

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Laura Tenžera, apsolvant

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**UTJECAJ UVJETA SKLADIŠTENJA NA SADRŽAJ ASKORBINSKE KISELINE
U PŠENIČNOJ TRAVI**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Laura Tenžera, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**UTJECAJ UVJETA SKLADIŠTENJA NA SADRŽAJ ASKORBINSKE KISELINE
U PŠENIČNOJ TRAVI**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, predsjednik
3. prof.dr.sc. Tihana Teklić, član

Osijek, 2020.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Pšenica	1
1.2. Pšenična trava	1
1.3. Vitamin C (L-askorbinska kiselina).....	2
1.4. Važnost vitamina C.....	3
1.5. Cilj istraživanja	4
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Nutritivna vrijednost pšenične trave	5
2.2. Terapeutska svojstva pšenične trave.....	5
2.3. Fenoli i flavonoidi.....	8
2.4. Antioksidativna aktivnost	8
2.5. Utjecaj skladišnih uvjeta na sadržaj askorbinske kiseline	10
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Postavljanje pokusa - uzgoj pšenične trave	13
3.2. Određivanje vitamina C	14
3.3. Analiza i obrada podataka.....	16
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. POPIS LITERATURE.....	33
8. SAŽETAK	36
9. SUMMARY	37
10. POPIS TABLICA.....	38
11. POPIS SLIKA	40
12. POPIS GRAFIKONA.....	41
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Pšenica

Pšenica pripada redu *Poales*, porodici *Poaceae* (trave), potporodici *Pooideae*, te rodu *Triticum* (Watson i Dallwitz, 1992.). Predstavlja jednu od glavnih kultura koja se koristi u ljudskoj i stočnoj ishrani, a ubraja se među „tri velike“ žitarice uz kukuruz i rižu. Uzgaja se diljem svijeta od 67° S u Skandinaviji i Rusiji do 45° J u Argentini, uključujući i povišene regije u tropima i subtropima (Feldman, 1995.). Zbog svoje velike prilagodljivosti različitim klimatskim uvjetima, pšenica ima veliku zastupljenost u proizvodnji diljem svijeta. Osim što ima visok prinos, pšenica je bogata esencijalnim aminokiselinama, mineralima i vitaminima, fitonutrijentima i prehranbenim vlaknima korisnim u ljudskoj prehrani (Shewry, 2009.). Najvažnija je žitarica za proizvodnju mlinarsko-pekarskih proizvoda, te je glavni izvor ugljikohidrata čiji udio u zrnu pšenice može biti i 80 % (Pospišil, 2010.). Gotovo polovica kalorija koja se svakodnevno koristi u ljudskoj prehrani potječe izravno iz zrna žitarica, od čega čak četvrtina dolazi iz pšenice (González-Esteban, 2017.).

1.2. Pšenična trava

Pšenična trava predstavlja mlade izdanke obične pšenice *Triticum aestivum* Linn. koji su svježe iscijeđeni ili osušeni u prah i pogodni za ljudsku i životinjsku uporabu. Oba navedena oblika koja se koriste u prehrani su bogat izvor klorofila, aminokiselina, minerala, vitamina i enzima. Najčešći način konzumacije pšenične trave je u obliku soka koji se dobije cijedenjem svježih listova. Sok pšenične trave još je poznat pod imenom „zeleni sok“ zahvaljujući visokom sadržaju klorofila u soku (Padalia i sur., 2010.). Klorofil ublažava infekcije, liječi rane, sprječava upale i pomaže u oslobađanju od parazitskih infekcija, a tri najvažnija učinka pšenične trave na ljudsko tijelo su: pročišćavanje krvi, detoksikacija jetre i čišćenje debelog crijeva. Sok od pšenične trave osigurava više energije organizmu nadomještanjem nutritivnih nedostataka, te uklanjanjem štetnih tvari koji negativno djeluju na stanice, tkivo, krv i organe (Mujoriya i Bodla, 2011.). Također, sok od pšenične trave bogat je izvor vitamina (A, C, E te B i K kompleksa), minerala (kalcija, fosfora, magnezija, zemnoalkalnih metala, kalija, cinka, bora i molibdena), aminokiselina (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, arginin, alanin i serin) i enzima (Slika 1.). Razni enzimi odgovorni za farmakološka djelovanja pšenične trave su proteaza, amilaza, lipaza, citokrom oksidaza, transhidrogenaza i superoksid-dismutaza (SOD). Uz sve navedeno, važan razlog uporabe soka od pšenične trave u medicinske svrhe je i njegovo antioksidativno djelovanje

koje je rezultat visokog sadržaja bioflavonoida poput apigenina, kvercetina i luteolina. Ostali prisutni spojevi koji čine ovu travu terapijski djelotvornom su indolni spojevi, kolini i amigdalin (Padalia i sur., 2010.).

Table 1: Different constituents of wheatgrass occur in the following proportion in the plant

Basic Nutrients	Minerals	Vitamins
Calories: 21.0 Cal	Iron: 0.61 mg	Vitamin C :3.64mg
Water: 95g	Magnesium: 24mg	Vitamin A: 427 IU
Fat: 0.06g	Potassium: 147mg	Vitamin B1: 0.08mg
Carbohydrates: 2.0g Dietary	Phosphorous: 75.2mg	Vitamin B2: 0.13mg
Fiber: <0.1g Chlorophyll: 42.2mg	Zinc: 0.33mg	Vitamin B3: 0.11mg
Choline: 92.4mg	Calcium: 24.2mg	Vitamin B5: 6.0mg
Glucose: 0.80g	Sodium: 10.3mg	Vitamin B6: 0.2mg
	Selenium: <1ppm	Vitamin B12: <1mcg
		VitaminE:15.2IU
		Folic Acid: 29mcg

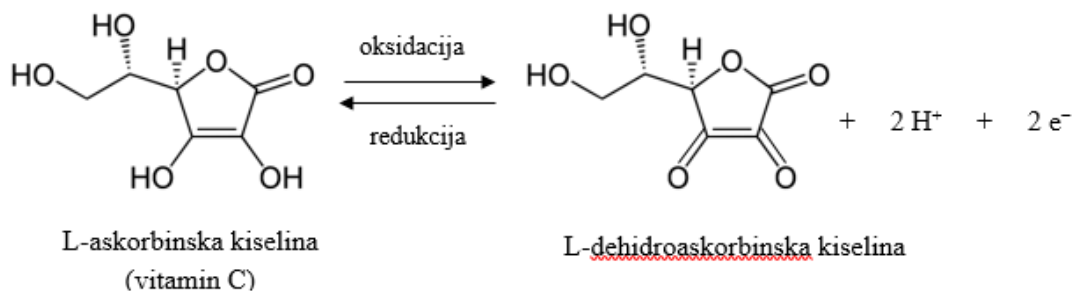
Slika 1. Nutritivni sastav pšenične trave. Prikazane vrijednosti odnose se na 100 mL soka.
(Izvor: Padalia i sur., 2010.)

1.3. Vitamin C (L-askorbinska kiselina)

Vitamin C se nalazi u brojnom voću i povrću, a osobito ga sadržava limun i njemu slično voće, također ga sadrže plodovi divlje ruže, paprika, rajčica, krumpir i dr. Vitamin C je bijela kristalična tvar koja je topljiva u vodi i alkoholu, ali netopljiva u većini nepolarnih otapala, odnosno, mastima i uljima. S obzirom na svoja kemijska svojstva, jedan je od najmanje stabilnih vitamina. Razaraju ga toplina, svjetlost, oksidansi i alkalije. Znatna količina vitamina C prisutna u povrću uništava se kuhanjem. Čak i kada se čuva u hladnjaku u dobro zatvorenoj posudi, vitamin C se polako razgrađuje.

S obzirom na kemijsku strukturu, vitamin C ili L-askorbinska kiselina vrlo je slična monosaharidima. L-askorbinska kiselina lako se oksidira u L-dehidroaskorbinsku kiselinu, diketon (Slika 2.). Obje kiseline fiziološki su aktivne i zajedno se nalaze u većini tjelesnih tekućina. Njihova aktivnost se gubi hidrolizom laktonske¹ skupine čime nastaju karboksilna i hidroksilna skupina (Amić, 2008.).

¹ Laktoni (prema lat. *lac*, genitiv *lactis*: mlijeko) su ciklički esteri, odnosno organski spojevi koji nastaju izdvajanjem vode i ciklizacijom iz hidroksikarboksilnih kiselina te im je skupina –CO-O– sastavni dio prstena.



Slika 2. Oksidacija L-askorbinske kiseline u L-dehidroaskorbinsku kiselinu
(Izvor: Amić, 2008.)

1.4. Važnost vitamina C

Nedostatak vitamina C u prehrani manifestira se kao bolest koja je poznata pod imenom skorbut. Simptomi navedene bolesti su otekline, krvarenje desni, ispadanje zubi, bol u zglobovima, lomljive kosti, gubitak težine i slabokrvnost. Razlog tome je što manjak vitamina C sprječava stvaranje i održavanje intercelularnih tvari koje su bitne za čvrstoću tkiva poput kolagena. Kolagen je protein kostiju čija je funkcija držanje minerala kostiju zajedno. Osim navedenih bolesti, manjak vitamina C može uzrokovati smanjenu plodnost kod ljudi i defekte ploda. Između ostalog, nužan je i za pravilnu funkciju žučnih kiselina, apsorpciju željeza i dr. Također, vitamin C je antioksidans koji često djeluju kao antikancerogene tvari (tvari koje štite od nastanka raka) (Amić, 2008.).

Sprječava li vitamin C i neke druge bolesti još uvijek je predmet brojnih istraživanja i kontroverznih pretpostavki. Međutim, dokazano je da vitamin C ima antivirusnu aktivnost, uključen je u metabolizam aminokiselina, sintezu pojedinih hormona, te da pomaže pri zacjeljivanju rana i dr. (Amić, 2008.).

1.5. Cilj istraživanja

1. Utvrditi postoje li značajne razlike u sadržaju vitamina C ovisno o dužini trajanja i temperaturi skladištenja uzoraka soka pšenične trave odnosno tkiva lista pšenične trave.
2. Utvrditi pri kojim uvjetima skladištenja tkiva ili soka pšenične trave su najmanji gubici vitamina C kao važnog nutritivnog sastojka, u usporedbi sa svježim tkivom ili sokom pšenične trave uzorkovanim na dan otkosa.

Osnovna hipoteza istraživanja je bila da postoje razlike u sadržaju vitamina C ovisno o dužini trajanja i temperaturi skladištenja uzoraka soka odnosno tkiva lista pšenične trave. Također, pretpostavljeno je da će postojati razlike u stupnju degradacije vitamina C u listu odnosno soku pšenične trave pri navedenim uvjetima i dužinama trajanja skladištenja. Cilj provedenog pokusa je utvrditi pri kojim uvjetima skladištenja tkiva i soka pšenične trave su najmanji gubici sadržaja vitamina C u usporedbi sa svježim tkivom i sokom pšenične trave.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Nutritivna vrijednost pšenične trave

Pšenica (*Triticum aestivum*) pripada porodici *Poaceae* i predstavlja bitan segment prehrane čovjeka. U fazi klijanja, listovi pšenice starosti 6 - 10 dana poznatiji su pod nazivom pšenična trava. Ona obiluje dovoljnim količinama klorofila koji ima strukturnu sličnost molekuli hemoglobina te značajnu ulogu u bolestima nedostatka krvi kao što su talasemija i mijelotoksičnost kod pacijenata koji su u procesu liječenja kemoterapijom. Poznato je da je pšenična trava bogat izvor vitamina, enzima, minerala, aminokiselina, korisnih elemenata u tragovima, fitokemijskih elemenata i glikoproteina P4D1 i dr., što može pozitivno stimulirati popravak DNA i RNA molekula u slučaju njihova oštećenja (Sharma i sur., 2013.).

Bioraspoloživost osnovnih elemenata kalija (K), mangana (Mn), cinka (Zn), željeza (Fe) i natrija (Na) iz pšenične trave koji se konzumiraju kao dodatak prehrani istraživani su kroz metode *in vitro* želučane te *in vitro* crijevne kiseline. Za određivanje koncentracije bioraspoloživosti nabrojanih elemenata korištena je analiza aktivacije neutrona. Također, određena je bioraspoloživost navedenih elemenata u tabletama i granulama pšenične trave. Kada su uzorci vraćeni na neutralnu pH razinu i uspoređeni, primijećena je veća bioraspoloživost elemenata u metodi crijevne kiseline negoli u metodi želučane kiseline. Utvrđena je viša bioraspoloživost mangana (Mn), cinka (Zn) i željeza (Fe) u svježoj pšeničnoj travi naspram sjemena pšenice kod obje analitičke metode. Raspon vrijednosti određen metodom želučane kiseline za svježju pšeničnu travu, tablete pšenične trave i sjemena pšenice iznosio je 37 - 57 %, 17 - 43 % i 9 - 38 %, dok su rezultati dobiveni metodom crijevne kiseline bili 39 - 60 %, 34 - 55 %, odnosno 15 - 23 %. Istraživanje pokazuje da u laboratorijskim uvjetima uzgojena pšenična trava u razdoblju 8 - 10 dana od sjetve sadrži visoke koncentracije lako dostupnih minerala (Kulkarni i sur., 2007.).

