pripravi vzorcev za analizo enaki, lahko sklepamo na različno metabolno in fiziološko dogajanje v posameznih rastlinah.

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

#### 5.1.4.1 Vsebnost L-askorbinske kisline

Glede vsebnosti L-askorbinske kisline med kultivarjema in različnima deloma rastline ugotavljamo, da so razlike prisotne, vendar niso izrazite. Zelje cv. Destiny vsebuje 21 % več L-askorbinske kisline kot cv. Caco. Vsebnosti so višje v spodnjem delu zeljne glave.

Kultivar Caco vsebuje več L-askorbinske kisline v zgornjem delu rastline. Po skladiščenju vsebnosti povsod narastejo, cv. Caco se razlikuje po tem, da L-askorbinska kislina v spodnjem delu toliko naraste, da preseže vsebnost v zgornjem delu. Upoštevati moramo vpliv izgube mase in kopičenja metabolitov znotraj rastline. Le pri vsebnosti L-AK po 120 dneh skladiščenja so variance homogene in so razlike med sortama statistično značilne. Če ne upoštevamo F-testa je statistično značilna razlika tudi v primerjavi me spodnjima deloma rastlin.

Zelje cv. Caco je tudi znotraj širšega projekta analize 4 sort (Destiny, Delphy, Caco in Hinova) edino, ki je ob času obiranja vsebovalo več L-askorbinske kisline v zunanjih listih.

Baloh (2002) v svoji diplomski nalogi navaja, da so pri sortah zelja Caid in Guard ugotovili večjo vsebnost vitamina C v kocenu, vendar so razlike majhne. Te ugotovitve se ujemajo z našimi rezultati pri cv. Destiny, ki je vsebovalo več L-askorbinske kisline v spodnjem delu.

#### 5.1.4.2 Vsebnost nitrata

S primerjavo sort ugotavljamo različne vsebnosti nitrata, tako med kultivarji kot med posameznim delom rastline. Ugotovili smo, da je med zeljem cv. Destiny in cv. Caco velika razlika v vsebnosti nitrata. Podobna sta si v tem, da vsebujeta večje količine nitrata v notranjosti glave, razlikujeta pa se v količini le-teh in sicer za 64 %. Cv. Destiny vsebuje štiri do petkrat več nitrata. S skladiščenjem se količina nitrata v cv. Destiny poveča, v spodnjem delu za 35 %, medtem ko se cv. Caco zmanjša, v spodnjem delu za 14 %. Glede na to, da je pri cv. Caco celokupna vsebnost nitrata manjša, so manjše tudi razlike med zgornjim in spodnjim delom rastline.

Naše ugotovitve, da je vsebnost nitrata odvisna od kultivarja potrdimo z ugotovitvami iz diplomske naloge Markelc (2002). Na osnovi rezultatov ugotavlja, da je vsebnost nitrata v zelju zelo odvisna od kultivarja. Zelje cv. Caid vsebuje vsaj dvakrat več nitrata v vretenu in tudi v zunanjih listih v primerjavi z zeljem cv. Guard. Poleg tega je v obeh zgoraj navedenih kultivarjih vsebnost nitrata v vretenu šest krat večja kot v zunanjih listih. Po skladiščenju 53 dni se tako v zelju cv. Caid kot tudi cv. Guard vsebnost nitrata v vretenu zniža, medtem ko se v zunanjih listih zviša. Med skladiščenjem prihaja do verjetne delne translokacije nitrata iz vretena v zunanje liste zelja. Tudi naša kultivarja vsebujeta več nitrata v spodnjem delu glave, ki je bliže kocenu, vendar se razlikujeta v tem, da se skladiščenjem količina nitrata v cv. Caco tudi zmanjša, medtem ko se cv. Destiny poveča.

Tudi Močnik (2009) ugotavlja, da je v zelju cv. Delphi precej več nitrata kot v zelju cv. Hinova ter večje količine nitrata v spodnjem delu glave vzorca. V zelju cv. Delphi po skladiščenju vsebnost nitrata tako v zgornjem kot tudi v spodnjem delu naraste, medtem ko pri zelju cv. Hinova pade. Na osnovi rezultatov raziskave in podatkov iz literature ugotavljamo, da je vsebnost nitrata zelo odvisna od kultivarja. Černe in sod. (1996) navaja v svojem delu podatke za količino nitrata šestih sort zelja vzgojenih isto leto na isti lokaciji. Količine se gibljejo od 412,0 mg/kg kultivarja 'Atria F1' do 999,0 mg/kg kultivarja

'Krautman F1'. Raziskave različnih vrst listnate zelenjave so pokazale skupne značilnosti. Največ nitrata vsebujejo pecelj in steblo rastline, najmanj pa korenine (Chen in sod., 2004).

