

»56. Srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022«

**Spremembe fizioloških in biokemijskih lastnosti pri shranjeni solati
(*Lactuca sativa*) in peteršilju (*Petroselinum crispum*) po foliarnem
dodajanju kalcijevega klorida (CaCl_2)**

EKOLOGIJA Z VARSTVOM OKOLJA
Raziskovalna naloga

Avtor: Nuša Ornik
Avtor: Sara Namestnik
Mentor: Helena Bajec

II. gimnazija Maribor

Maribor, 2022

KAZALO VSEBINE

Kazalo slik	7
Kazalo preglednic	7
Kazalo grafov	7
POVZETEK.....	9
SUMMARY	11
ZAHVALA.....	13
1. UVOD.....	1
2. TEORETIČNO OZADJE.....	3
2.1.1 Klorofil.....	3
2.1.1.2 Pomen klorofila v rastlinah	3
2.1.1.3 Struktura molekule klorofila	3
2.1.1.4 Kako klorofil koristi zdravju.....	4
2.1.2 Vitamin C	4
2.1.2.1 Vitamin C v rastlinah	5
2.1.2.2 Vsebnost vitamina C v živilih.....	5
2.1.2.3 Funkcije vitamina C.....	6
2.1.3 Vpliv CaCl ₂ na rastline	6
2.1.4 Oksidativni stres	6
2.1.5 Spektrofotometrija.....	8
2.1.6 Titracija.....	9
2.1.7 Peteršilj	9
2.1.8 Solata.....	10
2.1.9 Fotosinteza	10
2.2 Hipoteze	11
3. METODOLOGIJA.....	13
3.1 Vzorci rastlin	14
3.2 Metoda merjenja klorofila v rastlinah.....	14
3.3 Metoda merjenja vsebnosti vitamina C	15
3.4 Merjenje oksidativnega stresa.....	18

3.5 Statistična analiza	21
4. REZULTATI	22
4.1 Rezultati vsebnosti klorofila.....	22
4.2 Rezultati vsebnosti vitamina C	23
4.3 Rezultati encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze.....	24
5. DISKUSIJA.....	27
6. DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	31
7. ZAKLJUČEK.....	32
8. VIRI.....	34
8.1 Viri slik	39
9. PRILOGE.....	40
9.1 Priloga 1:	40
9.2 Priloga 2:	40
9.3 Priloga 3:	41

Kazalo slik

Slika 1: Struktura molekule klorofila (vir: Encyclopædia Britannica: Chlorophyll, 2021)	4
Slika 2: Struktura molekule vitamina C (Encyclopædia Britannica: Vitamin C, 2021)	5
Slika 3: Vernier Spektrofotometer (lasten vir)	8
Slika 4: Kiveta (vir: Biosigma).....	9
Slika 5: Navadna solata (Lactuca sativa) (lasten vir)	10
Slika 6: Hodogram metode (lasten vir)	13
Slika 7: Izbrane rastline znamke "Živa" (solata in peteršilj), uporabljene za poskus (lasten vir).....	14
Slika 8: Priprava rastlinskih ekstraktov (lasten vir)	17
Slika 9: Priprava na titracijo (lasten vir)	17
Slika 10: Rastlinski ekstrakti po titraciji (lasten vir).....	18
Slika 11: Vzorca solate in peteršilja po centrifugiranju (lasten vir).....	20
Slika 12: Vzorci po merjenju encimske aktivnosti gvajakola (lasten vir).....	20

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Prikaz vzorcev za določanje encimske aktivnosti	19
Preglednica 2: Količina klorofila (Spad enote) pri peteršilju in solati po dneh merjenja pri različnih pogojih	22
Preglednica 3: Primerjava povprečij količine vitamina C (mg/100g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih. Intervali napak predstavljajo standardne deviacije.	24
Preglednica 4: Encimska aktivnost gvajakola peroksidaze (mM/min) pri solati in peteršilju pri različnih pogojih. Intervali napak prikazujejo standardne deviacije.	25

Kazalo grafov

Graf 1: Količina klorofila (Spad enote) pri peteršilju in solati v različnih dneh merjenja pri različnih pogojih	23
Graf 2: Primerjava količine vitamina C (mg/100g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih. Intervali napak predstavljajo standardne deviacije.	24
Graf 3: Primer merjenja v programu Logger pro.....	25
Graf 4: Encimska aktivnost gvajakola peroksidaze (mM/min) pri solati in peteršilju pri različnih pogojih. Intervali napak prikazujejo standardne deviacije.....	26

POVZETEK

Dandanes je vedno bolj pomembno kaj zaužijemo in ali je ta zaužita hrana kvalitetna. V raziskovalni nalogi smo natančno raziskali problem upadanja fizioloških in biokemijskih lastnosti peteršilja (*Petroselinum crispum*) in solate (*Lactuca sativa*) po določenem časovnem obdobju, s pomočjo merjenja vsebnosti vitamina C, encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze in klorofila. Zanimalo nas je tudi ali škropljenje s kalcijevim kloridom vpliva na vsebnost teh snovi. Tako smo na podlagi rezultatov vzpostavili korelacije med uživanjem staranega peteršilja in solate z upadlimi vrednostnimi merjenih snovi in njihovim vplivom na zdravje.

Rezultati meritev so pokazali, da škropljenje s kalcijevim kloridom pripomore k manjšemu upadu vitamina C, encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze ter klorofila. Pokazali smo razliko med vsebovanimi snovmi v peteršilju in solati in peteršilj predpostavili kot rastlino z večjo količino merjenih snovi, kot solata.

Ključne besede: Vitamin C, gvajakol peroksidaza, klorofil, kalcijev klorid, peteršilj, solata.

SUMMARY

Nowadays, it is increasingly important what we eat and whether the food we eat is of good quality. In this research work, the problem of the decline of physiological and biochemical properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) after a certain period of time was investigated in detail by measuring the vitamin C content, the enzymatic activity of guaiacol peroxidase and chlorophyll. We also wanted to know whether spraying with calcium chloride affects the content of these substances. Thus, the results were used to establish correlations between the consumption of aged parsley and lettuce with declining levels of the measured substances and their impact on health.

The results showed that spraying with calcium chloride contributes to a lower decrease in vitamin C, guaiacol peroxidase enzyme activity and chlorophyll. We have shown the difference between the nutrient content of parsley and lettuce and assumed parsley to be a plant with a higher amount of the measured nutrients than lettuce.

Keywords: vitamin C, guaiacol peroxidase, chlorophyll, calcium chloride, parsley, lettuce.

ZAHVALA

Zahvalili bi se mentorici, ki nama je od vsega začetka stala ob strani in nama pomagala. Hvala za vso potrpežljivost, prijaznost in pripravljenost pomagati ob uresničevanju naših ciljev. Hvala tudi vsem, ki so nam pomagali pri prenosu opreme in drugih fizičnih delih. Zahvala gre še šoli, ki nama je priskrbelo potreben material, nudila laboratorij in učilnice za raziskavo. Vsi ste pomagali pri nastanku te raziskovalne naloge, brez vas je ne bi dokončali.

1. UVOD

Uživanje listnate zelenjave, kot je solata, je zelo priljubljeno zaradi svežine, hranilne vrednosti in zdravstvenih koristi. Te so zelo široke, saj je solata bogat vir bioaktivnih spojin, kar vključuje fenole, antioksidante, vitamine (C, A ...), minerale (kalij, fosfor, kalcij) in druge spojine (Managa idr, 2018).

Peteršilj je znan po visoki vsebnosti vitamina C, prav tako pa ima visoko vsebnost železa, zaradi česar ščiti pred anemijo. Po poročanjih naj bi deloval antioksidativno, protimikrobno, itd. Je koristen vir kalcija, bogat z drugimi antioksidanti, esencialnimi vitamini in poleg železa in kalcija še z drugimi elementi npr. s fosforjem, magnezijem, žveplom ... (Mezeyová, 2016)

Zelenjava, ki jo kupujemo v trgovini, pogosto ni lokalna sploh pozimi in jeseni, ko pri nas ni pogojev za rast. Solata od rastlinjaka ali polja, kjer zraste, pa do polic v trgovinah naredi zelo dolgo pot, ki pogosto traja tudi do več tednov. V tem času izgubi veliko hranil. Več glavnih vzrokov za izgube na prodajnih policah so slabi pogoji skladiščenja, visoke temperature in grobo ravnanje z glavami solate s strani tržnih posrednikov in potrošnikov. (Managa idr., 2018).

Pridelavo zelenjave in drugih živil omejujejo izgube po žetvi, ki posledično omejujejo tudi količine kakovostnih pridelkov, ki dosežejo potrošnike. Izgube hranilnih snovi vključujejo kvantitativne in kvalitativne (spremembe hranilnih vrednosti, okusa, barve, teksture...) izgube, ki vplivajo na ekonomske izgube. (Managa, idr., 2018)

Tukaj se pojavijo vprašanja, ali je sploh vredno kupovati solato in peteršilj ter druge vrste zelenjave pozimi, če izgubijo toliko hranilnih snovi. Je smiselno prodajati zelenjavo preko oceanov na druge celine, če jo bodo na koncu zavrnili zaradi prevelikih izgub hranil zaradi transporta? Ali morda obstajajo kakšne rešitve, s katerimi bi lahko upočasnili upad hranil v zelenjavi med skladiščenjem in transportom? Na to temo je bilo narejenih že veliko različnih študij, ki so proučevale vsebnosti klorofila, vitamina C, vitamina A in drugih komponent v živilih po nekaj dneh ali tednih shrambe, med temi so na primer Moraes idr. (2010), Managa idr. (2018), Serea idr. (2014) in še mnoge druge.

Z uporabo škropiv lahko podaljšamo življenjsko dobo zelenjave in zelišč, vendar so mnoga škropiva izredno nevarna okolju. Kalcijev klorid se uporablja predvsem zaradi kalcija, ki stabilizira celično membrano in celično steno, kar ohranja kakovost plodov, sadežev in zavira zorenje rastlin. (Shiri idr., 2015)

Namen te raziskovalne naloge je ugotoviti, ali kalcijev klorid izboljša fiziološke in biokemijske lastnosti solate in peteršilja ter ali lahko podaljšamo življenjsko dobo rastlin s pomočjo tega škropiva. Osredotočili smo se na vsebnosti vitamina C, klorofila in raven oksidativnega stresa.