2.2. Terapeutska svojstva pšenične trave

Znanstvena istraživanja sve više potvrđuju ono što je našim precima bilo poznato iz iskustva. Mlade biljke žitarica bile su cijenjene u davnim vremenima. Suriyavathana i sur. (2016.) navode da su ljudi na drevnom Bliskom Istoku jeli zelene vrhove lišća pšenice kao deliciju. Biljni proizvodi svakim danom stječu sve veću popularnost na globalnoj razini. Simboliziraju određenu sigurnost naspram lijekova i dodataka prehrani iz sintetičke proizvodnje koji se smatraju štetni čovjeku i okolišu. Mnogi lijekovi koji se danas koriste biljnoga su porijekla. Pojedini lijekovi napravljeni su iz biljnih ekstrakata, drugi su

sintetizirani u pokušaju oponašanja prirodnog biljnog spoja. Pšenična trava jedan je od predstavnika češće konzumiranog dodatka prehrani, ali njezina potpuna funkcionalnost i djelovanje ostaju neotkrivene.

U svome sastavu, pšenična trava sadrži klorofil, flavonoide, vitamin C i E. Prema načinu proizvodnje pojavljuju se različite koncentracije navedenih elemenata koji također variraju s obzirom na uvjete rasta, a najčešći oblici primjene pšenične trave su: svježi sok, smrznuti sok, tablete i prah (Bar-Sela i sur., 2015.). Svježi sok pšenične trave pokazao je razna pozitivna svojstva u borbi protiv raka, čireva, raznih upala, artritisa te u poboljšanju antioksidativne aktivnosti, također pomaže u izgradnji krvnih stanica kod talasemije. Raspravljalo se o pomoći pšenične trave pri protoku krvi, probavi i općoj detoksikaciji tijela zbog prisutnosti biološki aktivnih spojeva i minerala te antioksidativnog potencijala koji proizlazi iz visokog sadržaja bioflavonoida poput apigenina, kvercetina i luteolina. Nadalje, poznato je da pšenična trava pomaže u smanjenju umora, poboljšanju spavanja, povećava snagu, prirodno regulira krvni tlak i šećera u krvi, pomaže pri mršavljenju, poboljšava probavu, pridonosi zdravoj koži, zubima, vidu, radu mišića i zglobova, poboljšava funkcionalnost srca, pluća i reproduktivnih organa, usporava stanično starenje, poboljšava mentalnu funkciju te djeluje blagotvorno kod grčeva u mišićima, anemije, astme, alergije, upalne bolesti crijeva i dr. Navedene djelotvornosti se dobivaju prilikom dnevnog unosa u organizam. Čini se da pšenična trava ima veliki potencijal kao ljekovita biljka, ali su potrebna daljnja istraživanja njezine primjene u terapijske svrhe za liječenje raznih bolesti (Chauhan i sur., 2014.).

Pšenična trava u prevenciji raka - Selen i laetril prisutni u pšeničnoj travi imaju ljekovita svojstva značajna kod prevencije nastanka raka. Selen izgrađuje jaki imunološki sustav i umanjuje rizik pojave i razvitka tumorskih oboljenja. Pšenična trava sadrži najmanje trinaest vitamina od kojih su pojedini antioksidansi, uključujući B12, askorbinsku kiselinu, superoksid dismutazu, citokrom oksidazu, mukopolisaharide. Superoksid-dismutaza pretvara dva aniona superoksida u molekulu vodikovog peroksida i kisik, čime se smanjuje razina slobodnih kisikovih radikala, a što je bitno za uništavanje tumorskih stanica. Uzrok raspadanja stanica raka je otkriven na temelju uništavanja specifičnog respiratornog enzima zvanog citokrom c-oksidaza. Katalizator iz ekstrakta fermentirane pšenične trave poboljšava preživljavanje visoko rizičnih bolesnika s melanomom kože. Primijećeno je kod pacijenata koji su podvrgnuti kemoterapiji, a koristili su pšeničnu travu prilikom liječenja da su

umanjeni simptomi poput mučnine, povraćanja i čireva u usnoj šupljini te nisu imali potrebu za prihvatom u bolnicu (Sareen i sur., 2014.).

Pšenična trava i dijabetes - Dijabetes kao problem probavnog sustava može se umanjiti pomoću praha pšenične trave uzetog kao dodatak prehrani. Obilje prirodnih vlakana u pšeničnoj travi optimizira razinu šećera u krvi. Za prah pšeničnog soka sa prisutnošću klorofila se vjeruje kako je farmakološki aktivna komponenta pšenične trave koja djeluje kao sredstvo protiv dijabetesa (Rana i sur., 2011.)

Pšenična trava i reumatoidni artritis - Pacijenti sa reumatoidnim artritismom često tvrde da su njihovi simptomi ublaženi posebnom prehranom. Protuupalna svojstva pšenične trave pozitivno djeluju na probleme s kostima i zglobovima, umanjujući bol i oticanje (Sareen i sur., 2014.).

Pšenična trava i upalna stanja - Ekstrakti iz pšenične trave (primjer: Dr. Wheatgrass skin recovery cream) djeluju kao protuupalni imunomodulator, inhibitori čestica fosfora, lokalno hemostatsko sredstvo i stimulans fibroblastične aktivnosti sa širokom mogućnosti zacjeljujućih svojstava. Pšenična trava u obliku kreme umanjuje toksičnost radijacije za kožu, pomaže pri liječenju raznih vrsta kožnih lezija, opekline i čireva gdje djeluje kao sredstvo za zacjeljivanje rana, stimulirajući granulaciju tkiva i epitelizaciju. Klorofilin iz pšenične trave posjeduje bakteriostatska svojstva koja pomažu pri zacjeljivanju rana (Sareen i sur., 2014.).

Pšenična trava i dentalne bolesti - Manjak minerala, niske razine vitamina topivih u mastima, uključujući A, D, E i K, te nemogućnost tijela da apsorbira takva hranjiva putem probave glavni su uzroci općih zubnih bolesti. Redovita konzumacija pšenične trave mogla bi biti jedan od najboljih načina sprječavanja dentalnih problema. Pšenična trava prirodni je antibiotik koji ubija mnoge bakterije i patogene koji uzrokuju propadanje zubi, parodontozu, bolesni desni i loš zadah. Kao takva, povećava proizvodnju crvenih krvnih stanica što može ubrzati proces ozdravljenja i oporavak dentalnih problema (Sareen i sur., 2014.).

Popularnost pšenične trave nedvojbeno nastavlja rasti. Međutim, prednosti uočene u kliničkim istraživanjima trebaju se provesti na široj razini prije preporuka za korištenje u kliničke svrhe (Bar-Sela i sur., 2015.).

2.3. Fenoli i flavonoidi

Pšenična trava sadrži različite fitokemikalije poput alkaloida, flavonoida, fenola, tanina, glikozida itd. Prisutnost fenola pomaže pri ublažavanju efekta kardiovaskularnih bolesti, upala i kod raznih oblika raka. Antioksidativna aktivnost pšenične trave je relativno visoka i zbog prisutnosti fenola u ekstraktu mladih klijanaca (Sutar-kapashikar i sur., 2018.).

Kulkarni i sur. (2006.) su ispitivali razinu antioksidativne aktivnosti pšenične trave metodama FRAP, ABTS i DPPH u vodenim i etanolnim ekstraktima. Uzorci pšenične trave su uzgajani u različitim uvjetima te analizirani nakon 6, 7, 8, 10 i 15 dana. Određena je razina lipidne peroksidacije i sposobnost neutralizacije slobodnih kisikovih radikala u vodenim i etanolnim ekstraktima, kod uzoraka koji su bili naklijavani na papiru i zalijevani vodom iz slavine, vodom iz slavine s dodanim hranivima, odnosno naklijavani u tlu te zalijevani vodom iz slavine i vodom sa dodanim hranivima. Za usporedbu je analizirana tableta pšenične trave dostupna u slobodnoj prodaji. Porastom klijanaca udjel fitokemikalija i antioksidativna aktivnost su se povećavali u svim uvjetima uzgoja, a veće su vrijednosti svih istraživanih svojstava utvrđene u etanolnim uzorcima. Najveća antioksidativna aktivnost utvrđena je u etanolnim ekstraktima, metodom FRAP, nakon 15 dana rasta u uvjetima naklijavanja na tlu s dodanim hranivima.

2.4. Antioksidativa aktivnost

Parit i sur. (2018.) su analizirali proteinski sastav pšenice u tri razvojna stadija (0, 8 i 16 dana nakon klijanja) pomoću tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Identificirano je sveukupno 297 proteina. Njihova funkcionalnost ukazuje na međusobnu povezanost u prevenciji mnogih bolesti, oksidativnog stresa, metabolizma, pretilosti i mehanizama povezanih sa energijom. Prema FRAP metodi, antioksidativna aktivnost se povećala 1,55 puta nakon 16 dana klijanja u odnosu na 0-ti dan klijanja, iako je primijećen usporeni trend rasta nakon 8. dana. Antioksidativna aktivnost ekstrakta utvrđena DPPH metodom je imala uzlazni trend proporcionalan sa starošću klijanaca (Slika 3.).

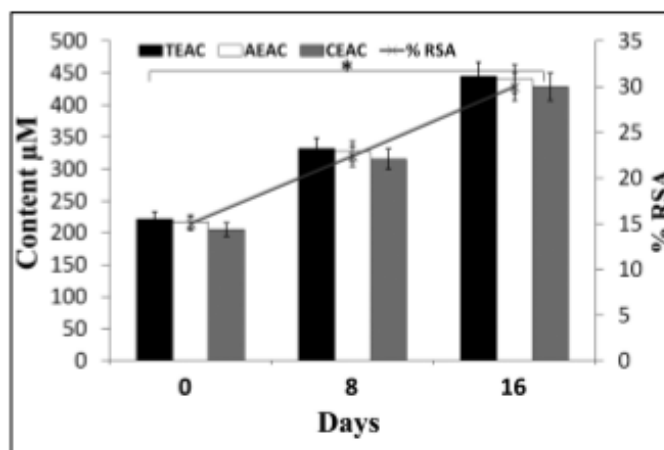


Figure 4–The antioxidant activities of the wheatgrass extract were determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) after 0, 8, and 16 DAG. Standard mean errors are indicated. * indicate that DPPH values are significantly different from each other at $p < .001$ for all time points selected.

Slika 3. Antioksidativna aktivnost pšenične trave determinirana pomoću DPPH nakon 0, 8 i 16 dana nakon klijanja. (Izvor: Parit i sur., 2018.)

Zendehbad i sur. (2014.) su ispitivali utjecaj ekstrakcijskog medija na antioksidativnu aktivnost utvrđenu metodom DPPH i sposobnost uklanjanja H_2O_2 u kloroformnim i metanolnim ekstraktima listova pšenične trave. Sveukupni sadržaj fenola u metanolnoj frakciji je bio značajno veći u usporedbi s ekstraktima u kloroformu, dok je sadržaj flavonoida bio veći u ekstraktima s kloroformom. Veća DPPH aktivnost i sposobnost uklanjanja neradikalnog derivata vodikovog peroksida imao je ekstrakt u metanolu. Autori zaključuju da visokoj antioksidativnoj aktivnosti pšenične trave doprinose spojevi iz skupine fenola i flavonoida te da je njihova aktivnost ovisna o ekstrakcijskom sredstvu koje se koristi.

Kaushal i sur. (2017.) su ispitivali razinu antioksidativne aktivnosti obzirom na starost klijanaca pšenične trave s ciljem utvrđivanja optimalnog trenutka za žetvu pšenične trave. Pšenična trava je uzgajana u laboratorijskim uvjetima te su uzorci skupljeni i analizirani svaki dan od 1. do 15. dana nakon klijanja. Sok je pročišćen zbog preciznosti spektrofotometrijskih analiza te razrijeđen vodom u standardnom omjeru koji se preporučuje za pripremu soka u nutritivne svrhe. Kapacitet antioksidativne aktivnosti po DPPH metodi, uspoređen je s antioksidativnim potencijalom askorbinske kiseline koncentracije 4 mg / mL. Sadržaj flavonoida i antioksidativna aktivnost rasla je do 9. dana nakon klijanja, nakon čega blago opada sve do 15. dana nakon klijanja. Ukupni sadržaj flavonoida 9. dan iznosio je $23,67 \pm 1,76 \mu\text{M}$ ekvivalenta kvercetina / mL, dok je antioksidativna aktivnost bila $98,8 \pm$

4,16 % (Slika 4.). Rezultati njihova istraživanja dokazali su pozitivnu povezanost između ukupnog sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti (Slika 5.).