Pri preiskovanju nitrata smo ugotavljali velike razlike v količini nitrata med posameznimi rastlinami. Te so posledica biološke raznolikosti, fizioloških procesov v rastlini, okoljskih dejavnikov med rastjo ter mehanskih poškodb in stresnih pogojev med skladiščenjem.

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

V nalogi smo iskali morebitno povezavo med vsebnostjo nitrata in L-askorbinske kisline. Predpostavili smo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-askorbinske kisline v določeni vrsti oz. določenem delu zeljne glave.

V diplomskem delu (Baloh, 2002) najdemo ugotovitev, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-askorbinske kisline. Sorta 'Caid', ki je vsebovala povprečno dvakrat več nitrata kot sorta Guard (Markelc, 2002), je vsebovala manj C vitamina. Naši rezultati te ugotovitve ne potrjujejo, kažejo na to, da ni povezave med vsebnostjo nitrata in L-askorbinske kisline.

Na podlagi pridobljenih podatkov lahko ugotavljamo, da med količino nitrata in količino L-askorbinske kisline v rastlini ni povezave.

Obema sortama je skupno to, da vsebujeta večje količine nitrata v notranjem delu rastline. Prav tako smo pri obeh določili velike razlike med posameznimi rastlinami. Rastline so rasle in se razvijale pod enakimi pogoji, tudi nadaljnjo ravnanje z vzorčnim materialom je bilo enako, zato bi lahko vzrok iskali v različnih fizioloških in metabolnih procesih posamezne rastline med rastjo in skladiščenjem.

### **5.1.6 Prehranski vidiki rezultatov**

Zelje je pomemben vir vitamina C v humani prehrani. Kot nam prikazujejo rezultati, je zelje zelo primerno za skladiščenjem saj spremembe v količini L-askorbinske kisline niso velike. Upoštevati moramo, da med skladiščenjem izgubimo velike količine vode in se vsi metaboliti koncentrirajo. S prehranskega stališča je bolj zanimiv kultivar Caco, saj vsebuje manj nitrata, medtem ko je vsebnost L-askorbinske kisline v obeh kultivarjih podobna.

Iz podatkov, ki smo jih pridobili v okviru širšega projekta analize 4 kultivarjev, lahko izluščimo naslednje ugotovitve. Večje razlike v vsebnosti nitrata med posameznimi kultivarji nam odpirajo možnost, da s pravilno izbiro kultivarja in postopkov predelave bistveno vplivamo na količino nitrata v končnem produktu. Količina nitrata, ki ga rastlina zadrži v sebi je odvisna od številnih dejavnikov. Na podlagi enoletnih izsledkov ne moremo določiti optimalnega kultivarja, z najnižjo vsebnostjo nitrata. Za to so potrebne analize v daljšem časovnem obdobju ob upoštevanju različnih rastnih razmer in agrotehničnih ukrepov.



Z izbiro primernih kultivarjev in primernih pridelovalnih postopkov lahko bistveno vplivamo na vsebnost nitrata in povečamo prehransko varnost živil.