2. TEORETIČNO OZADJE

2.1.1 Klorofil

Klorofil je zeleni pigment, ki ga najdemo v skoraj vseh fotosintetskih organizmih. Obstaja v več različnih oblikah, ki pa so vse topne v maščobah. (Glimn-Lacy in Kaufman, 2006)

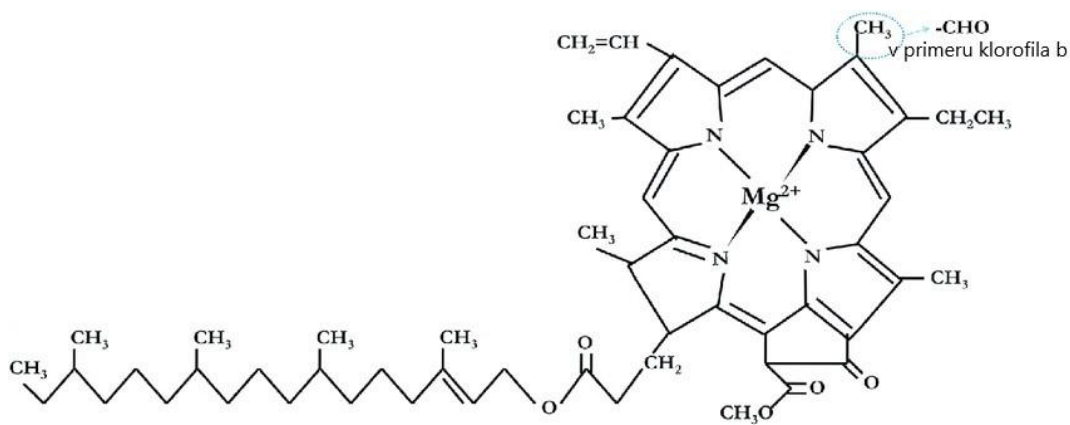
Najpogostejši obliki sta klorofil a in b. Najdemo ju v višjih rastlinah in zelenih algah. Klorofil c in d sta redkejša, pogosto ju najdemo v kombinaciji s klorofilom a v algah. Klorofil e je redek, nahaja se v nekaterih zlatorumenih algah. Obstaja tudi bakterio-klorofil, ki se nahaja v nekaterih bakterijah. (Britannica, 2021)

2.1.1.2 Pomen klorofila v rastlinah

Klorofil se nahaja v kloroplastu na tilakoidni membrani v fotosistemu I in II. Pri fotosintezi sodelujejo tudi drugi pomožni pigmenti ksantofili in karotenoidi, vendarne morejo nadomestiti klorofila, ki je ključen za potek fotosinteze. Naloga pigmentov je, da po absorpciji svetlobe prenašajo energijo (fotone) do reakcijskega centra, kjer je klorofil a. Ta je povezan s proteini, kot glavni asimilacijski pigment. (Jerše, 2012) Pomanjkanje klorofila v rastlini lahko povzroči bolezni rastline, kot je kloroza. Ta je definirana kot porumenelost listnega tkiva zaradi pomanjkanja klorofila. Če klorofila primanjkuje, fotosinteza začne potekati omejeno. Rastlini lahko tako v tem procesu izmerimo vedno večji stres, saj le-ta začne propadati. (Britannica, 2019)

2.1.1.3 Struktura molekule klorofila

Klorofil je po strukturi zelo podoben hemoglobinu. Molekule so sestavljene iz osrednjega magnezijevega atoma, ki je obkrožen s tako imenovanim porifrinskim obročem iz dušika. Na obroč je pritrjena stranska ogljikovodikova veriga, znana tudi kot fitolna veriga. (Britannica, 2021)



Slika 1: Struktura molekule klorofila (vir: Encyclopædia Britannica: Chlorophyll, 2021)

2.1.1.4 Kako klorofil koristi zdravju

Raziskovalci so ugotovili, da klorofil izboljšuje delovanje imunskega sistema, pomaga pri vzdrževanju normalnega krvnega tlaka, pri razstrupljanju jeter, preprečuje pojav rakavih obolenj in sodeluje pri njihovem premagovanju. Prav tako razstruplja kri in telo in deluje pomlajevalno. Klorofil in njegovi derivati imajo antioksidativne lastnosti, vendar obstajajo tudi raziskave, ki potrjujejo njihovo pro-oksidativno delovanje (kar pomeni, da so oksidanti), ko so izpostavljeni svetlobi. (Masten, 2017)

2.1.2 Vitamin C

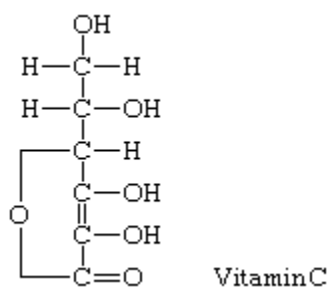
Vitamin C ali askorbinska kislina je vodotopna molekula podobna ogljikovih hidratom. Vključen je v nekatere presnovne procese pri živalih. Večina živali lahko sama sintetizira vitamin C, ni pa tako pri ljudeh in drugih primatih, ki ga pridobimo iz prehrane, pri čemer so najboljši vir vitamina C agrumi in sveža zelenjava. (Britannica, 2021)

Je bistvenega pomena za sintezo kolagena, ki je pomemben pri celjenju ran in tvorjenju vezivnega tkiva. Deluje kot antioksidant in spodbuja imunski sistem. Človek potrebuje relativno veliko količino vitamina C, odrasel moški ga potrebuje približno 70 mg na dan. (Britannica, 2021)

Pomanjkanje vitamina C običajno hitro opazimo, najpogostejši znaki so krvavenje dlesni, bolečine v mišicah in sklepih. Pri človeku in primatih je potreben za preprečevanje bolezni

skorbut. Pri skorbutu so značilni bolečina v sklepih in spodnjih okončinah, togost v sklepih, krvavitve v telesnih tkivih ter krvave in otekle dlesni. (Gojgošek, 2012)

Vitamin C hitro razpade v reakcijah s kisikom in visokih temperaturah, zato ga je težko ohraniti v živilih. Pogosto ga dodajajo sadju, da bi preprečili porjavitev. (Britannica, 2021)



Slika 2: Struktura molekule vitamina C (Encyclopædia Britannica: Vitamin C, 2021)

2.1.2.1 Vitamin C v rastlinah

Vsebnost vitamina C v rastlinah se razlikuje med tkivi in organi, običajno je visoka v listih, meristematskih tkivih, cvetovih in mladih plodovih ter nizka v organih, kjer fotosinteza ne poteka; npr. stebela in korenine. V istem organu ali tkivu na vsebnost vitamina C vplivajo razvojna faza rastlin in spremembe okolja. Svetloba je eden najpomembnejših okoljskih signalov, ki sodelujejo pri uravnavanju ravni vitamina C. (Paciolla idr., 2019)

2.1.2.2 Vsebnost vitamina C v živilih

Vitamin C najdemo v skoraj vseh živilih rastlinskega izvora, v živilih živalskega izvora pa je pogosto najden v ledvicah. Največ ga dobimo iz sadja in zelenjave, najbolj bogati so citrusi, črni ribez, mango, jagode ... Od zelenjave ga je največ v sladki papriki, cvetači, peteršilju, brokoliju in krompirju.

Količina vitamina C je odvisna od vrste rastline, stopnje zrelosti, dela rastline in načina skladiščenja. Načeloma velja, da se vitamin C kopiči dokler plod ne doseže stopnje zrelosti. Odvisen je tudi od klime in sončne svetlobe.

2.1.2.3 Funkcije vitamina C

Vitamin C ima različne funkcije v kloroplastih in je pomemben pri procesu fotosinteze. Ima ključno vlogo pri neposrednem odstranjevanju reaktivnih kisikovih spojin. Sodeluje tudi pri ciklu ksantofila, ki je potreben za zaščito fotosistema II. Odgovoren je za razpršitev presežne energije v kompleksih za zbiranje svetlobe v fotosistemu II. Pomembna funkcija je tudi, da lahko vitamin C odda elektrone obema fotosistemoma, predvsem kadar ju poškodujejo stresni pogoji. Spremembe v vsebnosti vitamina C bistveno spremenijo izražanje genov povezanih s fotosintezo. Znižanje vsebnosti vitamina C vodi do izgube klorofila a, zmanjšanja velike podenote RUBISCO in zmanjšanja asimilacije CO₂. Tako vitamin C z ohranjanjem fotosintetskega delovanja in omejevanjem poškodb, ki jih posredujejo ROS¹, upočasni staranje listov. Tako kot pri ljudeh, tudi v rastlinah spodbuja absorpcijo železa v rastlinah, saj prispeva k redukciji Fe³⁺. (Paciolla idr., 2019)

2.1.3 Vpliv CaCl₂ na rastline

Kalcij je hranilo, ki velja za pomembno pri določanju kakovosti skladiščenja sadja, saj je glavno hranilo za rastline. Deluje kot kation Ca²⁺ in ima različne vloge, saj deluje v celični steni in membrani, v vakuoli... Visoke stopnje rasti rastlin lahko vodijo to tega, da vsebnost Ca²⁺ pade pod kritično raven, ki je potrebna za stabilizacijo celične stene. Foliarna uporaba kalcija je v tem primeru bistvena za izboljšanje in ohranjanje kakovosti plodov. Pomaga lahko tudi pri zmanjšanju izgube trdnosti in upočasni proces zorenja. (Shiri, idr., 2015)

2.1.4 Oksidativni stres

Oksidativni stres je vrsta kemičnega stresa, ki je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine reaktivnih kisikovih spojin - ROS (ang. reactive oxygen/oxygen species), ki so lahko

¹ ROS - reaktivne kisikove spojine; vrsta nestabilne molekule, ki vsebuje kisik in zlahka reagira z drugimi molekulami v celici. Kopičenje reaktivnih kisikovih vrst v celicah lahko povzroči poškodbe DNK, RNK in beljakovin ter lahko povzroči celično smrt. Reaktivne kisikove vrste so prosti radikali. (National cancer institute – 2021)

potencialno škodljive. Je neposredna posledica delovanja povečane količine ROS na celice in tkiva v organizmu. Oksidativni stres je patološko stanje, ki se pojavi zaradi prevelikega tvorjenja radikalov ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Majhne količine ROS nastajajo pod običajnimi pogoji med fiziološko presnovo celic, vendar je prevelika količina za celico lahko nevarna, včasih celo smrtna. (Osredkar, 2012)

Povečano količino radikalov lahko sprožijo različni okoljski in biološki dejavniki, kot so svetloba, sevanje, suša, visoka slanost, mraz, kovinski ioni, toksini, okužba s patogeni organizmi, staranje rastlinskih organov, okužba z virusi, bakterijami in podobno. (Bartosz, 1997)

2.1.4.1. Metoda določanja encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze

Za zmanjšanje škodljivih učinkov ROS imajo aerobni organizmi neencimsko in encimsko antioksidativno obrambo.