Table 1: Day wise changes in total flavonoids content and antioxidant activity in wheatgrass juice. data are presented as mean \pm SD (n=3).

Days	Falvonoid content ($\mu\text{M GE ml}^{-1}$)	Antioxidant activity (%)
1	3.45 \pm 0.23	56.2 \pm 2.12
2	3.98 \pm 0.21	59.8 \pm 2.01
3	4.51 \pm 0.33	65.0 \pm 2.67
4	4.56 \pm 0.54	66.8 \pm 3.21
5	5.87 \pm 0.67	71.4 \pm 2.56
6	7.89 \pm 0.45	82.2 \pm 2.78
7	12.67 \pm 1.23	86.8 \pm 4.67
8	16.24 \pm 2.21	91.2 \pm 2.51
9	23.67 \pm 1.76	98.8 \pm 4.16
10	22.34 \pm 2.12	96.6 \pm 3.32
11	22.11 \pm 1.45	94.1 \pm 3.61
12	18.98 \pm 2.11	87.7 \pm 5.43
13	17.91 \pm 1.34	81.6 \pm 2.67
14	17.34 \pm 2.17	80.8 \pm 2.11
15	17.29 \pm 1.56	78.7 \pm 2.42

Slika 4. Dnevne promjene u ukupnom sadržaju flavonoida i antioksidativne aktivnosti u soku pšenične trave. Podaci su prikazani unutar granica standardne devijacije (n = 3) (Izvor: Kaushal, 2017.)

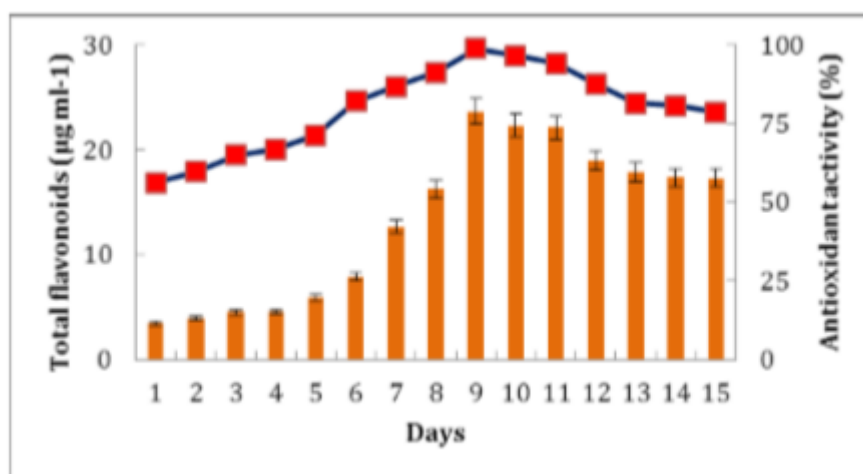


Fig 1: Dependence of antioxidant activity on total flavonoids content in wheatgrass juice.

Slika 5. Ovisnost antioksidativne aktivnosti na sadržaj ukupnih flavonoida u soku pšenične trave (Izvor: Kaushal, 2017.)

2.5. Utjecaj skladišnih uvjeta na sadržaj askorbinske kiseline

Veltman i sur. (2000.) su istraživali utjecaj omjera koncentracije kisika i ugljikovog dioksida na sadržaj askorbinske kiseline i razvoj unutarnjeg posmeđenja ploda kruške dviju sorata „Conference“ i „Rocha“. Kod oba kultivara, razina askorbinske kiseline opada u

standardnim kontroliranim uvjetima (-1 °C; 2 % O₂; 0,7 % CO₂, vlaga zraka 97 - 99 %) odnosno, smanjenjem O₂ i povećanjem CO₂ koncentracije. Posmeđivanje je inicirano razgradnjom značajnih količina askorbinske kiseline u plodu i ovisi o sorti, datumu berbe i lokaciji uzgoja, a gubitak tijekom standardnih uvjeta čuvanja varira između 2 i 6 mg / 100 g svježe mase ploda. Gubitak askorbinske kiseline naspram početne vrijednosti u oba kultivara prelazi 50 % i veće je u uvjetima gdje je smanjena koncentracija O₂, odnosno povećana koncentracija CO₂ u odnosu na standardne uvjete. Autori zaključuju da brži i veći gubitak vitamina C inducira raniju i jaču pojavu posmeđenja ploda, a na što znatno utječe sorta i omjer kisika i ugljik(IV) oksida u okolnoj atmosferi.

Giannakourou i sur. (2003.) su ispitivali gubitak L-askorbinske kiseline kod zelenog graška, špinata, zelenog graha te bamije, u svježem stanju pri različitim temperaturama smrzavanja. Temperaturna ovisnost gubitka vitamina C u rasponu od -3 °C do -20 °C (Slika 6. (a)) je prikazana modelom koji koristi Arrheniusovu jednadžbu². Modeli su razvijani u oscilirajućim vremensko-temperaturnim uvjetima kako bi se utvrdila njihova primjenjivost u stvarnim uvjetima čuvanja i manipulacije komercijalnim povrćarskim proizvodima. Modeli omogućuju matematičko određivanje hranidbene vrijednosti tijekom smrzavanja na temelju dostupnih podataka temperature i trajanja smrzavanja. Kod svih ispitivanih vrsta povrća gubitak vitamina C tijekom skladištenja je bio obrnuto proporcionalan sa snižavanjem temperature. Usporedbom proučavanog povrća dokazan je značajan utjecaj vrste biljnog tkiva na razinu gubitka vitamina C te je najznačajniji gubitak vitamina C zabilježen kod smrznutog špinata C (Slika 6. (b)). Kod graška i graha je utvrđena umjerena razgradnja, dok je bamija pokazala najmanji stupanj razgradnje vitamina C.

² Arrheniusova jednadžba: $k = A \exp(-E_a / RT)$; gdje je k - konstanta brzine kemijske reakcije, A - kolizijski faktor, E_a - energija aktivacije, R - plinska konstanta, T - temperatura. Jednadžba se zove prema njenom autoru Svanteu Arrheniusu.

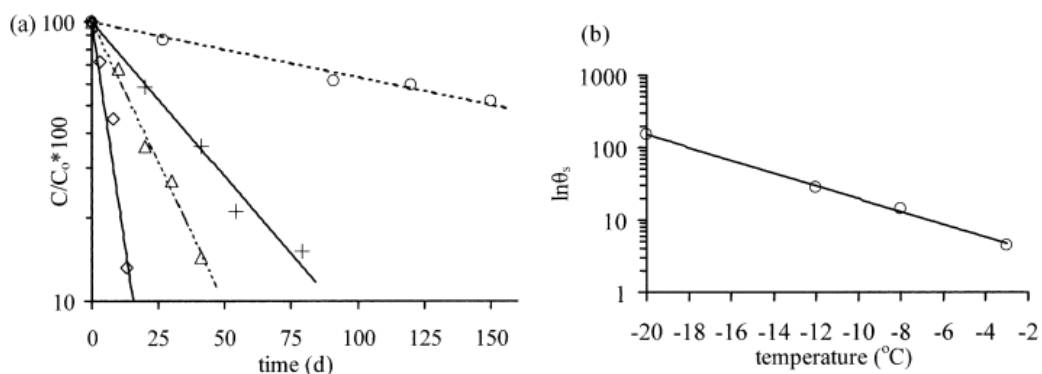


Fig. 3. (a) Results for vitamin C loss vs time at four storage temperatures on a semilogarithmic scale. Experimental points correspond to: \diamond at -3°C , Δ at -8°C , $+$ at -12°C and \circ at -20°C and lines represent the first order fit ($R^2 > 0.972$ at all temperatures). (b) Shelf life plot of the 50% vitamin C loss for frozen spinach on a semilogarithmic scale.

Slika 6. (a) Rezultati gubitka vitamina C kroz vrijeme pri četiri temperature skladištenja na polulogaritamskoj skali. Točke predstavljaju: \diamond (-3°C), Δ (-8°C), $+$ (-12°C) i \circ (-20°C), a linije predstavljaju vrijeme trajanja skladištenja u danima ($R^2 > 0,972$ za sve temperature).

(b) Prosječan vijek trajanja pri 50 %-om gubitka vitamina C za zamrznuti špinat na polulogaritamskoj skali (Izvor: Giannakourou i sur., 2003.)

3. MATERIJAL I METODE

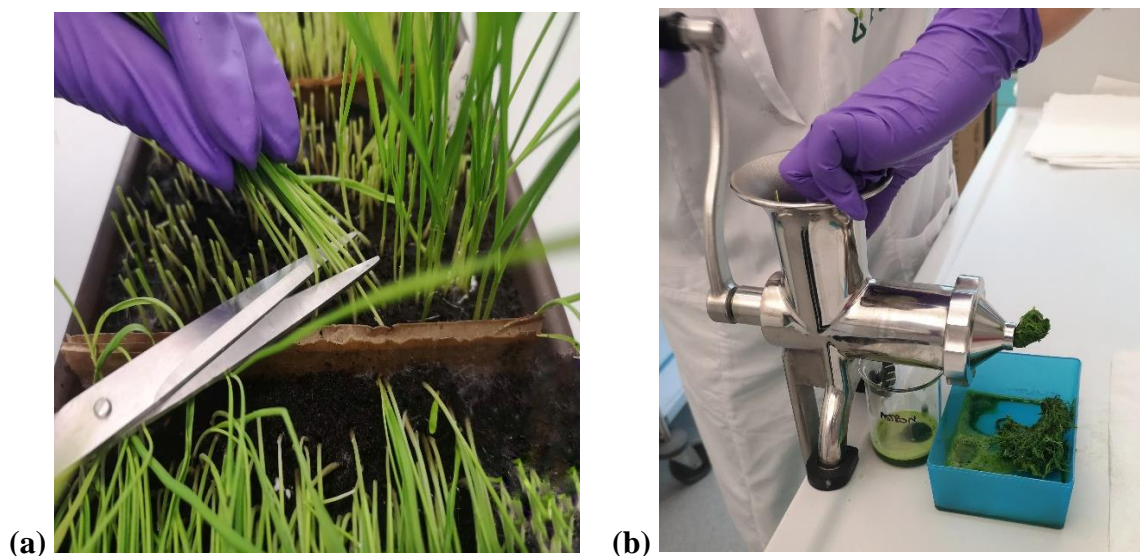
3.1. Postavljanje pokusa - uzgoj pšenične trave

Zrno divljeg srodnika pšenice *Triticum aestivum* ssp. *spherococum* iz 2013. godine sijano je u treset. Prethodno je vagano 15 g sjemena u staklene čaše koje su napunjene destiliranom vodom, stavljen je magnet te je čaša postavljena na magnetnu miješalicu 5 minuta. Sjeme je ocijeđeno nakon 5 minuta i postupak je ponovljen još dva puta s time da je zadnje ispiranje bilo destiliranom autoklaviranom vodom. Nakon toga sjeme je prenijeto u staklenke na koje je postavljena mrežica pričvršćena gumicom. Sjeme je u staklenkama još jednom isprano autoklaviranom vodom te su posude ukošene kako bi se ocijedio višak vode. Sjeme je sijano dva dana nakon pripreme. Na dan sjetve, 25. travnja 2019. godine, u plastične posude je odvagano 354 g treseta na koji je podjednako raspoređeno sjeme (Slika 7.), te zatim prekriveno s približno 60 g treseta i zaliveno s 50 mL destilirane vode.



Slika 7. Sjetva divljeg srodnika pšenice *Triticum aestivum* ssp. *spherococum*; sjeme je podjednako raspoređeno na tresetu

Biljke su uzgajane u kontroliranim uvjetima u klima komori pri konstantnoj temperaturi od 20 °C, s 12 satnim fotoperiodom. Vlaga zraka je bila 65 %. Pšenica je svaki dan zalijevana s 50 mL dH₂O. Dvanaest dana nakon sjetve, pšenica odnosno pšenična trava je rezana pri dnu (Slika 8. (a)) i pripremljen je sok korištenjem sokovnika za pšeničnu travu (Slika 8. (b)). Lisna masa pšenične trave i pšenični sok su skladišteni pri različitim temperaturama (4 °C, -20 °C i -80 °C) te su analize sadržaja vitamina C rađene nulti dan, odnosno na dan žetve, prvi, sedmi, četrnaesti i dvadeset i prvi dan skladištenja.