Po podatkih iz literature (Černe, 1998) vsebuje zelje 20-100 mg/100 g vitamina C ali askorbinske kisline. Rezultati naših analiz se popolnoma ujemajo s temi podatki. Zelje je tako pomemben vir C vitamina v prehrani, zaradi nizke energijske vrednosti 96-113 kJ (23-27 kcal) pa je primerno za znižanje energetske gostote obroka oz. zmanjšanje vnosa energije.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela, lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Povprečna izguba mase po štirimesečnem skladiščenju zelja cv. Destiny znaša 51,2 %, pri cv. Caco pa 53,1 %.
- Različni kultivarji zelja imajo različno vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata, kar potrjuje delovno hipotezo.
- Vsebnost L-askorbinske kisline je pri cv. Destiny takoj po obiranju 34,9 mg/100 g pri cv. Caco 27,4 mg/100 g. Med skladiščenjem prihaja do minimalnih razlik. Zaradi izgube vode in s tem povečanja suhe snovi, vsebnost L-AK v 100 g zelja ostaja enaka oz. rahlo naraste.
- Znotraj istega kultivarja so statistično pomembne razlike v količini merjenih parametrov med posameznimi deli rastline. Povprečno je v spodnjem delu rastline več nitrata in L-askorbinske kisline kot v zgornjem delu, razen pri cv. Caco, kjer je v zgornjem delu več L-AK samo pred skladiščenjem.
- Preiskovana kultivarja Destiny in Caco se razlikujeta v vsebnosti nitrata. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Destiny znaša takoj po obiranju 122,0 mg/kg, v cv. Caco 38,3 mg/kg. Zelje cv. Destiny ga vsebuje znatno več in vsebnosti s skladiščenjem narastejo. Cv. Caco, ki ga ob času obiranja vsebuje manj ga med skladiščenjem še nekoliko izgubi.
- Trditve, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna vsebnosti L-askorbinske kisline v določeni vrsti zelja oz. določenem delu rastline, ne moremo potrditi. Z ozirom na rezultate opravljenih analiz ugotavljamo, da med količino nitrata in količino L-askorbinske kisline v rastlini ni povezave. Našo hipotezo lahko ovržemo.
- Glede na večje razlike v vsebnosti nitrata med posameznimi kultivarji, lahko s pravilno izbiro kultivarja in postopkov pridelave bistveno vplivamo na količino nitrata v svežem in predelanem zelju.

## 6 POVZETEK

Različni kultivarji zelja vsebujejo različne vsebnosti nitrata in L-askorbinske kisline. Namen raziskave je bil določiti vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco, ugotavljali smo njeno razporeditev v različnih delih rastline (zgornji in spodnji del) ter spremljali vpliv skladiščenja na merjene parametre. Zelje smo vzgojili na poskusnem polju Biotehniške fakultete. Skladiščili smo ga v hladilnici z normalno atmosfero, pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti. Vsebnost L-askorbinske kisline smo določili s pomočjo metode HPLC. Količino nitrata smo določali spektrofotometrično.

Z opravljenimi analizami smo ugotovili sledeče. Oba preiskovana kultivarja zelja cv. Destiny in cv. Caco sta pokazala podobnosti pri izgubi mase. Povprečna izguba mase je pri zelju cv. Destiny znašala po 120 dneh skladiščenja 51,2 % pri zelju cv. Caco pa je izguba mase nekoliko manjša, in sicer 53,1 %.

Vsebnost L-askorbinske kisline se med kultivarjema razlikuje vendar so razlike minimalne. V vsebnost L-askorbinske kisline v zelju cv. Destiny ne prihaja do bistvenih sprememb. Pred skladiščenjem je bila povprečna vsebnost 34,9 mg/100 g, več je v spodnjem delu. V prvih štirih mesecih naraste za 19 %. Le pri vsebnosti L-AK po 120 dneh skladiščenja so variance homogene in so značilne statistične razlike med sortama v zgornjem delu glave. Vsebnost L-askorbinske kisline v zelju cv. Caco takoj po obiranju znaša 27,4 mg/100 g, kar je manj v primerjavi cv. Destiny, večje količine so v zgornjem delu. S skladiščenjem se znatno ne spreminja, tudi v cv. Caco naraste za 24 % in znaša 34,1 mg/100 g. Cv. Caco se razlikuje po tem, da L-askorbinska kislina, v spodnjem delu toliko naraste, da preseže vsebnost v zgornjem delu. Iz podatkov lahko sklepamo, da je vsebnost L-askorbinske kisline odvisna od kultivarja zelja. Med skladiščenjem prihaja do minimalnih razlik. Zaradi velike izgube vode in s tem povečanja suhe snovi, vsebnost L-AK v 100 g zelja ostaja enaka oz. rahlo naraste.

Pri ugotavljanju vsebnosti nitrata ugotavljamo, da so med kultivarjema velike razlike. Več nitrata vsebuje zelje cv. Destiny, povprečna vsebnost je 122,0 mg/kg svežega vzorca. V zelju cv. Caco je nižja, takoj po obiranju znaša 38,3 mg/kg. Cv. Destiny s skladiščenjem kaže tendenco naraščanja, po 120 dneh skladiščenja naraste na 158,1 mg/kg. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Caco se po 120 dneh skladiščenja rahlo zniža vendar ne moremo govoriti o tendenci padanja. V obeh sortah je količina nitrata večja v spodnjem delu glave vzorca.