1. Neencimska obramba vključuje vitamine C in E, glutation, askorbat, tokoferole, flavonoide, alkaloidne in karotene.
2. Encimska obramba vključuje superoksid dismutaze, katalaze, peroksidaze (gvajakol peroksidaza, askorbat peroksidaza), reduktaze in druge encime oksidativnega metabolizma. (Apáti, 2003)

Večja, kot je aktivnost teh encimov, pod večjim oksidativnim stresom je rastlina. Encimsko aktivnost gvajakol peroksidaze (G-POD) smo določili spektrofotometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 470 nm, ki je bila posledica polimerizacije gvajakola v tetragvajakol. (Konda, 2012)

2.1.5 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda, s katero ugotavljamo, v kolikšni meri določena raztopina absorbira svetlobo z merjenjem intenzitete svetlobe, ko svetlobni žarek prehaja skozi raztopino vzorca. Osnovno načelo je, da vsaka spojina absorbira ali oddaja svetlobo v določenem območju valovne dolžine. To metodo lahko uporabljamo tudi za merjenje količine proučevane snovi v vzorcu. Spektrofotometrija se uporablja kot metoda kvantitativne analize na različnih področjih, na primer, kemija, fizika, biokemija, kemijsko inženirstvo ... (Spectrophotometry, 2022)

Spektrofotometrija se razlikuje predvsem glede na vrsto merjene svetlobe in izbiro valovne dolžine instrumenta. Mogoče je uporabiti bodisi UV/Vis (ultravijolično/vidno) svetlobo ali fluorescenčno svetlobo. (Geisler, 2015)

Spektrofotometer je naprava, ki meri količino svetlobe, ki jo neka snov absorbira. Na podlagi količine absorbirane svetlobe lahko izračunamo količino neke snovi v vzorcu, ki ga proučujemo. (Conrad Stöppler, 2021)



Slika 3: Vernier Spektrofotometer (lasten vir)



Slika 4: Kiveta (vir: Biosigma)

2.1.6 Titracija

Titracija je volumetrična metoda kemijske analize. Opredelimo jo kot “postopek določanja količine snovi A z dodajanjem izmerjenih prirastkov snovi B (titranta), s katerim reagira, dokler ni dosežena natančna kemijska enakovrednost (ekvivalentna točka).” (Townshend in Kozak, 2005)

Med pribor, ki ga potrebujemo za titracijo, sodijo pipeta, bireta in čaša. Opravili smo kislinsko-bazno titracijo (nevtralizacijska titracija), kar pomeni da smo določali koncentracijo kislin ali baz (v najinem primeru askorbinske kisline). Pri tej vrsti titracije je indikator snovi, ki lahko obstaja v dveh oblikah: kislinski in bazični, ki se pa razlikujeta po barvi. (Britannica, 2020)

2.1.7 Peteršilj

Peteršilj (*Petroselinum crispum*) je trdoživa dvoletna zel iz družine *Apiaceae*, ki izvira iz sredozemskih dežel. V preteklosti se je uporabljal kot aroma in okras za hrano, sedaj pa se dodajajo k jedem za blag aromatičen okus. Semenska stebila se v svoji rastni dobi dvignejo do enega metra visoko, na vrhu katerih se oblikujejo temno zeleni listi, tudi zelenkasto rumeni majhni cvetovi, ki jim v drugem letu sledijo drobni plodovi. (Britannica, 2021).

Ti temno zeleni listi petersilja so bogat vir vitamina C, vitamina A, železa, joda in magnezija. Uporabljajo se korenine, listi, včasih pa tudi semena za namene tradicionalne medicine, vsebujejo eterična olja, flavonoide, sladkor in škrob. (Grumezescu, Holban, 2017)

2.1.8 Solata

Zelena solata (*Lactuca sativa*) je enoletna rastlina iz družine kobilnic (*Asteraceae*). Znana je po uporabnosti pri pripravi solat, juh in zelenjavnih karijev. Zaradi svojega okusa in visoke hranilne vrednosti je ena najbolj zaužitih zelenih listanih zelednjadnic v surovi obliki. V preteklosti so to zelenjavo gojili že Egipčani, danes pa se pojavlja v sodobni medicini. Rastlino kemično sestavljajo različni sekundarni metaboliti (terpenoidi, flavonoidi in fenoli), prav tako vsebuje tudi vitamine, minerale in organske snovi. (Noumem, idr, 2017)

Listi solate so zeleni, zviti, suhe temperature ali suha tla pa lahko povzročijo grenkobo listov. Sestavljen cvet, znan kot glava rastline je sestavljen iz 7 do 15 listov. Glave so razporejene v razvejano socvetje. Rastlina lahko zraste od 30 do 70 cm v višino. (Flora Fauna Web, 2021)



Slika 5: Navadna solata (*Lactuca sativa*) (lasten vir)

2.1.9 Fotosinteza

Večina življenja na Zemlji je odvisna od fotosinteze. S tem procesom rastline, alge in nekatere bakterije pretvarjajo sončno energijo v kisik in kemično energijo, ki jo le-te shranjujejo v glukozi. Ta kemična energija s pomočjo prehranjevalne verige potuje od rastline, do

rastlinojedca ter do mesojedca. Pri postopku fotosinteze gre za pridobitev ogljikovega dioksida in vode iz zraka ter tal. V rastlinski celici se nato z oddajanjem in prevzemanjem elektronov ogljikov dioksid pretvori v glukozo, voda pa v kisik. Rastlina glukozo shrani za svoje potrebe, kisik pa se sprosti nazaj v okolje. Klorofil je eden izmed pigmentov, ki sodelujejo pri sprejemanju svetlobe. Nahaja se znotraj kloroplasta. Prav zaradi klorofila je rastlina zelena, saj odbija le valove zelene svetlobe. Fotosintezo lahko razdelimo na dve vrsti reakcije. Najprej reakcije odvisne od svetlobe, v katerih ima eno izmed ključnih vlog klorofil in potekajo v tilakoidnih membranah kloroplasta. Tako jih imenujemo, ker zahtevajo konstanten dotok svetlobe. Energija, absorbirana s klorofilom, in drugimi pigmenti se v teh reakcijah pretvorijo v kemično obliko v obliki molekul ATP in NADPH. Druge reakcije so od svetlobe neodvisne. Te so znane kot Calvinov cikel, ki poteka v stromi kloroplasta. V Calvinovem ciklu se energija iz molekul ATP in NADPH uporablja za sestavljanje ogljikovih hidratov kot je glukosa iz ogljikovega dioksida. (Tomažič idr., 2017)

2.2 Hipoteze

Hipoteza št. 1: Predvidevamo, da bo končna količina klorofila (Spad enote) v rastlinah (solata in peteršilj), ki so bile škropljene s CaCl_2 , višja v primerjavi s kontrolno skupino.

Perucka idr. (2013) so ugotovili, da je solata, škropljena z 0,1 M CaCl_2 , imela na koncu višjo vrednost klorofila kot pa tista, ki ni bila škropljena s kalcijevim kloridom. Menimo, da se bo enako zgodilo tudi s peteršiljem.

Hipoteza št. 2: Predvidevamo, da bo pri peteršilju vsebnost vitamina C upadla manj kot pri solati, ne glede na vsebnost CaCl_2 .

Sharaa in Mussa (2019) sta v svoji študiji proučevala upad vitamina C v različnih vrstah zelenjave in zelišč. Peteršilj je po nekaj dneh izgubil približno tretjino vitamina C. Njihove rastline so bile shranjene na višji temperaturi kot bodo naše. Spinardi idr. (2010) so proučevali spremembe kakovosti v solati in špinači med skladiščenjem. Po petih dneh je vsebnost askorbinske kisline v solati drastično upadla za več kot polovico ne glede na temperaturo.

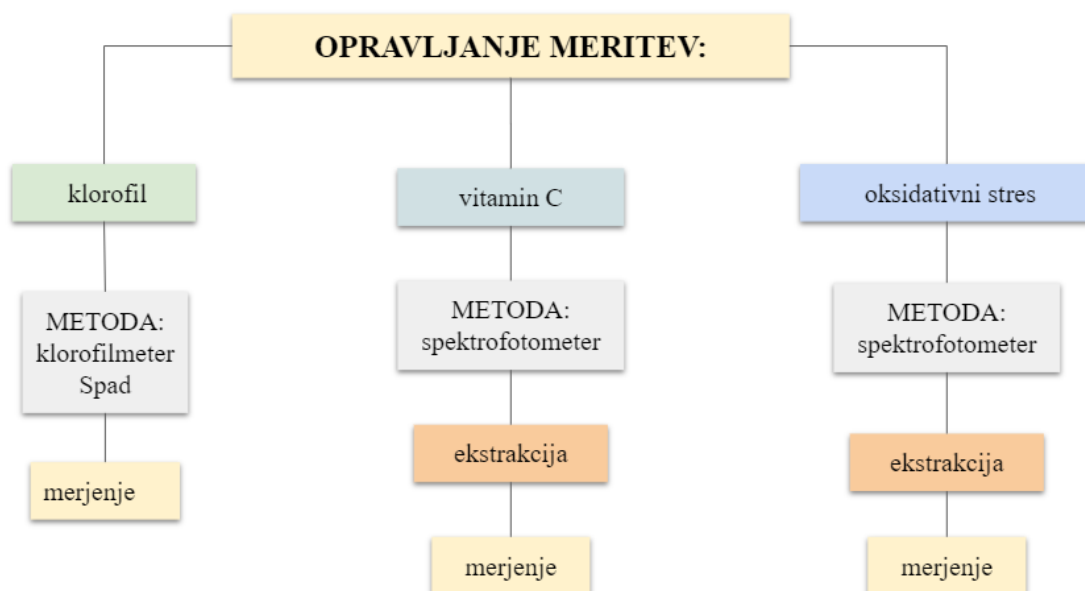
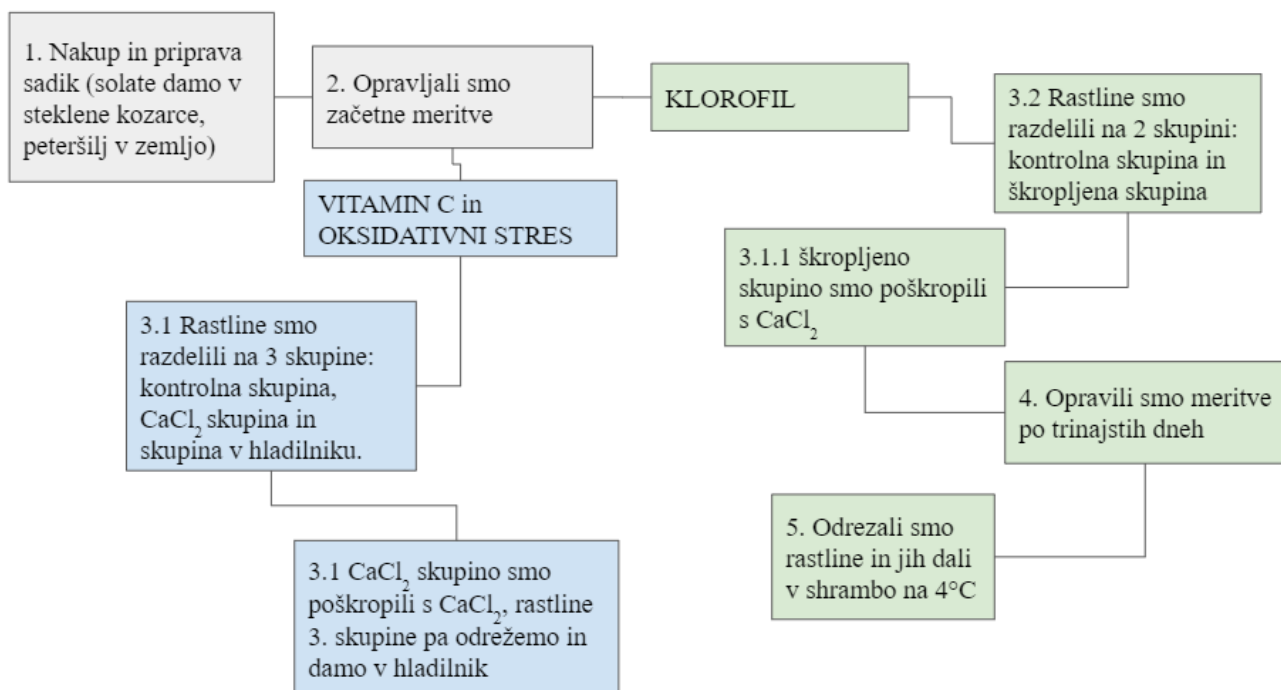
Bahri idr. (2012) so pri solati opazili upad vitamina C za približno petino, vendar je bila njihova solata shranjena pri nižji temperaturi.