Slika 8. (a) Rezanje pšenične trave pri dnu; **(b)** Priprema soka u sokovniku za pšeničnu travu

3.2. Određivanje vitamina C

Koncentracija vitamina C je određena prema protokolu Roe i Kuetheru (Roe i Kuether, 1943.) uz neke izmjene. Pripremljene su otopine TCA 13,3 % - trikloroctena kiselina, H₂SO₄ 65 % - sulfatna kiselina, DNPH 2 % - 2,4 dinitrofenilhidrazin (2 g DNPH, 230 mg tiouree, 270 g CuSO₄, 100 mL 5 M H₂SO₄) i askorbinska kiselina (stock otopina) - osnovni standard za pravljenje baždarne krivulje (10 mg / 100 mL). Lisna masa je macerirana tekućim dušikom te je u plastične epruvete s navojem od 15 mL vagano 0,5 g usitnjenog tkiva (Slika 9. i 10.). Pipetirano je 250 µL soka pšenične trave u plastične epruvete od 15 mL s navojem, te je izvagana i masa pipetiranog soka. U epruvete s lisnom masom dodano je 10 mL destilirane vode, a u epruvete gdje je bio pšenični sok dodano je 5 mL destilirane vode. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani 15 minuta na 4000 RCF pri temperaturi od 4 °C. Pipetirano je 150 µL u dvije epruvete (2 mL) za uzorak i slijepu probu. U obje epruvete je dodano 175 µL destilirane vode, 100 µL 13,3 % TCA i samo u uzorak 75 µL DNPH te su

pripremljeni ekstrakti inkubirani na 37 °C u trajanju od 3 sata. Nakon inkubacije u uzorak i slijepu probu dodano je 1000 μL H_2SO_4 s time da je u slijepu probu prije toga dodan i DNPH (75 μL). Standardi se pripremaju na isti način kao i uzorak, dakle DNPH se dodaje prije inkubacije. Od stock otopine askorbinske kiseline pripremljena su razrjeđenja s koncentracijama 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 275 g / mL. Svi uzorci su vorteksirani te je na spektrofotometru Varian Cary 50 UV-Vis mjerena apsorbanca pri 520 nm u staklenoj kivetu od 1 cm.



Slika 9. Maceriranje lisne mase tekućim dušikom



Slika 10. Vaganje usitnjenog tkiva

Iz jednadžbe baždarnog pravca koja je dobivena mjerenjem apsorbanca standarda, preračunata je koncentracija vitamina C u uzorcima te je vrijednost koncentracije vitamina C u slijepim probama oduzeta od vrijednosti dobivenih u uzorcima. Vrijednosti koncentracije izražene su u $\mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$. Za proračun koncentracije na 1000 μL soka, potrebno je u obzir uzeti početni volumen soka (150 μL) i razrjeđenje.

Formula: koncentracija vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$ biljnog soka) = koncentracija vitamina C u reakcijskoj smjesi * 1000 / volumen pipetiranog staničnog soka

Formula: koncentracija vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$ reakcijske smjese) =
koncentracija uzorka – koncentracija slijepe probe

3.3. Analiza i obrada podataka

Istraživanje je provedeno kao dvofaktorijalni pokus s četiri ponavljanja. Svi prikupljeni podaci analizirani su pomoću programa za statističku obradu podataka SAS Software 9.1.3., (2002. – 2003., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Excel Office 2007. Utjecaj tretmana na ispitivana svojstva ispitan je pomoću dvofaktorijalne i monofaktorijalne analize varijance (ANOVA), a razlike između srednjih vrijednosti ispitane su pomoću testa najmanje značajne razlike (LSD test).

4. REZULTATI

U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva (list i sok), F testom je utvrđen značajan utjecaj duljine trajanja skladištenja uzoraka na sadržaj C vitamina, pri svim temperaturama skladištenja (4 °C; -18 °C; -80 °C; $P < 0,0001$) (Tablica 1.). U prosjeku za sve duljine skladištenja tkiva, F testom je utvrđen statistički značajan utjecaj varijante čuvanja tkiva na sadržaj vitamina C pri svim temperaturama skladištenja (4 °C, $P = 0,0359$; -18 °C, $P = 0,0003$; -80 °C, $P < 0,0001$.). Interakcija tkivo x trajanje skladištenja statistički je značajno utjecala na sadržaj vitamina C utvrđenom kod uzoraka skladištenih pri 4 °C.

Tablica 1. Utjecaj duljine skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan) u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva te načina čuvanja tkiva (sok, list) u prosjeku za sve duljine skladištenja i njihove interakcije na ukupni sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi, pri različitim temperaturama skladištenja (4 °C, -18 °C, -80 °C). Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost.

TRETMAN	RAZINA TRETMANA	4 °C	-18 °C	-80 °C
Duljina skladištenja	na dan otkosa	36,7 ^A	36,7 ^A	36,7 ^A
	1	32,1 ^B	29,7 ^B	32,8 ^B
	7	25,7 ^C	29,8 ^B	31,4 ^B
	14	18,0 ^D	27,9 ^B	31,2 ^{BC}
	21	16,4 ^D	23,2 ^C	28,2 ^C
	F test	79,61	19,28	8,60
	<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tkivo	list	24,8 ^B	31,5 ^A	34,5 ^A
	sok	26,8 ^A	27,5 ^B	29,6 ^B
	F test	4,83	16,35	25,96
	<i>p</i>	0,0359	0,0003	<0,0001
Tkivo x skladištenje	F test	6,40	0,86	0,66
	<i>p</i>	0,0008	0,5010	0,6253

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C} $P = 0,01$).

U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva, pri 4 °C, LSD testom je utvrđen značajno najveći sadržaj vitamina C u uzorcima analiziranim na dan otkosa (36,7 µg / mL soka). Povećanjem broja dana skladištenja, sadržaj vitamina C je proporcionalno padao te se vrijednosti utvrđene 14. dan (18,0 µg / mL soka) i 21. dan (16,4 µg / mL soka), nisu statistički značajno razlikovale. Pri -18 °C i -80 °C također je utvrđen značajan pad sadržaja navedenog

antioksidansa proporcionalno s povećanjem broja dana skladištenja uzoraka te se vrijednosti utvrđene nakon 1., 7. i 14. dana nisu značajno razlikovale, a najniža značajna vrijednost je utvrđena 21. dana skladištenja tkiva (-18 °C, 23,2; -80 °C, 28,2).

U prosjeku za sve dane čuvanja tkiva, sadržaj vitamina C u soku pšenične trave skladištenom pri 4 °C je bio značajno viši (26,8 µg / mL soka) od onog utvrđenom u tkivu lista (24,8 µg / mL soka). Pri -18 °C i -80 °C, u prosjeku za sve dane čuvanja tkiva, utvrđen je značajno najveći sadržaj vitamina C u listu pšenične trave (-18 °C 31,5 µg / mL soka; -80 °C 34,5 µg / mL soka) u usporedbi sa sokom.

U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva (list i sok), F testom je utvrđen značajan utjecaj temperature kod svih dana skladištenja uzoraka na sadržaj vitamina C kod pšenične trave (Tablica 2.).

Tablica 2. Utjecaj temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C), u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva te utjecaj načina čuvanja tkiva (sok, list) u prosjeku za sve temperature skladištenja i njihove interakcije na ukupni sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi, po danima skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan). Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost.

TRETMAN	RAZINA TRETMANA	1	7	14	21
Temperatura	na dan otkosa	36,7 ^A	36,7 ^A	36,7 ^A	36,7 ^A
	4 °C	32,1 ^B	25,7 ^C	18,0 ^D	16,4 ^D
	-18 °C	29,7 ^B	29,8 ^B	27,9 ^C	23,2 ^C
	-80 °C	32,8 ^B	31,4 ^B	31,2 ^B	28,2 ^B
	F test <i>P</i>	7,31 0,0012	13,63 <0,0001	65,20 <0,0001	118,31 <0,0001
Tkivo	list	35,1 ^A	31,7	29,7 ^A	26,5
	sok	30,5 ^B	30,1	27,2 ^B	25,8
	F test <i>P</i>	18,55 0,0002	1,62 0,2159	6,48 0,0177	0,75 0,3943
Tkivo x temp.	F test <i>P</i>	0,69 0,5695	3,37 0,0350	4,34 0,0140	14,70 <0,0001

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C} *P* = 0,01).

U prosjeku za sve temperature skladištenja tkiva, F testom je utvrđen statistički značajan utjecaj varijante čuvanja tkiva nakon 1. i 14. dana, na sadržaja vitamina C. Interakcija tkivo

x temperatura također je statistički značajno utjecala na sadržaj vitamina C kod uzoraka analiziranih nakon 7., 14. i 21. dana.

U prosjeku za obje varijante čuvanja tkiva, nakon 1, 7, 14 i 21 dan, utvrđen je značajan pad sadržaja vitamina C pri svim temperaturama skladištenja tkiva, u usporedbi s kontrolnom vrijednošću dobivenom na dan otkosa. Nakon prvog dana, prosječni sadržaj C vitamina u uzorcima skladištenim pri 4 °C, -18 °C i -80 °C je značajno pao te među njima nije bilo statistički značajnih razlika. Nakon sedmoga dana, prosječan sadržaj vitamina C u uzorku čuvanog pri 4 °C statistički se značajno razlikovao od uzoraka skladištenih pri -18 °C i -80 °C. Nadalje, između uzoraka skladištenih pri -18 °C i -80 °C nakon sedmoga dana nije bilo statistički značajnih razlika. Prosječan sadržaj vitamina C u uzorcima nakon 14. i 21. dana skladištenja pri 4 °C nije se statistički značajno razlikovao. Pri temperaturi od -18 °C nakon 14. i 21. dana između uzoraka također nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju vitamina C, kao niti pri temperaturi od -80 °C. U prosjeku za sve temperature skladištenja LSD testom je, kod svih dana skladištenja, utvrđena značajno veća vrijednost vitamina C u tkivu lista pšenične trave u usporedbi sa sokom.

Nakon prvog dana skladištenja, F testom je utvrđen značajan utjecaj načina skladištenja tkiva na sadržaj vitamina C kod uzoraka čuvanih na -18 °C ($P = 0,0130$) i na -80 °C ($P = 0,0277$), (Tablica 3.). Također, nakon 1. dana skladištenja utvrđen je značajan utjecaj temperature skladištenja na sadržaj vitamina C u soku pšenične trave ($P = 0,0004$).

LSD testom je utvrđen značajno viši sadržaj vitamina C u listu pšenične trave skladištenom 24 sata pri -18 °C (32,4 µg / mL soka) i -80 °C (36,1 µg / mL soka), u usporedbi sa sadržajem spomenutog antioksidansa u soku pri navedenim temperaturama. Nadalje, u soku pšenične trave, nakon 1. dana skladištenja, utvrđen je značajan pad sadržaja vitamina C pri svim temperaturama skladištenja, u usporedbi s uzorcima analiziranim na dan otkosa, gdje je utvrđen najveći sadržaj vitamina C (35,3 µg / mL soka). Vrijednosti utvrđene u soku skladištenom pri temperaturama -80 °C i 4 °C se nisu međusobno značajno razlikovale, kao što se nisu ni razlikovale vrijednosti utvrđene u soku skladištenom pri -80 °C i -18 °C gdje je utvrđen značajno najniži sadržaj (27,0 µg / mL soka).

Tablica 3. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (bez skladištenja, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon prvog dana.

Tkivo	TEMPERATURA SKLADIŠTENJA				F test <i>P</i>
	na dan otkosa	4 °C	-18 °C	-80 °C	
List	38,1	33,9	32,4 ^a	36,1 ^a	1,73 0,2134
Sok	35,3 ^x	30,4 ^y	27,0 ^{b;z}	29,4 ^{b;yz}	13,08 0,0004
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	1,31 0,2954	12,15 0,0130	8,34 0,0277	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva pri istim temperaturama označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} *P* = 0,05); razlike između temperatura skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} *P* = 0,05).

Nakon 7. dana skladištenja, F testom je utvrđen značajan utjecaj temperature skladištenja na sadržaj vitamina C u tkivu lista i soku pšenične trave (list, *P* = 0,0029; sok, *P* = 0,0019), (Tablica 4.).

Tablica 4. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon sedmog dana.

Tkivo	TEMPERATURA SKLADIŠTENJA				F test <i>P</i>
	na dan otkosa	4 °C	-18 °C	-80 °C	
List	38,1 ^x	23,2 ^z	31,2 ^y	34,1 ^{xy}	8,30 0,0029
Sok	35,3 ^x	28,2 ^y	28,3 ^y	28,6 ^y	9,23 0,0019
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	5,05 0,0656	0,91 0,3764	3,59 0,1069	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva pri istim temperaturama označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} *P* = 0,05); razlike između temperatura skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} *P* = 0,05).

U listu pšenične trave skladištenom sedam dana pri 4 °C, LSD testom je utvrđen značajno najniži sadržaj vitamina C u listu, u usporedbi sa kontrolom. Nadalje, vrijednost utvrđena kod kontrole nije se značajno razlikovala od one utvrđene u tkivu lista skladištenom pri -80 °C. Sadržaj vitamina C utvrđen u listu skladištenom pri -18 °C, također se nije statistički

značajno razlikovao od sadržaja u listu čuvanog pri -80 °C. Nakon 7. dana skladištenja soka pšenične trave, utvrđen je značajan pad sadržaja vitamina C pri svim temperaturama skladištenja u usporedbi s sokom analiziranim na dan otkosa.