Naše raziskave potrjujejo, da je zelje pomemben vir vitamina C v prehrani. Kot nam prikazujejo rezultati, je zelje zelo primerno za skladiščenje saj spremembe v količini L-askorbinske kisline niso velike. Upoštevati moramo, da med skladiščenjem izgubimo velike količine vode in se vsi metaboliti koncentrirajo. S prehranskega stališča je bolj zanimiv kultivar Caco, saj vsebuje manj nitrata, medtem ko je vsebnost L-askorbinske kisline v obeh kultivarjih podobna.

## 7 VIRI

Amr A., Hadidi N. 2001. Effect of cultivar and harvest date on nitrat and nitrite content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 59-67

Baloh N. 2002. Vsebnost vitamina C v kitajskem kapusu in zelju. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50 str.

Basu T. K., Dickerson J. W. T. 1996. *Vitamins in human health and disease*. Wallingford, CAB International: 125-146

Bender D. A. 1993. Ascorbic acid. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 1. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 269-280

Chen B-M, Wang Z-H., Li S-X., Ang G-X., Song H-X., Wang X-N. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, 167, 635-643

Cirič M. *Pedologija*. Sarajevo, SOUR Svijetlost: 65 str.

Černe M. 1998. *Kapusnice*. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 173 str.

Černe M. 1999. *Kapusnice*. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 11: 507-511

Černe M., Žnidaršič-Pongrac V., Kmecl V., Pezdirc A., Flisar-Novak Z., Belec D., Kos Zidar S. 1997. Nitrati, nitriti in NH<sub>4</sub> v vrtninah. V: *Tehnologija-Hrana-Zdravje*. Knjiga del: 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21-25. april 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 555-562

Dennis M. J., Wilson L. A. 2003. Nitrates and nitrites. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 4136-4141

Du S., Zhang Y., Lin X. 2007. Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China*, 6,10: 1246-1255

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

Fordham R., Hadley P., 2003. Cabbage and related vegetables. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). London, Academic Press: 5932-5934

- Garjetović D. 2006. Vsebnost maščobnih kislin, sladkorjev in vitamina C v različnih kultivarjih zelja (*Brassica oleracea* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67 str.
- Gliha M., Kodele M. 1990. Prehrana. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 240 str.
- Gobec S. 2001. Vitamini kot zdravila in prehranska dopolnila. V: Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana. Mlinarič A., Kristl J. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 67-79
- Golob T. 1987. Določevanje vitamina C v krompirju – primerjava encimske metode s klasičnimi. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-4, 7-13, 15, 17, 24-29, 39
- Goodhart R. S., Shils M. E. 1980. Modern nutrition in health and disease. Philadelphia, Lea and Febiger: 259-272
- Hounscome N., Hounscome B., Tomos D., Edwards-Jones G. 2009. Changes in antioksidant compounds in whitw cabbage during winter storage. *Postharvest Biology and Technology*, 52: 173-179
- Hribar J. 1999. Skladiščenje kapusnic. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 11: 546-547
- Kall M. A., Ball G. F. M., 2003. Ascorbic acid. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). London, Academic Press: 316-332
- Kennedy J. F., Rivera Z. S., Lloyd L. L., Warner P. in Jumel K. 1992. L-ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen. *Food Chemistry*, 45: 327-331
- Klieber A., Porter K. L., Collins G. 2002. Harvesting at different times of day does not influence the postharvest life of Chinese cabbage. *Scientia Horticulturae*, 96: 1-9
- Klun I. 2000. Vpliv aditivov na razgradnjo C - vitamina. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.
- Kmecl V., Sušin J., Zupančič-Kralj L. 2005. Validation of analytical methods used for determination of nitrate in soil. *Accreditation and Quality Assurance*, 10: 172-176
- Kobovec T. 2000. Določanje vsebnosti vitamina C v različnih vrstah zelenjave. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- Lapornik B. 2000. Spremljanje vsebnosti C vitamina v jabolkih med skladiščenjem. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53 str.

Leszczyńska T., Filipiak-Florkiewicz A., Ciešlik E., Sikora E. 2009. Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 315-321

Lyons J. D., McCallum L. E., Osborne W. J., Nobbs P. E. 1991. Assessment of procedures for determination of nitrate and nitrite in vegetable extracts. *Analyst*, 116: 153-157

Markelc M. 2002. Vsebnost nitratov v kitajskem kapusu in zelju. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49 str.