Na podlagi izsledkov ostalih študij sklepamo, da bo naša solata izgubila več askorbinske kisline kot peteršilj.

Hipoteza št. 3: Predvidevamo, da bo encimska aktivnost gvajakola peroksidaze (EA, mM/min) nižja pri rastlinah (solata in peteršilj), ki so bila poškrpljena s CaCl₂.

CaCl₂ povečuje moč in debelino celične stene. Tedensko škropljenje s kalcijevim kloridom pred obiranjem sadja lahko zmanjša tudi mehčanje plodov, poškodbe po obiranju ... (Eppendorf NA, 2019) Prav tako ima kalcij sposobnost, da se veže na celično membrano in jo na ta način stabilizira in nadzoruje funkcije, povezane z njo. (Chéour, 1992) Sklepamo, da bodo škropljene rastline zaradi tega imele prednost pred kontrolno skupino.

3. METODOLOGIJA



Slika 6: Hodogram metode (lasten vir)

3.1 Vzorci rastlin

Za našo raziskavo smo uporabili 6 rastlin vsake vrste iz podjetja Panorganix d.o.o, ki se prodajajo pod blagovno znamko »Živa solata«



Slika 7: Izbrane rastline znamke "Živa" (solata in peteršilj), uporabljene za poskus (lasten vir)

3.2 Metoda merjenja klorofila v rastlinah

Naprave in pripomočki:

- Klorofilometer SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter

Postopek:

Za določanje klorofila smo uporabili klorofilometer, ki omogoča merjenje na živi rastlini brez rezanja listov.

Za vsako skupino smo uporabili 5 rastlin: kontrolna skupina – neškropljena in CaCl_2 – škropljena s CaCl_2 . Enako število rastlin smo uporabili za obe vrsti rastlin (solata in peteršilj). Na vsaki rastlini smo meritev izvedli trikrat in zabeležili povprečno vrednost (Spad enote) na vsaki rastlini. Klorofil smo merili po 13., 21. in 23. dneh.

3.3 Metoda merjenja vsebnosti vitamina C

Kemikalije in pribor:

- 15 g solatnih listov
- 15 g peteršilja (stebela in listi)
- destilirana voda
- barvilo za titiranje (2,6-diklorfenol indofenol)
- metafosforna kislina
- askorbinska kislina
- avtomatska pipeta 1000 μ l
- 100 ml merilni valji
- lij
- filtrirni papir
- terilnica in pestilo
- 50 ml bireta
- 100 ml čaše
- tehtnica
- 50 ml erlenmajerice
- 100 ml merilna bučka
- 500 ml merilna bučka
- kapalka
- nož
- deska za rezanje

Postopek:

1. Priprava 2 % metafosforne kisline

Natehtali smo 10 g metafosforne kisline in jo raztopili v približno 300 ml destilirane vode. Ko so se vsi kristali raztopili, smo zmes prelili v 500 ml merilno bučko, dopolnili z destilirano vodo do oznake 500ml in premešali z obračanjem.

2. Priprava askorbinske kisline v metafosforni kislini - standardna raztopina vitamina C

Najprej smo natehtali 50 mg vitamina C in ga raztopili v 30 ml 2% metafosforne kisline, ki smo jo predhodno pripravili. Nato smo raztopino prelili v 100 ml merilno bučko, ter dolili metafosforno kislino do oznake. Na koncu smo premešali z obračanjem.

3. Priprava rastlinskega materiala v metafosforni kislini

15 g rastlinskega materiala smo razrezali na majhne koščke in ga strli v terilnici. Odmerili smo 60 ml 2% metafosforne kisline in jo prilili v terilnico. Zmes smo še naprej trli. Nastali homogenat smo nato prelili v 100 ml merilni valj, skozi filtrirni papir in spirali papir z metafosforno kislino do 100 ml oznake, da smo ohranili čim več rastlinskega materiala. Pripravili smo 4 ekstrakte iz škropljene in neškropljene solate ter iz neškropljenega in škropljenega peteršilja.

4. Titracija askorbinske kisline

Najprej smo pripravili barvilo za titiranje 2,6-diklorfenol indofenol in ga shranili v hladilnik za največ en teden do uporabe.

2 ml standardne askorbinske kisline v metafosforni kislini smo odpipetirali v erlenmajerico. Barvilo smo titirali v erlenmajerico, dokler rožnata barva ni začela zastajati. Titracijo smo za vsak vzorec ponovili trikrat. Kot standard smo uporabili 2 ml askorbinske kisline, saj vsebujeta točno 1 mg vitamina C.

5. titracija vzorcev rastlinskih ekstraktov

Ta metoda za merjenje vsebnosti vitamina C se imenuje Tillmanova titracijska metoda. Titracija vzorcev rastlin je potekala na enak način kot pri standardni raztopini. V 50 ml erlenmajerico smo odpipetirali 10 ml prej pripravljenih rastlinskih vzorcev in titirali, dokler ni barva začela zastajati. Ponovili smo trikrat za vsak vzorec.

Količino vitamina C za vsak vzorec smo izračunali po naslednji formuli:

$$c = m/MxV$$

m=masa rastlinskega materiala

M=molska masa vitamina C

V=volumen porabljenega titra

Izračun za standard:

$$c = 0.05 \text{ g} / 176.12 \text{ g/mol} \times 0.25 \text{ l}$$

$$c = 0.00114 \text{ mol/L}$$

$$c = m / M \times V$$

m=masa askorbinske kisline



Slika 8: Priprava rastlinskih ekstraktov (lasten vir)



Slika 9: Priprava na titracijo (lasten vir)



Slika 10: Rastlinski ekstrakti po titraciji (lasten vir)

(metoda je prirejena po Koudela, 2008)

3.4 Merjenje oksidativnega stresa

Kemikalije in pribor:

- spektrofotometer Vernier VIS-NIR (meri vidno svetlobo)
- prenosni računalnik s programom Logger Pro 3
- centrifuga
- PVC - mikrokivete za enkratno uporabo
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki (LLG Micropipette; 10 - 100 μ L, 100-1000 μ L, 1 - 10 mL)
- čaše (50 ml)
- terilnica s pestilom
- erlenmajerica
- kalijev fosfatni pufer (pH 7)
- gvajakol
- 30% vodikov peroksid
- rastlinski material
- aluminijasta folija
- destilirana voda

Metoda:

Encimsko aktivnost gvajakola peroksidaze smo določali spektrofotometrično. Uporabili smo Vernier Spectrometer (prenosni spektrofotometer), ki deluje na podlagi vidne svetlobe UV-VIS. (Konda, 2012).

50 ml dnevno svežega reagenčnega pufra smo pripravili iz 49,5 ml kalijevega fosfatnega pufra, s pH 7, 0,5 ml gvajakola in 39 µl 30% raztopine vodikovega peroksida. Raztopino smo dobro premešali in stekleničko zavili v aluminijasto folijo, saj je vodikov peroksid občutljiv na svetlobo. Reagenčni pufer smo najprej dali v zmrzovalnik za 10 min, da se je ohladil, nato pa v hladilnik, da je ostal hladen.

Pripravili smo 4 različne ekstrakte za vsako od rastlin, (torej skupaj 8) na način, kot je razvidno iz preglednice 1.

Vsako meritev smo ponovili trikrat.

Preglednica 1: Prikaz vzorcev za določanje encimske aktivnosti

Pogoji	Solata/peteršilj	V nadaljevanju poimenovano
1	Kontrola; rastoče rastline takoj po nabavi	K, 0 dni
2	Kontrola; rastoče rastline po 10-dneh v laboratoriju	K, 10 dni
3	CaCl ₂ ; rastoče rastline poškropljene s CaCl ₂ po 10 dneh	CaCl ₂ , 10 dni
4	Kontrola; Odrezane rastline in 10 dni hranjene v hladilniku pri 4 °C	K, odrezane 10 dni

Rastlinski ekstrakt smo pripravili iz 300 mg listov rastlin, ki smo jih strli v hladni terilnici. Potem smo jim dodali 4,5 ml 100 mM kalijevega fosfatnega pufra s pH 7.

Homogenat smo prelili v označeno mikroepruveto in to 20 min centrifugirali pri 6 000 obratih/min. Nastali supernatant smo prelili v svežo epruveto.