Nakon 14. dana skladištenja, F testom je utvrđen značajan utjecaj načina skladištenja tkiva na ukupan sadržaj vitamina C kod uzorka čuvanog pri temperaturi od -18 °C ($P = 0,0469$). Temperatura skladištenja je značajno utjecala na ukupan sadržaj vitamina C kod lista i soka pšenične trave (Tablica 5.).

Tablica 5. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon četrnaest dana.

Tkivo	TEMPERATURA SKLADIŠTENJA				F test <i>P</i>
	na dan otkosa	4 °C	-18 °C	-80 °C	
List	38,1 ^x	16,6 ^z	31,3 ^{a;y}	32,8 ^y	39,90 <0,0001
Sok	35,3 ^x	19,5 ^w	24,5 ^{b;z}	29,7 ^y	28,05 <0,0001
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	4,59 0,0759	6,22 0,0469	2,41 0,1718	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva pri istim temperaturama označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} $P = 0,05$); razlike između temperatura skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} $P = 0,05$).

LSD testom je utvrđen značajni pad ukupnog sadržaja vitamina C nakon 14 dana skladištenja u soku pšenične trave skladištenom pri 4 °C. Nakon 14. dana sadržaj vitamina C u listu je bio značajno niži pri 4 °C u usporedbi sa kontrolom analiziranom na dan otkosa, dok je pri temperaturi od -18 °C i -80 °C primijećen značajno niži pad koncentracije vitamina C u usporedbi sa kontrolom. U soku je kao i kod 7. dana, utvrđena značajno najveća koncentracija vitamina C pri -80 °C.

Nakon 21. dana skladištenja, F testom je utvrđen značajan utjecaj temperature skladištenja tkiva na ukupan sadržaj vitamina C kod uzorka čuvanog pri temperaturi od 4 °C ($P = 0,0013$) i -80 °C ($P = 0,0142$) (Tablica 6.). Kod tkiva lista, kao i kod soka pšenične trave utvrđen je značajan utjecaj temperature skladištenja na ukupan sadržaj vitamina C.

LSD testom utvrđen je značajan pad sadržaja vitamina C u listu skladištenog pri 4 °C i -18 °C nakon 21. dana u usporedbi s analizom na dan otkosa. Najmanji pad koncentracije

vitamina C u listu zabilježen je pri temperaturi od -80 °C. U soku je utvrđen najveći sadržaj vitamina C pri -80 °C, a značajan pad spomenutog parametra utvrđen je pri 4 °C i -18 °C u usporedbi s kontrolnom analizom. LSD test pokazao je statistički značajno niže koncentracije vitamina C u listu i soku pri svim temperaturama skladištenja u odnosu na koncentracije na dan otkosa.

Tablica 6. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon dvadeset prvog dana.

Tkivo	TEMPERATURA SKLADIŠTENJA				F test <i>P</i>
	na dan otkosa	4 °C	-18 °C	-80 °C	
List	38,1 ^x	12,4 ^{b;w}	24,1 ^z	31,1 ^{a;y}	102,17 <0,0001
Sok	35,3 ^x	20,4 ^{a;z}	22,2 ^{yz}	25,2 ^{b;y}	33,99 <0,0001
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	32,22 0,0013	1,11 0,3324	11,68 0,0142	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva pri istim temperaturama označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} *P* = 0,05); razlike između temperatura skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} *P* = 0,05).

Prema F testu, kod uzoraka čuvanih pri 4 °C utvrđen je statistički značajan utjecaj varijante skladištenja tkiva na sadržaj vitamina C, samo nakon 21. dana (Tablica 7.). Također, pri spomenutoj temperaturi, utvrđen je značajan utjecaj trajanja skladištenja na sadržaj vitamina C u tkivu lista i soku pšenične trave.

Nakon 21. dana skladištenja pri 4 °C, LSD testom je utvrđen značajno veći sadržaj vitamina C u soku pšenične trave, u usporedbi sa listom. U tkivu lista, sadržaj vitamina C nakon 1 dan pri 4 °C se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene kod kontrole. 7. dana je došlo do značajnog pada u sadržaju vitamina C, a značajno najniže vrijednosti su utvrđene 14. i 21. dan te se nisu statistički značajno razlikovale. Kod soka, skladištenog 1 dan pri 4 °C utvrđena je značajno niža vrijednost vitamina C te se nije značajno razlikovala od one utvrđene nakon 7. dana. Najniža vrijednost sadržaja vitamina C utvrđena je nakon 14. i 21. dana te se te dvije vrijednosti također nisu statistički značajno razlikovale.

Tablica 7. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri 4 °C.

Tkivo	TRAJANJE SKLADIŠTENJA					F test <i>P</i>
	na dan otkosa	1	7	14	21	
List	38,1 ^x	33,8 ^x	23,2 ^y	16,6 ^z	12,4 ^{b;z}	43,00 <0,0001
Sok	35,3 ^x	30,4 ^y	28,2 ^y	19,5 ^z	20,4 ^{a;z}	43,00 <0,0001
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	1,31 0,2954	5,05 0,0656	4,59 0,0759	32,22 0,0013	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva unutar istog dana označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} *P* = 0,05); razlike između dana skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} *P* = 0,05).

Pri -18 °C, F testom utvrđen je značajan utjecaj načina čuvanja tkiva na ukupan sadržaj vitamina C kod pšenične trave nakon 1. i 14. dana skladištenja (1. dan, *P* = 0,0130; 14. dan, *P* = 0,0469) (Tablica 8.). Također je utvrđen i značajan utjecaj dužine trajanja skladištenja na ukupnu koncentraciju C vitamina u listu i soku pšenične trave skladištenom pri -18 °C (list *P* = 0,0030; sok *P* ≤ 0,0001).

Tablica 8. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri -18 °C.

Tkivo	TRAJANJE SKLADIŠTENJA					F test <i>P</i>
	na dan otkosa	1	7	14	21	
List	38,1 ^{a;x}	32,4 ^{a;xy}	31,2 ^{a;y}	31,3 ^{a;y}	24,1 ^{a;z}	6,55 0,0030
Sok	35,3 ^{a;x}	27,0 ^{b;yz}	28,3 ^{a;y}	24,5 ^{b;zw}	22,2 ^{a;w}	22,15 <0,0001
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	12,15 0,0130	0,91 0,3764	6,22 0,0469	1,11 0,3324	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva unutar istog dana označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} *P* = 0,05); razlike između dana skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} *P* = 0,05).

LSD testom je utvrđen značajno veći sadržaj vitamina C u uzorcima lista koji su bili pohranjeni na -18 °C i analizirani nakon 1., 7. i 14. dana te između njih nije bilo statistički značajnih razlika. U tkivu lista uočen je značajan pad koncentracije vitamina C nakon 21. dana, dok se vrijednosti utvrđene nakon 1. dana nisu značajno razlikovale od kontrole. Pri -18 °C najniža koncentracija vitamina C u soku je zapažena u uzorcima koji su analizirani 14.

i 21. dana te se iste vrijednosti nisu značajno razlikovale. Pri spomenutoj temperaturi, ukupan sadržaj vitamina C u soku pšenične trave se statistički značajno razlikovao pri svim danima u usporedbi s vrijednostima dobivenih na dan otkosa.

Prema F testu, kod uzoraka čuvanih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ utvrđen je značajan utjecaj varijante skladištenja tkiva na ukupan sadržaj vitamina C nakon 1. i 21. dana skladištenja (1. dan $P = 0,0277$; 21. dan $P = 0,0142$) (Tablica 9.). Također je značajan i utjecaj broja dana skladištenja pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na koncentraciju vitamina C u soku pšenične trave ($P = 0,0014$).

Tablica 9. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

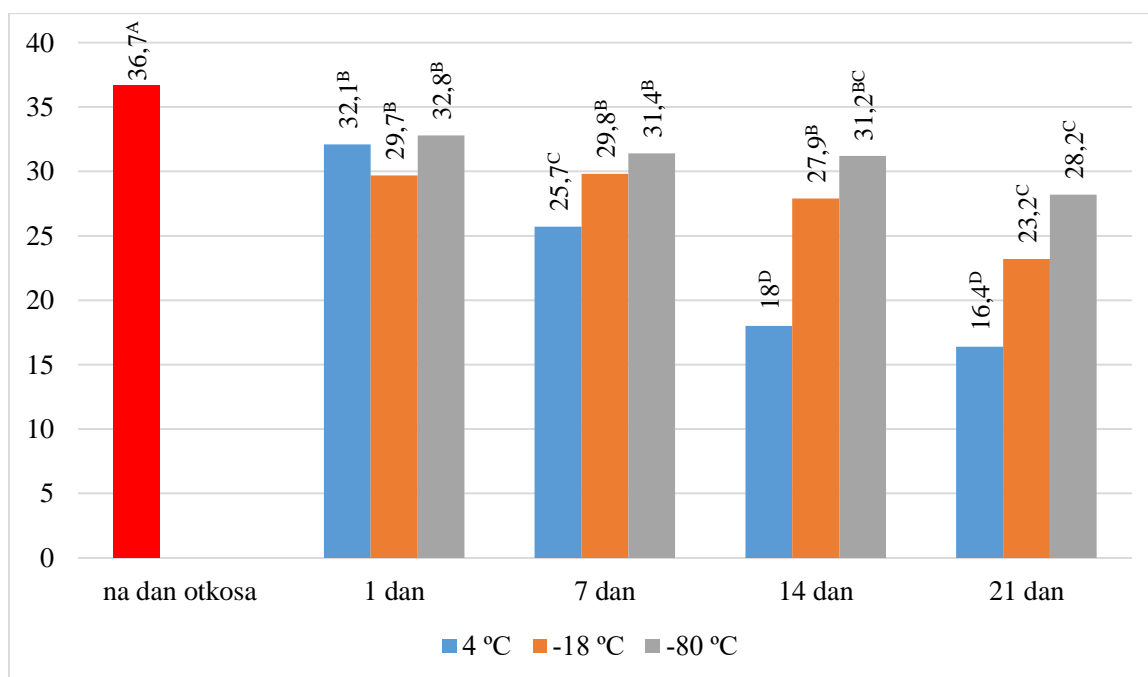
Tkivo	TRAJANJE SKLADIŠTENJA					F test <i>P</i>
	na dan otkosa	1	7	14	21	
List	38,1 ^{a;x}	36,1 ^{a;xy}	34,1 ^{a;xy}	32,8 ^{a;y}	31,1 ^{a;y}	2,75 0,0676
Sok	35,3 ^{a;x}	29,4 ^{b;y}	28,6 ^{a;yz}	29,7 ^{a;y}	25,2 ^{b;z}	7,71 0,0014
F test <i>P</i>	5,09 0,0648	8,34 0,0277	3,59 0,1069	2,41 0,1718	11,68 0,0142	

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između skladištenog tkiva unutar istog dana označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{a,b,c} $P = 0,05$); razlike između dana skladištenja za isto tkivo označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (^{x,y,z} $P = 0,05$).

Pri temperaturi skladištenja na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, LSD testom utvrđeno je značajno veći sadržaj vitamina C u listu pšenične trave u usporedbi sa sokom i to u svim terminima analize. U listu pšenične trave skladištenom pri spomenutoj temperaturi, značajno niži sadržaj vitamina C zabilježen je nakon 14. i 21. dana u usporedbi s analizom na dan otkosa, dok se vrijednosti dobivene nakon 1. i 7. dana nisu značajno razlikovale od kontrole. U soku pšenične trave skladištenog pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, najniža vrijednost vitamina C je zabilježena 21. dana. Koncentracije vitamina C u soku utvrđene nakon 1., 7. i 14. dana se nisu međusobno značajno razlikovale, ali su bile značajno niže u odnosu na kontrolu, odnosno uzorak soka analiziranog na dan otkosa.