Marshall P. A., Trenerry V. C. 1996. The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. *Food Chemistry*, 57,2: 339-345

Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2002. Vitamini in minerali. Ptuj, In *obs medicus*: 71, 75

Miller J. N., Rice-Evans A. C. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60, 3: 331-337

Mohri T. 1993. Nitrates and nitrites. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 5. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). London, Academic Press: 3240-3244

Myshkin A. E., Konyevaeva V. S., Gumargalieva K. Z., Moiseev Y. V. 1996. Oxidation of ascorbic acid in the presence of nitrites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 10: 2948-2950

Noichinda S., Bodhipadma K., Mahamontri C., Norongruk T., Ketsa S. 2007. Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*). *Postharvest Biology and Technology*, 44: 312-315

Osvald J., Kogoj-Osvald M. 1998. Gnojenje zelenjavnic: učbenik za 4. letnik srednje kmetijske šole za poklic kmetijski in vrtnarski tehnik. *Železniki, Pami*: 295 str.

Osvald J., Kogoj-Osvald M. 2003. Integrirano pridelovanje zelenjave. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.

Plestenjak A. 1995. Učinek spremenjene atmosfere na aktivnost polifenoloksidaz v pakiranem, olupljenem krompirju. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.

Podsedeck A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1-11

Pokorn D. 1991. S hrano nad raka. Ljubljana, Forma 7: 21,52

- Pokorn D. 1996. S prehrano do zdravja. Hrana čudežno zdravilo II. Ljubljana, EWO d.o.o. za založbo Slavko Pregl: 527 str.
- Požrl T. 2001. Regulacija metabolnih sprememb zelja s pakiranjem v modificirani atmosferi. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.
- Prasad S., Chetty A. A. 2008. Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry*, 106: 772-780
- Primic-Žakelj M. 1997. Meso v etiologiji raka. V: Meso v prehrani in zdravje. Zbornik posveta. Radenci, 20. in 21. november, 1997. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 57-62
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje RS Slovenije: 215 str.
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40-48
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 10-17
- Sawamura M., Takemoto K., Matsuzaki Y., Ukeda H., Kusunose H. 1994. Identification of two degradation products from aqueous dehydroascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1200-1203
- Scanlan R. A. 2003. Nitrosamines. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). London, Academic Press: 4142-4147
- Seib P. A. 1985. Oxidation, monosubstitution and industrial synthesis of ascorbic acid. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 27: 259-306
- Seung K. L. in Adel A. K. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20,3: 207-220
- Singh J., Upadhyay A. K., Bahadur A., Singh B., Singh K. P., Rai M. 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, 108: 233-237
- Sun F., Hou X, Li Y., Yang X. 2008. Molecular cloning and characterization of nitrate reductase gene from non-heading Chinese cabbage. *Scientia Horticulturae*, 119:1-10

Verkerk R. 2002. Evaluation of glukosinolate levels throughout the production chain of Brassica vegetables. Towards a novel predictive modelling approach. Thesis. Wageningen, Wageningen University: 2-38

Volden J., Bengtsson B. G., Wicklund T. 2009. Glukosinolates, L-askorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L ssp. botrytis); effects of long-term freezer storage. Food Chemistry, 112:967-976

Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.

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



## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marjanu Simčiču za strokovno pomoč, usmerjanje in koristne nasvete pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se somentorju doc. dr. Blažu Cigiću za strokovni pregled diplomskega dela, za nasvete, poprave in izboljšave.

Zahvala gre tudi recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za strokovni pregled naloge ter pomoč in napotke pri analizah na HPLC sistemu.

Zahvaljujem se vsem na Katedri za tehnologije, prehrano in vino za pomoč in prijetno delovno vzdušje. Sonji Čerpič za nepogrešljivo pomoč v laboratoriju, Poloni iz katedre za mikrobiologijo, za opravljene analize nitrata ter univ. dipl. inž. agr. Draganu Žnidarčiču iz Oddelka za agronomijo za pomoč pri vzgoji rastlin.

Zahvaljujem se univ. dipl. inž. Anji Janeš za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvala gre tudi univ. dipl. inž. Ivici Hočevar za oblikovni pregled naloge.

Iskrena zahvala tudi staršem za potrpežljivost, spodbudo in vsestransko pomoč, bratu Mateju, stricu in bratrancu za pomoč pri oblikovanju naloge ter fantu Alekseju za razumevanje in podporo.