Nato smo izvedli merjenje s spektrofotometrom. Za umeritveni vzorec smo uporabili destilirano vodo. V kiveti smo pripravili testno mešanico iz 900 µl reagenčnega pufra in 100 µl rastlinskega ekstrakta. Mešanico smo hitro premešali in izmerili absorpcijo, pri čemer smo pazili, da je bil čas od mešanja do meritve vedno 20 sekund. Meritve smo ponovili trikrat z

enim rastlinskim ekstraktom. Meritve so potekale 1 min, zbiranje podatkov je bilo nastavljeno na 20 vzorcev/min. Izbrali smo najbolj linearen del krivulji in zabeležili spremembo absorpcije v minuti (slope; m). Iz te vrednosti smo po spodnji enačbi izračunali encimsko aktivnost (EA)

$$\text{Izračun encimske aktivnosti: } EA = \frac{\Delta A/\text{min}}{\varepsilon \times l}$$

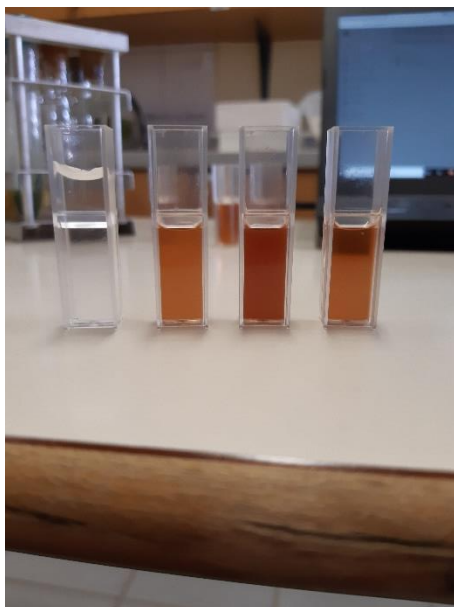
$\Delta A/\text{min}$ = sprememba absorpcije v eni minuti

l = debelina kivete (1 cm)

ε = ekstinkcijski koeficient tetraguaiakola pri 470 nm = 26,6/mM \times cm



Slika 11: Vzorca solate in peteršilja po centrifugiranju (lasten vir)



Slika 12: Vzorca po merjenju encimske aktivnosti gvajakola (lasten vir)

3.5 Statistična analiza

Za vse meritve smo izračunali povprečne vrednosti in izračunali standardne deviacije, ki so mera variabilnosti naših podatkov.

4. REZULTATI

4.1 Rezultati vsebnosti klorofila

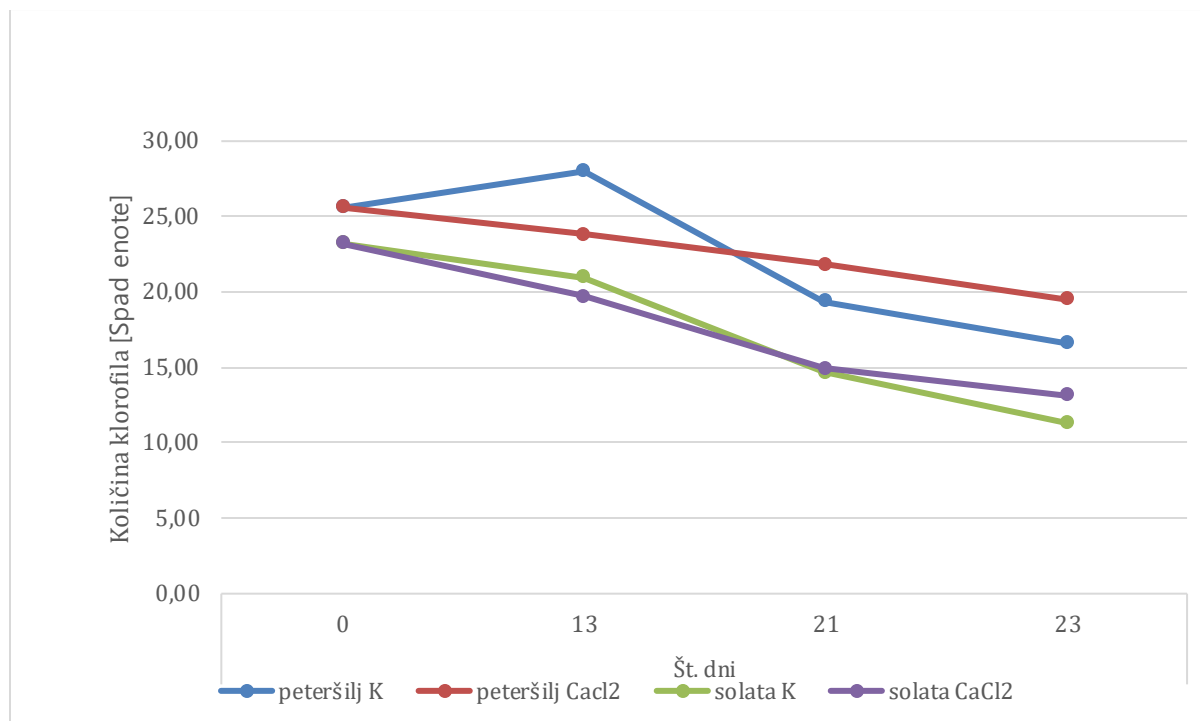
V preglednici 1 so vpisane vrednosti klorofila v Spad enotah in njihove standardne deviacije, glede na to koliko dni je preteklo od škropljenja s CaCl₂ (0, 13, 21 ali 23 dni). Vrednosti so izmerjene pri različnih neodvisnih spremenljivkah – peteršilj K (pomeni kontrolna; neškropljena skupina), peteršilj CaCl₂ (skupina, škropljena s kalcijevim kloridom). Enako velja za vrsto rastlin solate.

Iz rezultatov na grafu 1 in v preglednici 1 vidimo, da je pri obeh rastlinah, ki sta bili škropljeni s CaCl₂ višji nivo klorofila po 23. dneh. Po dodanih standardnih deviacijah opazimo večjo variabilnost podatkov, zato ne moremo trditi, da so razlike statistično pomembne.

Preglednica 2: Količina klorofila (Spad enote) pri peteršilju in solati po dneh merjenja pri različnih pogojih

Skupina	Vsebnost klorofila (v Spad enotah)			
	Št. dni			
	0	13	21	23
peteršilj K	25,60 ± 0,08	28,00 ± 1,88	19,40 ± 1,58	16,60 ± 1,89
peteršilj CaCl ₂	25,60 ± 0,08	23,80 ± 0,64	21,83 ± 3,04	19,50 ± 2,01
solata K	23,21 ± 1,62	20,97 ± 2,62	14,68 ± 5,23	11,32 ± 4,86
solata CaCl ₂	23,20 ± 0,00	19,73 ± 0,62	14,90 ± 0,73	13,13 ± 0,06

Graf 1: Količina klorofila (Spad enote) pri peteršilju in solati v različnih dneh merjenja pri različnih pogojih



4.2 Rezultati vsebnosti vitamina C

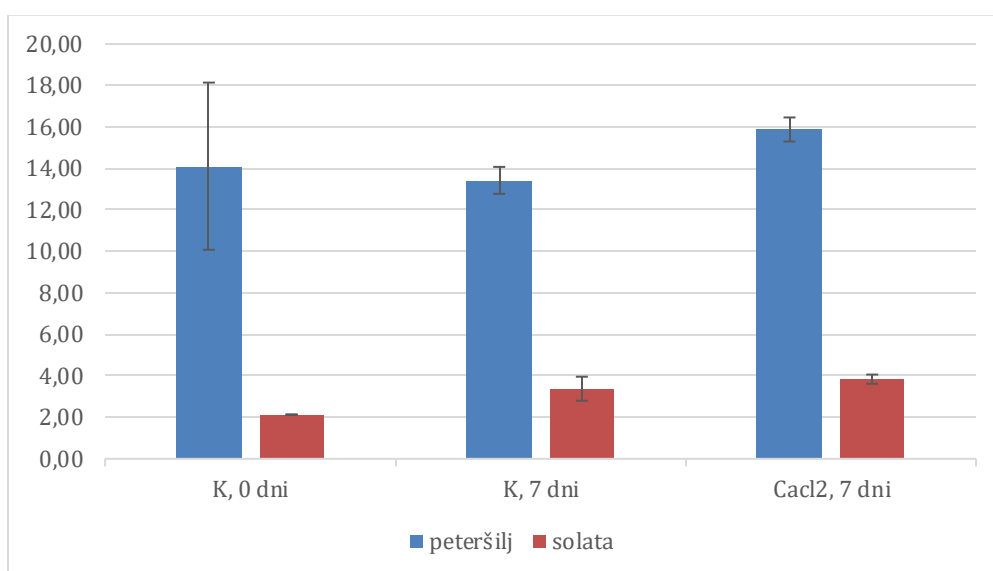
V preglednico 2 so z enoto mg/100g začetne mase vpisana povprečja treh meritev glede na vrsto rastline. Vse meritve, ki smo jih naredili so vključene v prilogo x. Vrednosti so izmerjene pri različnih neodvisnih spremenljivkah: peteršilj K, 0 dni (kontrolna skupina, na začetku), peteršilj K, 7 dni (kontrolna skupina, neškropljena skupina po sedmih dneh od prve meritve), peteršilj CaCl₂ (skupina, škropljena s kalcijevim kloridom po sedmih dneh od prve meritve). Enako velja za vrsto rastlin solate.

Iz rezultatov na grafu 2 in v preglednici 2 vidimo, da je pri obeh rastlinah, ki sta bili škropljeni s CaCl₂, višji nivo vitamina C po sedmih dneh. Po dodanih standardnih deviacijah pri solati opazimo večjo variabilnost podatkov, zato ne moremo trditi, da so razlike statistično pomembne. Pri peteršilju gre za večjo razliko med kontrolno skupino po sedmih dneh in skupino, ki smo ji dodali CaCl₂ po sedmih dneh in manjšo standardno deviacijo, zato lahko to razliko opredelimo kot statistično pomembno.

Preglednica 3: Primerjava povprečij količine vitamina C (mg/100g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih. Intervali napak predstavljajo standardne deviacije.

	Peteršilj	Solata
	mg/100g	
K, 0 dni	14,11 ± 4,03	2,13 ± 0,00
K, 7 dni	13,43 ± 0,65	3,38 ± 0,58
CaCl ₂ , 7 dni	15,88 ± 0,58	3,84 ± 0,22

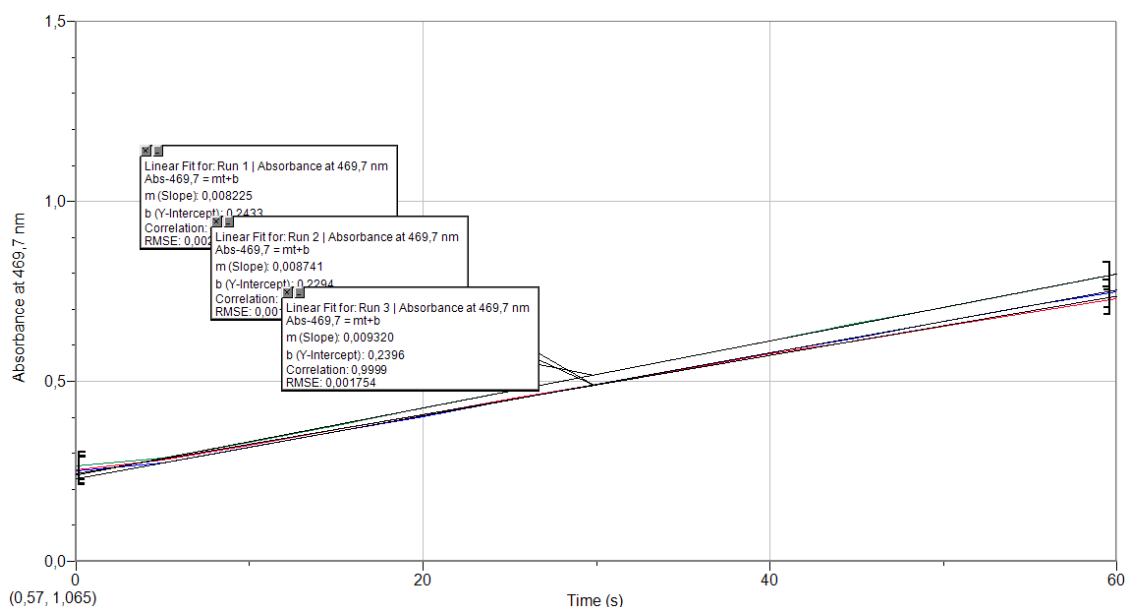
Graf 2: Primerjava količine vitamina C (mg/100g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih. Intervali napak predstavljajo standardne deviacije.