5. RASPRAVA

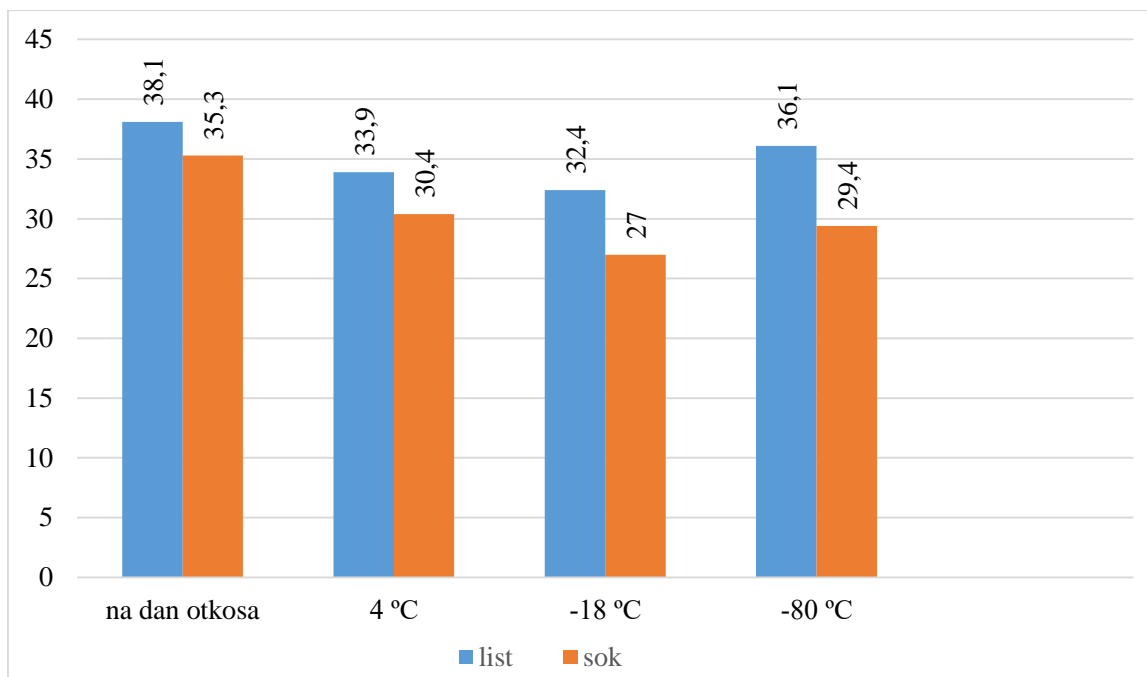
Popularizacijom pšenične trave proveden je veliki broj istraživanja u kojima je sok pšenične trave dodavan drugim komercijalnim sokovima u svrhu poboljšanja kvalitete nutritivnog sastava prvenstveno kroz povećanje sadržaja antioksidanasa, minerala i vitamina te drugih biološki aktivnih komponenti. Osim toga, bitna stvar za popularizaciju i distribuciju takvih proizvoda je pogoditi kombinaciju okusa koja će odgovarati tržištu, a s druge strane voditi brigu o tome da nutritivni sastav jednog soka ne umanjuje nutritivnu kvalitetu drugog, uslijed mogućih reakcija različitih kemijskih komponenti u njihovom sastavu. Nadalje, velik broj istraživanja je provedeno u svrhu utvrđivanja optimalnog načina i dužine čuvanja soka bez štetnih posljedica na degradaciju aktivnih komponenti. Kashudhan i sur. (2017.) su svojim istraživanjem dokazali da temperatura i drugi skladišni uvjeti značajno utječu na završnu kvalitetu proizvoda. Gubitak vitamina C u miješanom soku pšenične trave i naranče tijekom 30 dana, u skladišnim uvjetima pri sobnoj temperaturi, iznosi 65 % i 83,11 % klorofila, a kod skladištenja u hladnjaku gubitak iznosi 10,34 % i 65 % klorofila. Time je utvrđeno da mješavina sokova skladištena u hladnjaku ima bolje rezultate palatabilnosti i nutritivne vrijednosti.



Grafikon 1. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan) i temperature u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva (sok, list) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$) kod pšenične trave, Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost.

Iz grafikona 1 je vidljivo da u prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva, već nakon prvog dana dolazi do značajnog pada koncentracije C vitamina u usporedbi sa uzorkom koji je analiziran na dan otkosa. Pri -18 °C i -80 °C, prosječni pad sadržaja C vitamina nije tako izražen s danima skladištenja kao što je to pri 4 °C. To znači da, ukoliko moramo čuvati uzorak pšenične trave, puno bolje ga je skladištiti na duži period pri nižim temperaturama. Pri 4 °C, nakon 7. dana skladištenja dolazi do pada koncentracije spomenutog antioksidansa za čak 30 % u usporedbi s uzorcima analiziranim na dan otkosa, dok već nakon drugog tjedna skladištenja prosječni pad sadržaja iznosi oko 53 % (Grafikon 1.). Bez obzira na prosječan pad sadržaja C vitamina u listu i soku već nakon prvog dana skladištenja, razlike u koncentraciji između različitih temperatura skladištenja nisu značajne (Tablica 2.).

Kabasakalis i sur. (2000.) su ispitali sadržaj askorbinske kiseline u kupovnim voćnim sokovima i njezin gubitak pri različitim temperaturama i dužinama trajanja skladištenja. Zaključili su da je sadržaj askorbinske kiseline kupovnih voćnih sokova varirao u rasponu od 2,4 do 43 mg / 100 mL soka. Gubitak askorbinske kiseline različitih kupovnih sokova skladištenih u zatvorenim kontejnerima u razdoblju od 4 mjeseca pri sobnoj temperaturi varirao je između 29 % i 41 %. Kada su kontejneri otvoreni za konzumaciju i zatim uskladišteni u hladnjak na 31 dan, kupovni narančin sok (100 %) može izgubiti 60 - 67 % askorbinske kiseline dok u istim uvjetima i trajanju skladištenja gubitak askorbinske kiseline kod svježeg soka naranče je značajno niži te iznosi od 7 - 13 %. Kada su kontejneri otvoreni kod kupovnog soka naranče i ostavljeni izvan hladnjaka na 10 dana gubitak askorbinske kiseline je bio i do 12,5 %, dok se pri čuvanju u hladnjaku u istom vremenskom razdoblju, taj postotak umanjio za 9 %.

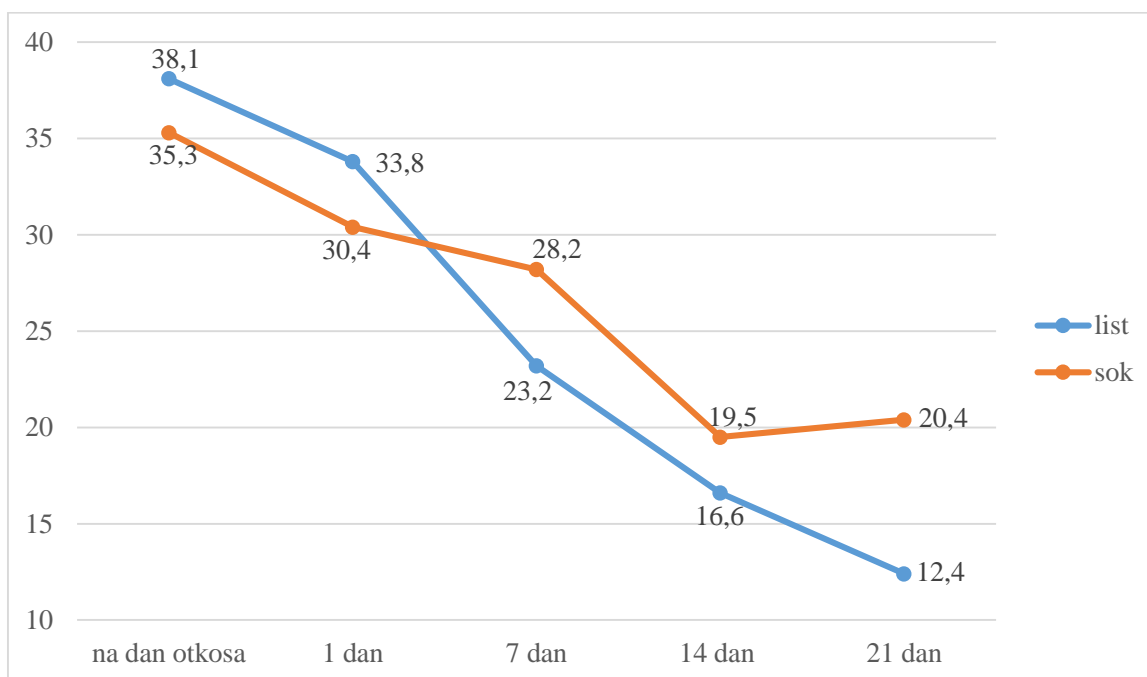


Grafikon 2. Utjecaj temperature skladištenja tkiva (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) nakon prvog dana skladištenja na ukupan sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$) u listu i soku pšenične trave.

U našem istraživanju je utvrđena statistički značajna razlika u načinu skladištenja tkiva. U odnosu na sok, list se pokazao boljim i stabilnijim za skladištenje, odnosno, gubitak vitamina C je bio znatno manji u usporedbi sa sokom. Na dan otkosa izmjerena je najveća koncentracija vitamina C u listu i soku pšenične trave. Nakon 24 sata koncentracija vitamina C je znatno pala pri 4 °C i -18 °C, a što je temperatura skladištenja bila niža, koncentracija vitamina C je sporije opadala. Tako je pri temperaturi od -80 °C došlo do smanjenja koncentracije od 5,2 % u listu i 16,7 % u soku u usporedbi s kontrolom koja je analizirana na dan otkosa (Grafikon 2.).

Das i sur. (2012.) su istraživali učinak liofilizacije i sušenja vrućim zrakom na razinu fenola, flavonoida i antioksidativnih svojstava sedam dana stare pšenične trave (*Triticum aestivum* L.) usitnjene u prah. Svježi uzorci pšenične trave, u usporedbi s varijantama sušenja, sadržavali su najviše vitamina C i klorofila, dok je sadržaj fenola i flavonoida bio najveći nakon sušenja vrućim zrakom. Nakon obrade, sadržaj askorbinske kiseline smanjuje se na 60 %, odnosno 54 % u odnosu na svježu pšeničnu travu. Postupak zagrijavanja trebao bi ubrzati oksidaciju askorbinske kiseline. Prilikom sušenja smrzavanjem ili sušenja vrućim zrakom rezultati pokazuju značajni porast sveukupnih fenola. To je vjerojatno zbog

oslobađanja fenolnih spojeva tijekom postupka sušenja. Pretpostavlja se da prerada hrane može ubrzati vezanje fenolnih spojeva zbog raspada staničnih strukturnih elemenata. Također, rezultati su pokazali značajno povećanje sadržaja ukupnih flavonoida prilikom sušenja na niskim i visokim temperaturama. Termičkom obradom pšenične trave sadržaj klorofila se smanjuje, najvjerojatnije zbog izomerizacije klorofila kada se centralni atom magnezija zamjenjuje s dva vodika pri čemu nastaju feofitin i feofobid.

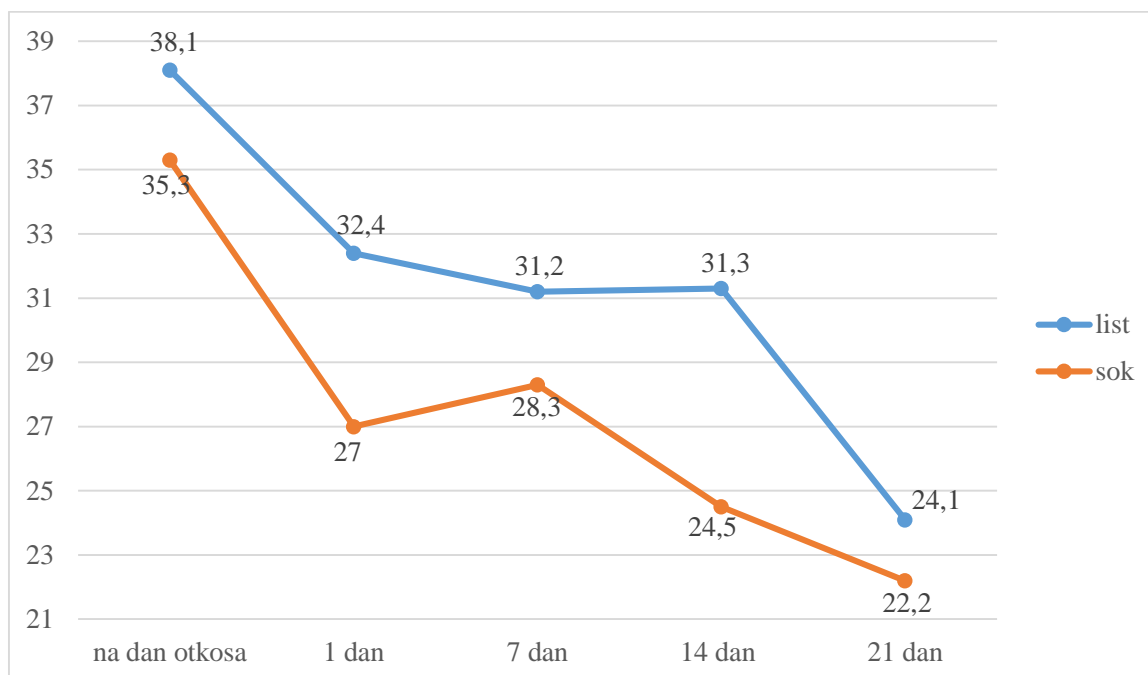


Grafikon 3. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri 4°C u soku i listu pšenične trave.

Povećanjem broja dana skladištenja tkiva lista i soka pšenične trave u hladnjaku pri 4°C , dolazi do pada koncentracije vitamina C. Osim na dan otkosa, najveće vrijednosti koncentracije u tkivu zabilježene su prvoga dana, a suprotno tome, najniže vrijednosti su dobivene 21. dana gdje je vidljivo smanjenje od 67,5 % u listu te 42,2 % u soku u usporedbi s kontrolom (Grafikon 3.). Ako usporedimo list i sok pšenične trave po danima skladištenja pri 4°C , nije bilo značajnih razlika u sadržaju C vitamina sve do 3. tjedna, kada je utvrđena značajno (39 %) niža koncentracija u soku, u usporedbi s listom.

Lee i sur. (1999.) su istraživali utjecaj skladištenja narančinog soka u zamrznutom, svježe iscjeđenom, nepasteriziranom stanju pakiranom u bocama od polietilena, na gubitak vitamina C na mjesečnoj razini u razdoblju od 24 mjeseca. Kroz navedeno razdoblje sadržaj vitamina C opada od početne vrijednosti $40,6 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ na $32 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ te je sveukupni gubitak 19,2 %. Prosječni mjesečni gubitak vitamina C je $0,34 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ soka.

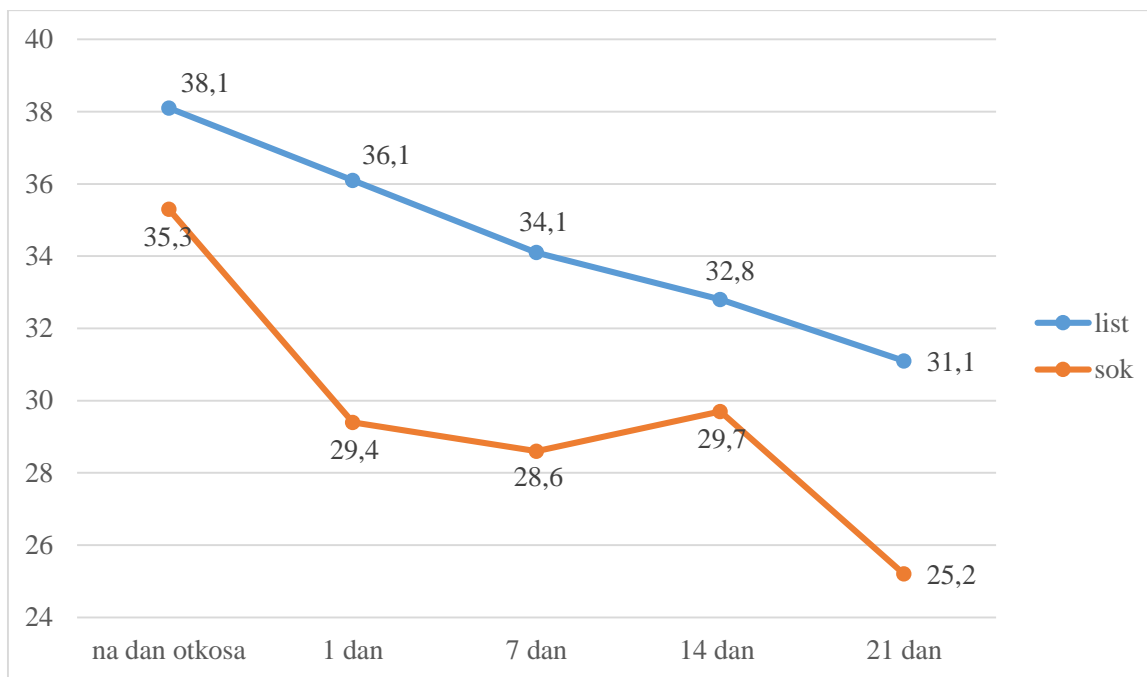
Procijenjeni rok trajanja soka prema etikeri hranjivih vrijednosti vitamina C iznosi 130 % dnevnog unosa, u razdoblju od 22 mjeseca skladištenja pri temperaturi -23 °C.



Grafikon 4. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ u soku i listu pšenične trave.

Skladištenjem soka i lista pšenične trave pri $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, sadržaj vitamina C u soku je značajno pao već nakon prvog dana skladištenja, dok u listu taj pad koncentracije nije bio značajan. Pri skladištenju na duže razdoblje pri $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, razlike u koncentraciji vitamina C u soku i listu više nisu bile značajne. Očekivano, najniža koncentracija vitamina C zabilježena je 21. dan te je u soku ona bila samo za 8 % niža, u usporedbi sa tkivom lista (Grafikon 4.).

Favell (1998.) je koristio vitamin C kao marker za izravnu usporedbu hranjivih vrijednosti svježeg povrća prilikom distribucije i skladištenja i istog komercijalno dostupnog povrća nakon brzog smrzavanja. Nakon 12 mjeseci skladištenja u hladnjači sadržaj vitamina C kod smrznutog graška i brokule bio je veći od sadržaja kod graška skladištenog u standardnim uvjetima u kućanstvu. Svježi grašak i brokula održali su početnu nutritivnu kvalitetu do 14. dana skladištenja na hladnom. Sadržaj vitamina C kod graška i mrkve nije pao nakon smrzavanja i 12-mjesečnog čuvanja u zamrzivaču te je i nakon toga bio sličan sadržaju utvrđenom nakon berbe. Autori zaključuju da je razina vitamina C u istraživanom povrću dostupnom u trgovini, nakon zamrzavanja jednaka ili veća od utvrđene u svježem povrću, veći u odnosu na 3 - 7 dana skladištenja pri temperaturi okoline ili u kombiniranim uvjetima niske temperature i temperature okoline.



Grafikon 5. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ u soku i listu pšenične trave.

I pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, list se pokazao stabilnijim od soka i prikladnijim za skladištenje, odnosno, vidljivi su manji gubici u sadržaju vitamina C. Blago povećanje koncentracije vitamina C u soku vidljivo je nakon 14. dana u odnosu na prvi i sedmi dan. Najniže vrijednosti sadržaja askorbinske kiseline su utvrđene 21. dana te je prosječni pad u usporedbi s kontrolom 18,4 % u listu odnosno 28,6 % u soku.

Skladištenje lista i soka pšenične trave pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ rezultiralo je znatno blažim oscilacijama negativnog trenda u odnosu na ostale temperature skladištenja (Grafikon 5.). Upravo iz tog razloga, temperatura od $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ se najčešće čini prikladnom za skladištenje uzoraka tkiva koji će nakon kratkog vremenskog razdoblja biti korišteni za većinu molekularnih analiza. Smatra se da se pri spomenutoj temperaturi enzimski procesi sinteze i razgradnje odnosno modifikacije metabolita znatno usporavaju te se vrijednosti istraživanih molekularnih parametara ne bi trebale značajno razlikovati kroz kraće razdoblje skladištenja, što pokazuje i naše istraživanje. Rezultati provedenog istraživanja upućuju na to da je, s nutritivnog aspekta, puno bolje skladištiti tkivo lista na duže vrijeme te iz njega pripremati svježi sok na dan konzumacije, nego skladištiti sok pripremljen na dan otkosa. Osnovni razlog je manji gubitak najznačajnijeg antioksidansa, vitamina C. Naime, sadržaj askorbinske kiseline ostaje na višoj razini u netaknutom tkivu jer prilikom ekstrakcije soka dolazi do narušavanja strukture staničnih membrana kao ultrastrukturnih barijera te prisutne fitokemikalije

reagiraju jedne s drugima. Time dolazi do narušavanja antioksidacijskih procesa i intenziviranja oksidacije pri čemu se puno brže i lakše troši vitamin C, a što se reflektira opadanjem antioksidativnog potencijala pšenične trave.

6. ZAKLJUČAK

1. Na dan otkosa izmjerena je najveća koncentracija vitamina C u listu i soku pšenične trave. U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva, već nakon prvog dana dolazi do značajnog pada koncentracije vitamina C u usporedbi sa kontrolom koja je analizirana na dan otkosa.
2. Pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, prosječni pad sadržaja C vitamina nije tako izražen s danima skladištenja kao što je to pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri navedenoj temperaturi značajniji je pad sadržaja vitamina C u soku za razliku od tkiva lista pšenične trave.
3. Pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ najniže vrijednosti vitamina C su dobivene 21. dana te je smanjenje iznosilo $67,5\%$ u listu te $42,2\%$ u soku u usporedbi s kontrolom. Do 3. tjedna čuvanja soka i lista pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nije bilo značajnih razlika u sadržaju vitamina C. 21. dan je utvrđeno 39% veće smanjenje sadržaja askorbinske kiseline u soku, u usporedbi s listom.
4. Pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sadržaj vitamina C u soku je značajno pao nakon prvog dana skladištenja dok u listu taj pad koncentracije nije bio značajan. Pri skladištenju na duži period pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, razlike u koncentraciji vitamina C u soku i listu više nisu značajne.
5. Skladištenje lista i soka pšenične trave pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rezultiralo je znatno blažim oscilacijama trenda pada sadržaja vitamina C u odnosu na ostale temperature skladištenja. Također, manji je ukupni pad vitamina C od prvog do 21. dana skladištenja te je on iznosio $18,4\%$ u listu odnosno $28,6\%$ u soku u usporedbi s kontrolom analiziranom neposredno nakon otkosa.
6. S nutritivnog aspekta, puno je bolje skladištiti tkivo lista na duži period te iz njega pripremati svježi sok na dan konzumacije, nego skladištiti sok pripremljen na dan otkosa.

7. POPIS LITERATURE

1. Amić, D. (2008). *Organska kemija za studente agronomske struke*. Školska knjiga d.d., Zagreb, 226-227.
2. Bar-Sela, G., Cohen, M., Ben-Arye, E., & Epelbaum, R. (2015). The medical use of wheatgrass: Review of the gap between basic and clinical applications. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(12), 1002-1010.
3. Chauhan, M. (2014). A pilot study on wheat grass juice for its phytochemical, nutritional and therapeutic potential on chronic diseases. *International journal of chemical studies*, 2(4), 27-34.
4. Das, A., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Effect of freeze drying and oven drying on antioxidant properties of fresh wheatgrass. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(6), 718-721.
5. Favell, D. J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food chemistry*, 62(1), 59-64.
6. Feldman M. 1995. Wheats. In: Smartt J, Simmonds NW, eds. *Evolution of crop plants*.
7. Giannakourou, M. C., & Taoukis, P. S. (2003). Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food Chemistry*, 83(1), 33-41.
8. González-Esteban, Á. L. (2017). Why wheat? International patterns of wheat demand, 1939–2010. *Investigaciones de Historia Económica*, 13(3), 135-150.
9. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical, 185–192.
10. Kabasakalis, V., Siopidou, D., & Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food chemistry*, 70(3), 325-328.
11. Kashudhan, H., Dixit, A., & Upadhyay, A. (2017). Optimization of ingredients for the development of wheatgrass based therapeutical juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 338-345.
12. Kaushal, V. S. (2017). Time dependent antioxidant activity in wheatgrass (*Triticum aestivum*). *European journal of pharmaceutical and medical research*, 4(9), 347-349.

13. Kulkarni, S. D., Acharya, R., Rajurkar, N. S., & Reddy, A. V. R. (2007). Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. *Food chemistry*, *103*(2), 681-688.
14. Kulkarni, S. D., Tilak, J. C., Acharya, R., Rajurkar, N. S., Devasagayam, T. P. A., & Reddy, A. V. R. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as a function of growth under different conditions. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *20*(3), 218-227.
15. Lee, H. S., & Coates, G. A. (1999). Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chemistry*, *65*(2), 165-168.
16. Mujoriya, R., & Bodla, R. B. (2011). A study on wheat grass and its Nutritional value. *Food Science and Quality Management*, *2*, 1-8.
17. Padalia, S., Drabu, S., Raheja, I., Gupta, A., & Dhamija, M. (2010). Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview. *Chronicles of young scientists*, *1*(2), 23.
18. Parit, S. B., Dawkar, V. V., Tanpure, R. S., Pai, S. R., & Chougale, A. D. (2018). Nutritional quality and antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum*) un-wrap by proteome profiling and DPPH and FRAP assays. *Journal of food science*, *83*(8), 2127-2139.
19. Pospišil A. (2010). Ratarstvo I. dio. Zrinski d.d., Čakovec, str. 7, 33.
20. Rana, S., Kamboj, J. K., & Gandhi, V. (2011). Living life the natural way—Wheatgrass and Health. *Functional foods in health and disease*, *1*(11), 444-456.
21. Roe, J. H., & Kuether, C. A. (1943). The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivavative of dehydroascorbic acid. *Journal of Biological chemistry*, *147*, 399-407.
22. Sagliano, F. S., & Sagliano, E. A. (1998). *U.S. Patent No. 5,820,916*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
23. Sareen, M., Baghla, P., Dhaka, P., Mathur, E., Sobti, P., & Khajuria, S. (2014). Wheat grass-a wonder herb. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *5*(1), 4.
24. Sharma, S., Shrivastav, V. K., Shrivastav, A., & Shrivastav, B. R. (2013). Therapeutic potential of wheat grass (*Triticum aestivum* L.) for the treatmentof chronic diseases. *South Asian Journal of Experimental Biology*, *3*(6), 308-313.

25. Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1537-1553.
26. Suriyavathana, M., & Roopavathi, I. (2016). Phytochemical characterization of *Triticum aestivum* (Wheat Grass). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1), 283.
27. Sutar-kapashikar, P. S., Gawali, T. R., Koli, S. R., Khot, A. S., Dehankar, S. P., & Patil, P. D. (2018). Phenolic content in *Triticum aestivum*: A Review.
28. Veltman, R. H., Kho, R. M., Van Schaik, A. C. R., Sanders, M. G., & Oosterhaven, J. (2000). Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2), 129-137.
29. Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992). *The grass genera of the world*. CAB international.
30. Zendeabad, S. H., Mehran, M. J., & Sudhakar Malla. (2014). Flavonoids and phenolic content in wheat grass plant (*Triticum aestivum*). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4), 184-187.

8. SAŽETAK

Mladi izdanci pšenice u ranom stadiju porasta, a prije ulaska biljke u fazu vlatanja, nazivaju se pšeničnom travom. Bogata je mineralima, vitaminima, klorofilom, enzimima, bioflavonoidima te se zbog kvalitete nutritivnog sastava koristi u prehrani ljudi i životinja kao prirodni dodatak i time se svrstava u funkcionalnu hranu. U svježem stanju nakon otkosa ili nakon skladištenja, konzumiraju se svježi listovi ili njihov sok, a na tržištu se mogu naći pripravci u obliku praha ili tableta. Cilj istraživanja je bio ispitati utjecaj dužine trajanja skladištenja (0, 7, 14 i 21 dan) i temperatura skladištenja (4 °C, -18 °C, -80 °C) uzoraka soka odnosno tkiva lista pšenične trave na ukupan sadržaj askorbinske kiseline, kao najvažnijeg antioksidansa i pokazatelja nutritivne kvalitete. Na dan otkosa utvrđen je najveći sadržaj vitamina C u listu i soku pšenične trave. U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva, već nakon prvog dana došlo je do značajnog pada koncentracije vitamina C u usporedbi s kontrolom analiziranom na dan otkosa. Skladištenje lista i soka pšenične trave pri -80 °C rezultiralo je znatno blažim oscilacijama trenda pada sadržaja vitamina C u odnosu na ostale temperature skladištenja. Značajniji pad sadržaja vitamina C je utvrđen u soku za razliku od tkiva lista pšenične trave. Rezultati pokazuju da je s nutritivnog aspekta i sadržaja vitamina C, najbolje konzumirati pšeničnu travu u svježem stanju. Također, ukoliko je potrebno, puno bolje je skladištiti tkivo lista na duže vrijeme te iz njega pripremati svježi sok na dan konzumacije, nego skladištiti sok pripremljen na dan otkosa.

9. SUMMARY

Young shoots of wheat in the early stage of growth, and before the plant enters the stem extension phase, are called wheatgrass. It is rich in minerals, vitamins, chlorophyll, enzymes, bioflavonoids and due to the quality of its nutritional composition it is used in human and animal nutrition as a natural supplement and thus is classified as a functional food. In the fresh state after cutting or after storage, fresh leaves or their juice are consumed, and preparations in the form of powders or tablets can be found on the market. The aim of the study was to examine the effect of storage duration (0, 7, 14 and 21 days) and storage temperature (4 °C, -18 °C, -80 °C) of wheatgrass juice or leaf tissue samples on the total ascorbic acid content, as the most important antioxidant and nutritional quality indicator. On the day of cutting, the highest content of vitamin C in the leaves and juice of wheat grass was determined. On average for both variants of tissue storage, already after the first day there was a significant decrease in the concentration of vitamin C compared to the control analyzed on the day of cutting. Storage of wheat grass leaves and juice at -80 °C resulted in significantly lower oscillations of the downward trend in vitamin C content, compared to other storage temperatures. A significant decrease in the content of vitamin C was found in the juice, in contrast to the tissue of wheatgrass leaves. The results show that from the nutritional aspect and the content of vitamin C, it is best to consume fresh wheatgrass fresh. Also, if necessary, it is much better to store leaf tissue for a longer period and prepare fresh juice from it on the day of consumption, than to store juice prepared on the day of cutting.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj duljina skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan) u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva te načina čuvanja tkiva (sok, list) u prosjeku za sve duljine skladištenja i njihove interakcije na ukupni sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi, pri različitim temperaturama skladištenja (4 °C, -18 °C, -80 °C). Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost. (Stranica 17)

Tablica 2. Utjecaj temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C), u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva te utjecaj načina čuvanja tkiva (sok, list) u prosjeku za sve temperature skladištenja i njihove interakcije na ukupni sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi, po danima skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan). Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost. (Stranica 18)

Tablica 3. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (bez skladištenja, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon prvog dana. (Stranica 20)

Tablica 4. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon sedmog dana. (Stranica 20)

Tablica 5. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon četrnaest dana. (Stranica 21)

Tablica 6. Značajnost utjecaja skladištenja tkiva (list, sok) i temperature skladištenja (na dan otkosa, 4 °C, -18 °C, -80 °C) na ukupan sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi nakon dvadeset prvog dana. (Stranica 22)

Tablica 7. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri 4 °C. (Stranica 23)

Tablica 8. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri -18 °C. (Stranica 23)

Tablica 9. Utjecaj skladištenja tkiva (list, sok) i dužine trajanja skladištenja u danima (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C u pšeničnoj travi pri -80 °C. (Stranica 24)

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Nutritivni sastav pšenične trave. Prikazane vrijednosti odnose se na 100 mL soka. (Izvor: Padalia i sur., 2010.) (Stranica 2)

Slika 2. Oksidacija L-askorbinske kiseline u L-dehidroaskorbinsku kiselinu (Izvor: Amić, 2008.) (Stranica 3)

Slika 3. Antioksidativna aktivnost pšenične trave determinirana pomoću DPPH nakon 0, 8 i 16 dana nakon klijanja. (Izvor: Parit i sur., 2018.) (Stranica 9)

Slika 4. Dnevne promjene u ukupnom sadržaju flavonoida i antioksidativne aktivnosti u soku pšenične trave. Podaci su prikazani unutar granica standardne devijacije ($n = 3$) (Izvor: Kaushal, 2017.) (Stranica 10)

Slika 5. Ovisnost antioksidativne aktivnosti na sadržaj ukupnih flavonoida u soku pšenične trave (Izvor: Kaushal, 2017.) (Stranica 10)

Slika 6. (a) Rezultati gubitka vitamina C kroz vrijeme pri četiri temperature skladištenja na polulogaritamskoj skali. Točke predstavljaju: \diamond (-3 °C), Δ (-8 °C), $+$ (-12 °C) i \circ (-20 °C), a linije predstavljaju vrijeme trajanja skladištenja u danima ($R^2 > 0.972$ za sve temperature). **(b)** Prosječan vijek trajanja pri 50 %-om gubitka vitamina C za zamrznuti špinat na polulogaritamskoj skali (Izvor: Giannakourou i sur., 2003.) (Stranica 12)

Slika 7. Sjetva divljeg srodnika pšenice *Triticum aestivum* ssp. *spherocum*; sjeme je podjednako raspoređeno na tresetu (Stranica 13)

Slika 8. (a) Rezanje pšenične trave pri dnu; **(b)** Priprema soka u sokovniku za pšeničnu travu (Stranica 14)

Slika 9. Maceriranje lisne mase tekućim dušikom (Stranica 15)

Slika 10. Vaganje usitnjenog tkiva (Stranica 15)

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21 dan) i temperature u prosjeku za obje varijante načina čuvanja tkiva (sok, list) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$) kod pšenične trave, Varijanta „na dan otkosa“ predstavlja kontrolnu vrijednost. (Stranica 25)

Grafikon 2. Utjecaja temperature skladištenja tkiva (bez skladištenja, 4 °C, -18 °C, -80 °C) nakon prvog dana skladištenja na ukupan sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), u listu i soku pšenične trave. (Stranica 27)

Grafikon 3. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri 4 °C u soku i listu pšenične trave. (Stranica 28)

Grafikon 4. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri -18 °C u soku i listu pšenične trave. (Stranica 29)

Grafikon 5. Utjecaj trajanja skladištenja (na dan otkosa, 1, 7, 14, 21) na sadržaj vitamina C ($\mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$), pri -80 °C u soku i listu pšenične trave. (Stranica 30)

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ishrana bilja i tloznanstvo**

**UTJECAJ UVJETA SKLADIŠTENJA NA SADRŽAJ ASKORBINSKE KISELINE U
PŠENIČNOJ TRAVI**

Laura Tenžera

Sažetak:

Mladi izdanci pšenice u ranom stadiju porasta, a prije ulaska biljke u fazu vlatanja, nazivaju se pšeničnom travom. Bogata je mineralima, vitaminima, klorofilom, enzimima, bioflavonoidima te se zbog kvalitete nutritivnog sastava koristi u prehrani ljudi i životinja kao prirodni dodatak i time se svrstava u funkcionalnu hranu. U svježem stanju nakon otkosa ili nakon skladištenja, konzumiraju se svježi listovi ili njihov sok, a na tržištu se mogu naći pripravci u obliku praha ili tableta. Cilj istraživanja je bio ispitati utjecaj dužine trajanja skladištenja (0, 7, 14 i 21 dan) i temperatura skladištenja (4 °C, -18 °C, -80 °C) uzoraka soka odnosno tkiva lista pšenične trave na ukupan sadržaj askorbinske kiseline, kao najvažnijeg antioksidansa i pokazatelja nutritivne kvalitete. Na dan otkosa utvrđen je najveći sadržaj vitamina C u listu i soku pšenične trave. U prosjeku za obje varijante skladištenja tkiva, već nakon prvog dana došlo je do značajnog pada koncentracije vitamina C u usporedbi sa kontrolom analiziranom na dan otkosa. Skladištenje lista i soka pšenične trave pri -80 °C rezultiralo je znatno blažim oscilacijama trenda pada sadržaja vitamina C u odnosu na ostale temperature skladištenja. Značajniji pad sadržaja vitamina C je utvrđen u soku za razliku od tkiva lista pšenične trave. Rezultati pokazuju da je s nutritivnog aspekta i sadržaja vitamina C, najbolje konzumirati pšeničnu travu u svježem stanju. Također, ukoliko je potrebno, puno bolje je skladištiti tkivo lista na duži period te iz njega pripremati svježi sok na dan konzumacije, nego skladištiti sok pripremljen na dan otkosa.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak

Broj stranica: 41

Broj slika i grafikona: 15

Broj tablica: 9

Broj literaturnih navoda: 30

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: vitamin C, pšenična trava, sok, tkivo lista, skladišni uvjeti

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu

1. izv.prof.dr.sc. *Andrijana Rebekić*, predsjednik

2. izv.prof.dr.sc *Miroslav Lisjak*, mentor

3. prof.dr.sc. *Tihana Teklić*, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, course Plant nutrition and soil science

INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS ON CONTENT OF ASCORBIC ACID IN WHEATGRASS

Laura Tenžera

Summary:

Young shoots of wheat in the early stage of growth, and before the plant enters the stem extension phase, are called wheatgrass. It is rich in minerals, vitamins, chlorophyll, enzymes, bioflavonoids and due to the quality of its nutritional composition it is used in human and animal nutrition as a natural supplement and thus is classified as a functional food. In the fresh state after cutting or after storage, fresh leaves or their juice are consumed, and preparations in the form of powders or tablets can be found on the market. The aim of the study was to examine the effect of storage duration (0, 7, 14 and 21 days) and storage temperature (4 °C, -18 °C, -80 °C) of wheat grass juice or leaf tissue samples on the total ascorbic acid content, as the most important antioxidant and nutritional quality indicator. On the day of cutting, the highest content of vitamin C in the leaves and juice of wheat grass was determined. On average for both variants of tissue storage, already after the first day there was a significant decrease in the concentration of vitamin C compared to the control analyzed on the day of cutting. Storage of wheat grass leaves and sap at -80 °C resulted in significantly lower oscillations of the downward trend in vitamin C content, compared to other storage temperatures. A significant decrease in the content of vitamin C was found in the juice, in contrast to the tissue of wheatgrass leaves. The results show that from the nutritional aspect and the content of vitamin C, it is best to consume wheat grass fresh. Also, if necessary, it is much better to store leaf tissue for a longer period and prepare fresh juice from it on the day of consumption, than to store juice prepared on the day of cutting.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: Miroslav Lisjak, PhD, associate professor

Number of pages: 41

Number of figures: 15

Number of tables: 9

Number of references: 30

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: vitamin C, wheatgrass, juice, leaf tissue, storage conditions

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Andrijana Rebekić, PhD, associate professor

2. Miroslav Lisjak, PhD, associate professor

3. Tihana Teklić, PhD, full professor

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.