4.3 Rezultati encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze

Spodnji graf 3 nam prikazuje primer merjenja v programu Logger pro in določitev vrednosti slope (m).

Graf 3: Primer merjenja v programu Logger pro



V preglednico 4 smo vpisali encimsko aktivnost encima gvajakola peroksidaze (mM/min) pri različnih skupinah rastlin (K, 0 dni – kontrolna skupina na dan 0, torej ko smo rastline komaj dobili, K 10 dni – kontrolna skupina po desetih dneh, CaCl₂, 10 dni – rastline, škropljene s CaCl₂, K odrezan 10 dni – kontrolna skupina, rastline shranjene na 4°C po desetih dneh).

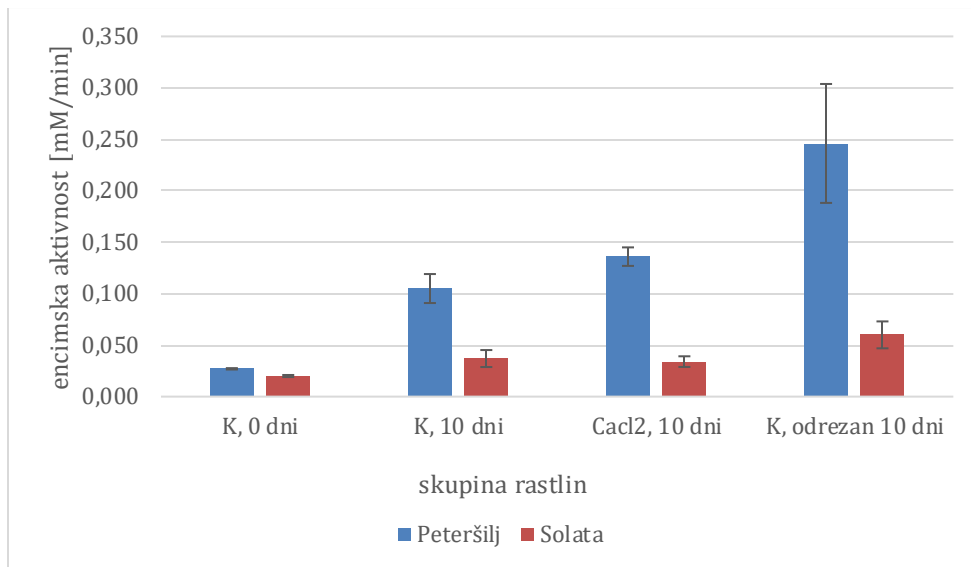
V preglednici 4 in na grafu 4 lahko vidimo, da so vrednosti pri peteršilju po desetih dneh zelo narasle, vendar je pri zadnji skupini tudi zelo visoka standardna deviacija, zaradi česar ne moremo trditi, da so razlike statistično pomembne.

Po drugi strani so vrednosti pri solati zelo nizke, vendar so po desetih dneh vseeno narasle, ne glede na uporabo kalcijevega klorida. Standardne deviacije pri solati niso visoke, tako da lahko razlike opredelimo kot statistično pomembne.

Preglednica 4: Encimska aktivnost gvajakola peroksidaze (mM/min) pri solati in peteršilju pri različnih pogojih. Intervali napak prikazujejo standardne deviacije.

	Peteršilj	Solata
	Encimska aktivnost (mM/min)	
K, 0 dni	0,027 ± 0,001	0,020 ± 0,001
K, 10 dni	0,105 ± 0,014	0,037 ± 0,008
Cacl ₂ , 10 dni	0,136 ± 0,009	0,034 ± 0,005
K, odrezan 10 dni	0,246 ± 0,058	0,060 ± 0,013

Graf 4: Encimska aktivnost gvajakola peroksidaze (mM/min) pri solati in peteršilju pri različnih pogojih. Intervali napak prikazujejo standardne deviacije.



5. DISKUSIJA

Vsebnost klorofila je pri vseh odrezanih rastlinah upadala, kar je pričakovano. Managa idr. (2018) v svoji študiji navajajo, da je izguba klorofila predvsem posledica staranja, ki je povezano z izgubo membranskih lipidov in beljakovin, kar vodi do strukturnih sprememb in celične smrti.

Vsebnost klorofila je pri rastlinah (tako pri peteršilju kot solati), ki so bile škropljene s CaCl_2 po 23. dneh pričakovano višja kot pri neškropljenih rastlinah. Razlike pa ne moremo vzeti zanesljivo kot statistično pomembne, saj izračunane standardne deviacije kažejo večjo variabilnost podatkov. Za bolj zanesljive podatke bi najverjetneje potrebovali večji vzorec rastlin. Rezultat se kljub temi sklada z rezultati iz Perucka idr. (2013), ki pravi, da je vsebnost klorofila v listih solate bila višja pri škropljenih rastlinah kot pri kontrolni skupini. Opazili smo, da je vrednost klorofila v škropljenih solatah upadala veliko bolj linearno kot pri kontrolni skupini, kar je nasprotno od rezultatov Perucke idr. (2013). Sklepamo, da je razlog v tem, da smo mi rastline najprej pustili še približno dva tedna posajene in na sobni temperaturi, Perucka idr. (2013) pa so jih odrezali in takoj dali v hladilnik. Razlike med našimi in njihovimi rezultati si razlagamo na podlagi različnih pogojev. Njihove rastline so bile shranjene pri boljših pogojih, ki jih mi rastlinam nismo mogli zagotoviti. Poleg tega so naše solate zaradi vlage nekoliko začele gniti na zunanjih listih. To pomeni večjo izgubo klorofila.

Po 23. dneh je kontrolna skupina peteršilja ohranila 65 % začetne vrednosti klorofila, škropljena pa 76 %. Pri solati je razlika vsebnosti klorofila manjša, kontrolna skupina je ohranila 49 % začetnega klorofila, škropljena pa 57 %. Podobna opažanja so zapisali tudi Eugène idr. (2019), ki so proučevali vsebnost klorofila v bananah po škropljenju s CaCl_2 . Analiza njihovih podatkov je pokazala, da v celotnem poskusu ni bilo pomembne razlike med vsebnostjo klorofila v lupini škropljenih banan in v kontrolni skupini. Vrednosti klorofila v škropljenih bananah so bile le malo višje od vsebnosti v kontrolni skupini.

Sklepamo, da je upad klorofila počasnejši pri škropljenih rastlinah zaradi kalcija (v škropivu CaCl_2), saj ta povečuje moč in debelino celične stene. Tedensko škropljenje s kalcijevim kloridom pred obiranjem sadja lahko zmanjša tudi mehčanje plodov, poškodbe po obiranju ... (Eppendorf NA, 2019) Prav tako ima kalcij sposobnost, da se veže na celično membrano in jo na ta način stabilizira in nadzoruje funkcije povezane z njo. (Chéour, 1992)

Hipoteza 1 se glasi, da bodo imele škropljene rastline (solata in peteršilj) na koncu višjo vrednost klorofila kot neškropljene rastline. Glede na dobljene rezultate lahko hipotezo potrdimo. Škropljeni peteršilj je imel na koncu približno 10 % klorofila več, kot kontrolna skupina, škropljena solata pa 8 %. Za večjo zanesljivost bi bilo potrebno ponoviti poskus z večjim vzorcem, predvsem pa rastline gojiti v času za rast ugodne sezone, kar zimski čas ni bil.

Predvidevali smo, da se bo rastlinam vsebnost vitamina C po sedmih dneh zmanjšala, tako pri peteršilju, kot pri solati. V predhodnih raziskavah na to temo, kot so prej omenjene Spinardi idr. (2010), Sharaa in Mussa (2019) in Bahri idr. (2012), je upad vitamina C v določenem časovnem obdobju potrjen, ne glede na vrsto rastline pri raziskavi ali druge pogoje, kot je temperatura shranjevanja.

Kot razvidno iz rezultatov na grafu 2 za peteršilj lahko vidimo, da se tako pri kontrolni skupini po sedmih dneh, kot pri skupini CaCl_2 , po sedmih dneh vsebnost vitamina C ni zmanjšala, če upoštevamo standardno deviacijo glede na začetno stanje. Opazimo pa statistično pomembno razliko v koncentraciji vitamina C po sedmih dneh pri škropljenem peteršilju v primerjavi s kontrolo. Škropljene rastline so imele višjo koncentracijo vitamina C. Iz tega je razvidno, da je kalcijev klorid vplival zaviralno na razpad vitamina C v časovnem obdobju sedmih dni.

Meritve vitamina C pri solati ne kažejo razlike po sedmih dneh po škropljenju ali pri kontroli. Pomembno je poudariti, da so bile koncentracije vitamina C v solati tako nizke, da je bila ta metoda njegovo določanje manj zanesljiva.

Po primerjanju podatkov o vsebnosti vitamina C v časovnem obdobju sedmih dni pri solati in peteršilju lahko ugotovimo, da gre za zelo podobne razlike v upadu vitamina C. Pri peteršilju je kontrolna skupina imela manjšo spremembo vitamina C kot solata. Pri rastlinah, ki so vsebovale kalcijev klorid, pa je bila razlika za 0,06 g/100 mg večja pri peteršilju kot pri solati.

Naša hipoteza 2 se glasi, da se bo pri peteršilju vsebnost vitamina C upadla manj kot pri solati, ne glede na vsebnost CaCl_2 . To hipotezo smo na podlagi pridobljenih rezultatov potrdili, saj je razlika med škropljenimi rastlinami in kontrolno skupino peteršilja po sedmih dneh statistično pomembna.

Encimska aktivnost gvajakola peroksidaze je bila povsem različna pri solati in pri peteršilju. Že ob prvi meritvi na dan 0 je imel peteršilj rahlo višje delovanje encima gvajakola peroksidaze, kar pomeni, da je bil bolj pod stresom. Po desetih dneh je pri vseh rastlinah (tako solati, kot peteršilju) encimska aktivnost narasla, vendar opazno bolj pri peteršilju, pri vseh skupinah rastlin (kontrolni in škropljeni).

Razlike med solato in peteršiljem so presenetljive, prav tako pa nasprotne od trditev Osredkar (2012), ki pravi, da je vitamin C dober lovilec ROS in bi tako moral znižati raven oksidativnega stresa. Po rezultatih ravni vitamina C v solati in peteršilju vemo, da so naše rastline peteršilja imele veliko višjo raven vitamina C kot pa rastline solate. Še dodatno, so nekatere klinične študije pokazale pomemben antioksidativen učinek peteršilja. (Oh, idr., 2022). Razlike med oksidativnim stresom solate in peteršilja si tako lahko razlagamo le na podlagi slabih pogojev pri peteršilju, tudi fiziološke značilnosti pri odrezanem peteršilju so bile slabše, kot pri odrezani solati, peteršilj je bil precej dehidriran. Sklepamo, da je imel peteršilj slabši dotok do kisika, ko je bil shranjen v vreči, kot solata in je bil zato bolj pod stresom.

Pri solati je raven encimske aktivnosti bila enaka pričakovani. Predvidevali smo, da bodo po desetih dneh solate škropljene s CaCl_2 imele nižjo aktivnost gvajakola peroksidaze, kot neškropljene solate, zaradi delovanja Ca^{2+} kationa v škropivu CaCl_2 , saj ta povečuje moč in debelino celične stene (Eppendorf NA, 2019) ter stabilizira celično membrano (Chéour, 1992). Sklepamo, da so bile prav zaradi tega razloga škropljenje solate manj pod stresom.

Kontrolni skupini se je po desetih dneh zvišala encimska aktivnost, kar je bilo pričakovano. Solate so bile pri nas gojene pri slabših pogojih, kot preden smo jih kupili, zato so bile bolj pod stresom.

Povprečna raven encimske aktivnosti se pri kontrolni skupini peteršilja skoraj ni spremenila, vendar se je visoka standardna deviacija zaradi česar ne moremo razlik opredeliti kot statistično pomembnih. Za bolj zanesljive rezultate bi morali meritve ponoviti večkrat in na več rastlinah.

Oksidativni stres povzroči dotok Ca^{2+} v citoplazmo iz zunajceličnega okolja. Povečanje koncentracije Ca^{2+} v citoplazmi povzroči dotok Ca^{2+} v mitohondrije in jedra. V mitohondrijih Ca^{2+} pospešuje in moti normalno presnovo, kar vodi v celično smrt. (Ermak in Davies, 2002)

Sklepamo, da je se je oksidativni stres pri peteršilju povečal zaradi foliarnega dodajanja CaCl_2 , saj je s tem bilo več Ca^{2+} ionov, ki so vdrlji v celice, torej so bile celice bolj pod stresom.

Naša Hipoteza 3 pravi, da bo encimska aktivnost gvajakola peroksidaze nižja pri rastlinah, ki so bile škropljene s CaCl_2 . Hipotezo za peteršilj in tudi solato ovržemo, saj pri solati gre za veliko variabilnost podatkov.

6. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Živila, ki ne ustreza zahtevanim tržnim standardom, pogosto zavrnejo. Zavrtnjeni izdelki nato pristanejo na odlagališčih, kjer predstavljajo slabo razgradljive odpadke, saj se zaradi drugih nerazgradljivih snovi, onesnaženosti in toksičnosti izdelkov ne morejo pravilno razgraditi, zaradi česar nastaja več metana in ogljikovega dioksida.

Z upočasnjevanjem upadanja hranilnih snovi v zelenjavi obstaja večja možnost, da bo izdelek ustrezal tržnim standardom in ne bo poslan na odlagališča.

V naši raziskovalni nalogi smo ugotavljali kako bi lahko izboljšali kakovost določenih vrst zelenjave od mesta gojenja do krožnika. Ugotovili smo, da je kalcijev klorid sicer povešal vsebnost klorofila in do določene mere tudi vitamin C, vendar povešal nastanek stresnih pogojev. Kalcijev klorid bi lahko zamenjal nekatera škropiva, ki so bolj nevarna okolju, seveda pa bi bilo potrebno narediti še več raziskav o vplivu tega škropiva na druge komponente rastlin in na okolje.

Da bi lahko odgovorili na vprašanje, ali bi kalcijev klorid lahko bil učinkovit kot sredstvo za škropljenje, bilo potrebno narediti še več raziskav in izmeriti več parametrov vpliva na rastline, saj že naša raziskava kaže kompleksnejši učinek, ki si ga težje razlagamo.

Prav tako smo med eksperimentalnim delom opazili kako hitro propadajo rastline solate in peteršilja, sploh če jih imamo shranjene pri neustreznih pogojih. Med merjenjem klorofila smo pokazali, da nepravilno shranjevanje zelenjave in zelišč vodi do veliko hitrejšega propada rastlin (našim rastlinam je vsebnost klorofila upadla hitreje kot rastlinam drugih raziskovalcev), kar je pa pomeni tudi več zavržene hrane. Vsak posameznik lahko poskrbi, da zelenjavo, ki jo kupi, uporabi čim hitreje, dokler je še sveža, prav tako je pomembno, da jo pravilno shranjuje najbolje na hladnem. Pomembno je tudi, da kupujemo lokalno, saj tako zelenjava ostane bolj sveža in je manjša verjetnost, da bi jo zaradi tega, ker je propadla, zavrgli.

7. ZAKLJUČEK

Cilj naše raziskovalne naloge je bil kalcijev klorid vpliva na fiziološke in biokemijske lastnosti solate in peteršilja. Vsebnost klorofila v rastlinah smo merili s Spad klorofilmetrom. Ugotovili smo, da je vrednost klorofila upadala počasneje in bolj linearno pri škropljenih solatah, kar se je skladalo z našimi pričakovanji, kar pomeni, da škropljenje s kalcijevim kloridom pomaga pri ohranjanju vrednosti klorofila.

Vitamin C smo merili s titracijo. Opazili smo, da se je po škropljenju raven vitamina zvišala, kar se sklada z našo hipotezo.

Merjenje encimske aktivnosti gvajakola peroksidaze je potekalo spektrofotometrično. Encimska aktivnost kaže na oksidativni stres. Naše rastline peteršilja so bile pod veliko večjim stresom kot solata. Oksidativni stres je pri škropljenem peteršilju bil višji po desetih dneh kot pri kontrolni skupini, kar se ne sklada z našo hipotezo. Kontrolna skupina solate je imela rahlo višjo raven oksidativnega stresa, vendar zaradi standardnih deviacij ne moremo z gotovostjo potrditi ali ovreči naše hipoteze.

Naši rezultati so torej zelo različni, v primeru klorofila je foliarno dodajanje kalcijevega klorida pripomoglo k rastlinam, prav tako v primeru vitamina C. Oksidativni stres pa je bil višji pri škropljenih rastlinah. Za natančnejše in zanesljivejše rezultate bi morali opraviti več meritev, najboljše na več rastlinah.

Na vprašanje, ali kalcijev klorid izboljša fiziološke in biokemijske lastnosti solate in ali lahko podaljša življenjsko dobo rastlin, ne moremo z gotovostjo odgovoriti zaradi tako različnih rezultatov. Prav tako bi bilo potrebno narediti več raziskav na temo vpliva kalcijevega klorida na druge komponente rastlin in na okolje.

Nadaljnje raziskave bi lahko usmerili v različne oblike transporta, ki se uporabljajo za prevažanje zelenjave preko oceanov in celin. S tem bi ugotovili katera oblika transporta je najboljša za rastline, je najcenejša in najboljša za okolje.

Zanimivo bi bilo tudi, če bi proučevali katera naravna ali doma narejena škropiva so najboljša za rastline. S tem bi lahko odkrili nove, boljše načine, da bi rastline preživele dlje časa v našem hladilniku.

Transport lahko na živila vpliva zelo slabo in skrajša njihov rok trajanja, zaradi slabih pogojev in slabega ravnanja z zelenjavo, sadjem ... Na vprašanje, ali je smiselno prodajati zelenjavo preko oceanov, težko odgovorimo, saj ne poznamo ekonomskih vidikov. Menimo, da je kupovanje lokalno veliko boljše za rastline kot tudi za nas. Rastline, ki opravijo krajšo pot od »polja do krožnika«, ohranijo višjo vrednost hranilnih snovi, ki so pomembne za človeka. S tem je tudi manj zavržene hrane, zato toliko bolj podpiramo lokalno kupovanje hrane.

8. VIRI

- Apáti, P., Szentmihályi, K., Kristó, S., Papp, I., Vinkler, P., Szoke, É., in Kéry, Á. (2003). Herbal remedies of Solidago—correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4–5). [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00207-3](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00207-3)
- Bahri H. M., Niari S. M. in Rashidi M. (2012). Effect of Chemical Materials Application and Storage Periods on Vitamin C of Lettuce During Cold Storage. *World Applied Sciences Journal* 19 (8): 1216-1220.
- Bartosz, G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s11738-997-0022-9>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2019, November 28). Chlorosis. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/chlorosis-plant-disease>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2021, July 25). parsley. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/parsley>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2020, May 6). titration. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/titration>
- Britannica. Vitamin C. Britannica Library. Citirano 21. Decembra 2021, iz <https://library-eb-co-uk.eviri.ook.sik.si/levels/adult/article/vitamin-C/75556>
- Britannica Chlorophyll. Britannica Library. <https://library-eb-co-uk.eviri.ook.sik.si/levels/adult/article/chlorophyll/82254>
- Chéour, F., Arul, J., Makhlof, J., in Willemot, C. (1992). Delay of Membrane Lipid Degradation by Calcium Treatment during Cabbage Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 100(4), 1656–1660. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1656>

- Conrad Stöppler, M. (2021, March 29). Medical Definition of Spectrophotometer. MedicineNet. Retrieved February 16, 2022, from <https://www.medicinenet.com/spectrophotometer/definition.htm>
- Eppendorf NA. (2019, February 14). The Importance of Flexibility in Spectrophotometry. News-Medical.Net. <https://www.news-medical.net/news/20151201/The-importance-of-flexibility-in-spectrophotometry-an-interview-with-Jessica-Geisler.aspx>
- Ermak, G., in Davies, K. J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular immunology*, 38(10), 713–721. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00108-0)
- Eugène, P. T., Ovaric, K. J., & Jean, A. N. (2019). Effects of Calcium Chloride Treatment on the Photosynthetic Capacity and Intensity of Banana Fruit during Ripening. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 1–9. <https://doi.org/10.9734/jabb/2019/v21i430098>
- Flora Fauna Web. *Lactuca sativa*. (2021). NParks. <https://www.nparks.gov.sg/florafauweb/flora/5/9/5959>
- Geisler, J., PhD, in Thompson, T. (2015). Choosing the Best Detection Method: Absorbance vs. Fluorescence. Biocompare Bench Tips. <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/173963-Choosing-the-Best-Detection-Method-Absorbance-vs-Fluorescence/>
- Glimn-Lacy, J., in Kaufman, P. B. (2006). *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families* (2nd ed.). Springer.
- Gojkošek, M. (2012). Analiza uporabe vitaminov in vitaminskih dopolnil. [Diplomsko delo]. Univerza na Primorskem, Fakulteta za management. Repozitorij univerze na Primorskem: http://www.ediplome.fm-kp.si/Gojkosek_Matjaz_20121207.pdf
- Grumezescu, A. M., in Holban, A. M. (2017). *Ingredients Extraction by Physico-Chemical Methods in Food*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Habjan Dovč, M. (2006). Vsebnost vitamina C in nitrata v radiču. [Diplomsko delo]. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Digitalna knjižnica univerze v Ljubljani: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_habjandovc_meta.pdf

- Jerše, K.. (2012). *Vsebnost klorofila v listih koruze (Zea Mays L.) nekaterih novih Lj - križancev*. [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Digitalna knjižnica Biotehniške fakultete. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dv1_jerse_katarina.pdf
- Kolahi, M., Mohajel Kazemi, E., Yazdi, M., in Goldson-Barnaby, A. (2020). Oxidative stress induced by cadmium in lettuce (*Lactuca sativa* Linn.): Oxidative stress indicators and prediction of their genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 71–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.032>
- Konda, D. (2012). *Biološka aktivnost ekstraktov zlate rozge (Solidago spp.)*. [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Digitalna knjižnica Biotehniške fakultete. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_konda_darja.pdf
- Koudela, M. In Petříková, K. (2008). Nutritional composition and yield of endive cultivars – *Cichorium endivia* L. *Horticultural Science*, 34(No. 1), 6–10. <https://doi.org/10.17221/1848-hortsci>
- Krishnamurthy, A., in Rathinasabapathi, B. (2013). Oxidative stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10). <https://doi.org/10.4161/psb.25761>
- Li, Z., Tan, X. F., Lu, K., Liu, Z. M., in Wu, L. L. (2017). The effect of CaCl₂ on calcium content, photosynthesis, and chlorophyll fluorescence of tung tree seedlings under drought conditions. *Photosynthetica*, 55(3), 553–560. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0676-x>
- Managa, M. G., Tinyani, P. P., Senyolo, G. M., Soundy, P., Sultanbawa, Y., in Sivakumar, D. (2018). Impact of transportation, storage, and retail shelf conditions on lettuce quality and phytonutrients losses in the supply chain. *Food Science & Nutrition*, 6(6), 1527–1536. <https://doi.org/10.1002/fsn3.685>
- Masten, J. (2017). *Parametri kakovosti solate, paradižnika in paprike iz trgovin*. [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij univerze v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=104298&lang=slv>

- Mayo Clinic Staff. (2020, November 17). *Vitamin C*. Mayo Clinic. Citirano December 13, 2021, od <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-vitamin-c/art-20363932>
- Mezeyová, I., Valšíková, M., Rehuš, M., in Šlosár, M. (2016). Changes of vitamin C content in celery and parsley herb after processing. *Potravinárstvo*, 10(1). <https://doi.org/10.5219/687>
- Moraes, F. A., Cota, A. M., Campos, F. M., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2010). Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15(1), 51–62. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232010000100010>
- Mussa, Samira in Elsharaa, Intisar. (2019). Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Contents in Vegetable Samples by UV-Spectrophotometry and Redox Titration Methods and Estimation the Effect of Time, Cooking and Frozen on Ascorbic Acid Contents. 15. 281-293.
- NCI Dictionary of Cancer Terms*. (2021). National Cancer Institute. Retrieved December 14, 2021, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/reactive-oxygen-species>
- Noumedem, J., Djeussi, D., Hritcu, L., Mihasan, M., in Kuete, V. (2017). *Lactuca sativa. Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809286-6.00020-0>
- Oh, E. S., Peterson, K. S., Kris-Etherson, P. M., in Rogers, C. J. (2022). Role of dietary spices in modulating inflammation and oxidative stress. In *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress* (1st ed., pp. 545–580). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-05479-9>
- Osredkar, J. (2012). Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik*, (81), 393-406. <https://www.researchgate.net/publication/232279181>
- Paciolla, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Paradiso, A., de Leonardis, S., Mastropasqua, L., in de Pinto, M. C. (2019). Vitamin C in Plants: From Functions to Biofortification. *Antioxidants*, 8(11), 519. <https://doi.org/10.3390/antiox8110519>

- Perucka, I., Olszówka, K., in Chilczuk, B. (2014). Changes in the chlorophyll content in stored lettuce *Lactuca sativa* L. after pre-harvest foliar application of CaCl₂. *Acta Agrobotanica*, 66(4), 137–142. <https://doi.org/10.5586/aa.2013.060>
- Serea, C., Barna, O., Manley, M., in Kidd, M. (2014). Effect of storage temperature on the ascorbic acid content, total phenolic content and antioxidant activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24, 1173-1177.
- Shiri, M. A., Ghasemnezhad, M., Fatahi Moghadam, J., in Ebrahimi, R. (2015). Effect of CaCl₂ Sprays at Different Fruit Development Stages on Postharvest Keeping Quality of “Hayward” Kiwifruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4), 624–635. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12642>
- Sitarek-Andrzejczyk, M., Przybył, J., in Gajewski, M. (2018). THE EFFECT OF POST-HARVEST TREATMENT AND STORAGE CONDITIONS ON VITAMIN C CONTENT IN TWO LEAFY PARSLEY CULTIVARS. *Proceedings of International Scientific Conference “RURAL DEVELOPMENT 2017.”* <https://doi.org/10.15544/rd.2017.018>
- Spectrophotometry. (2022, January 3). <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431>
- Spinardi, A., & Mignani, I. (2018). Ascorbic acid content and senescence in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during storage. *Advances in Horticultural Science*, 32(3), 335–342. <https://www.jstor.org/stable/26613262>
- Tomažič, I., Zidar, P., Koce, J. D., Ambrožič, J., Štrus, J., Sedmak, A., Kostanjšek, R., Valant, J., Gostinčar, C., Bizjak-Mali, L., in Hrovatin, P. (2018). *Biologija 1. Mladinska knjiga Založba*. ISBN: 9789610121015
- Townshend, A. (2005). TITRIMETRY | Overview. *Encyclopedia of Analytical Science*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00625-7>
- Xu, C., Li, X., in Zhang, L. (2013). The Effect of Calcium Chloride on Growth, Photosynthesis, and Antioxidant Responses of *Zoysia japonica* under Drought Conditions. *PLoS ONE*, 8(7), e68214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068214>

Youssef, S., Abd Elhady, S., Abu El-Azm, N., in El-Shinawy, M. (2017). Foliar Application of Salicylic Acid and Calcium Chloride Enhances Growth and Productivity of Lettuce (*Lactuca sativa*). *Egyptian Journal of Horticulture*, 44(1), 1–16.

<https://doi.org/10.21608/ejoh.2017.892.1000>

Zelman, K. M. (2008, April 8). *The Benefits of Vitamin C*.

WebMD. <https://www.webmd.com/diet/features/the-benefits-of-vitamin-c#1>

8.1 Viri slik

Struktura molekule klorofila. (2020). [Fotografija].

<https://www.researchgate.net/publication/347762102/figure/fig2/AS:974104400257036@1609255995649/The-chemical-structure-of-typical-chlorophyll-molecule-Chlorophyll-a-contains-methyl.png>

Struktura molekule vitamina C. (2021). [Fotografija]. <https://cdn.britannica.com/21/13821-004-7DEA4076/Vitamin-C-Ascorbic-Acid.jpg>

Kiveta. (2020). [Fotografija].

<https://www.biosigma.com/media/catalog/product/cache/1/image/500x/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/0/1084-1.jpg>

9. PRILOGE

9.1 Priloga 1:

Opravljene meritve količine klorofila (Spad enote) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih.

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, 0 dni		
1	0,028	0,019
2	0,027	0,020
3	0,026	0,021
POVPREČJE	0,027	0,020
STAND DEVIACIJA	0,001	0,001

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, 10 dni		
1	0,097	0,028
2	0,096	0,039
3	0,121	0,044
POVPREČJE	0,105	0,037
STAND DEVIACIJA	0,014	0,008

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
CaCl ₂ , 10 dni		
1	0,129	0,030
2	0,146	0,033
3	0,133	0,040
POVPREČJE	0,136	0,034
STAND DEVIACIJA	0,009	0,005

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, odrezan		
1	0,207	0,051
2	0,219	0,075
3	0,312	0,055
POVPREČJE	0,246	0,060
STAND DEVIACIJA	0,058	0,013

9.2 Priloga 2:

Primerjava povprečij količine vitamina C (mg/g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih.

mg/100g		
	peteršilj	solata
K, 0 dni	14,11	2,13
K, 10 dni	13,43	3,38
CaCl ₂ , 10 dni	15,88	3,84
K, odrezan	24,21	3,10

Opravljenе meritve količine vitamina C (mg/100g) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih.

vitamin C, K, 0 dni	peteršilj	solata
mg/100g		
1	0,198	0,014
2	0,109	0,014
3	0,116	0,014
povprečje	0,141	0,014
stand deviacija	0,040	0,000

Vitamin C, K, 7 dni	peteršilj	solata
mg/100g		
1	0,130	0,028
2	0,144	0,032
3	0,130	0,042
povprečje	0,134	0,034
stand deviacija	0,007	0,006

Cacl ₂ , 7 dni	peteršilj	solata
mg/100g		
1	0,153	0,042
2	0,167	0,037
3	0,157	0,037
povprečje	0,159	0,039
stand deviacija	0,006	0,002

9.3 Priloga 3:

Opravljenе meritve encimske aktivnosti gvjakola peroksidaze (mM/min) pri peteršilju in solati pri različnih pogojih.

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, 0 dni		
1	0,028	0,019
2	0,027	0,020
3	0,026	0,021
POVPREČJE	0,027	0,020
STAND DEVIACIJA	0,001	0,001

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, 10 dni		

1	0,097	0,028
2	0,096	0,039
3	0,121	0,044
POVPREČJE	0,105	0,037
STAND DEVIACIJA	0,014	0,008

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
Cacl2, 10 dni		
1	0,129	0,030
2	0,146	0,033
3	0,133	0,040
POVPREČJE	0,136	0,034
STAND DEVIACIJA	0,009	0,005

gvajakol	PETERŠILJ	SOLATA
K, odrezan		
1	0,207	0,051
2	0,219	0,075
3	0,312	0,055
POVPREČJE	0,246	0,060
STAND DEVIACIJA	0,058	0,013