

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOLOŠKIH IN
BIOTEHNIŠKIH ZNANOSTI

Kajetan TROŠT

**VPLIV TEHNOLOŠKIH POSTOPKOV NA SPREMEMBE FENOLNIH
SPOJIN V SOKOVIH IN NEKTARJIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL PROCEDURES ON
CHANGING OF PHENOLIC SUBSTANCES IN JUICES AND
NECTARS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2009

Doktorsko delo je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Analize so bile opravljene v Ljubljani na Kemijskem inštitutu, v Laboratoriju za prehrambeno kemijo. Vzorčenje in priprava vzorcev sta bila izvedena v Ajdovščini v Fructalu d.d. v razvojnem laboratoriju podjetja.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata univerze z dne 19.9.2007 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva.

Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Janez Hribar, za somentorico pa dr. Alenka Golc Wondra, razvojno-raziskovalna svetnica.

Mentor: prof. dr. Janez HRIBAR

Somentorica: dr. Alenka GOLC WONDRA, razvojno-raziskovalna svetnica

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Božidar ŽLENDER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Janez HRIBAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Andrej PLESTENJAK, doc.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Alenka GOLC WONDRA, razvojno-raziskovalna svetnica
Ljubljana, Kemijski inštitut, Laboratorij za prehrambeno kemijo

Datum zagovora: 8. 5. 2009

Delo je rezultat lastnega znanstveno raziskovalnega dela.

Doktorand:

Kajetan TROŠT

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 663.813.05:634.31:634.73/.74:577.1:547.56(043)=163.6
KG sadni sokovi/sadni nektarji/stabilnost sokov/stabilnost nektarjev/borovnica/aronija/pomaranča/borovničev nektar/pomarančni sok/antioksidanti/fenolne spojine/polifenoli/antociani/flavanoli/fenolne kisline/antioksidativna učinkovitost/vitamin C/karotenoidi/HMF/skladiščenje soka/tehnološki postopki/pakiranje/emblažni materiali/steklo/karton/PET
AV TROŠT, Kajetan, univ. dipl. inž. kem. inž.
SA HRIBAR, Janez (mentor)/GOLC WONDRA, Alenka (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje: živilstvo
LI 2009
IN VPLIV TEHNOLOŠKIH POSTOPKOV NA SPREMEMBE FENOLNIH SPOJIN V SOKOVIH IN NEKTARJIH
TD Doktorska disertacija
OP XXII, 186 str., 69 pregl., 29 sl., 23 pril., 145 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Nektar iz borovnic ter nektar iz borovnic in aronije sta znana kot bogat vir antocianov, ostalih fenolov in antioksidantov, ki pa se tekom skladiščenja proizvoda v veliki meri razgradijo. Prav tako se uničijo fenoli in drugi antioksidanti, ki jih vsebuje pomarančni sok. Vplivi, ki so bili preučevani v tej študiji, so dostopnost kisika, ki je povezana z vrsto embalaže kot tudi vrsto samega fenola ali drugega antioksidanta. Začetna vrednost fenolov in drugih antioksidantov je odvisna od vrste tehnološkega postopka. Študija primerja vsebnosti polifenolov in ostalih antioksidantov tekom skladiščenja za aseptično napolnjen pomarančni sok in borovničev nektar v polietilen tereftalat (PET) embalažo z različnimi zaščitami za kisik. Drugi del študije opredeljuje razlike med aseptičnim polnjenjem v večslojno kartonsko embalažo in vročim polnjenjem v stekleno embalažo. Za parametre stabilnosti borovničevega nektarja so bili izbrani: skupni polifenoli, posamezni antociani in antioksidativna učinkovitost. Izdelana je bila lestvica stabilnosti posameznih identificiranih antocianov, pri čemer se je cianidin 3-glukozid izkazal kot najbolj stabilen. Pri pomarančnem soku so bile stabilnostne študije izdelane s pomočjo skupnih polifenolov, posameznih karotenoidov, antioksidativne učinkovitosti, askorbinske kisline, fenolnih kislin, flavonoidov in HMF. Med posameznimi identificiranimi karotenoidi je lutein najbolj stabilen. Izmed PET plastenik najslabše ohranja fenole in ostale antioksidante plastenka iz referenčnega PET-a. Troslojna PET plastenka pa fenole in antioksidante najboljše zaščiti. Proizvod, napolnjen po tehnologiji aseptičnega polnjenja vsebuje večje vsebnosti fenolnih snovi in ostalih antioksidantov kot proizvod napolnjen po tehnologiji vročega polnjenja. Po drugi strani pa steklena embalaža, ki se uporablja pri tehnologiji vročega polnjenja, ohranja proizvod kakovostnejši daljši čas kot večslojna kartonska embalaža. Razlike so bile pri pomarančnem soku manj opazne kot pri borovničevem nektarju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 663.813.05:634.31:634.73/.74:577.1:547.56(043)=163.6
CX fruit juices/fruit nectars/fruit juice stability/fruit nectar stability/
blueberry/aronia/orange/blueberry nectar/orange juice/ antioxidants/phenolic
compounds/polyphenols/anthocyanins/flavanols/phenolic acids/antioxidative
capacity/vitamin C/carotenoids/HMF/storing/fruit juice technology/packaging/packaging
materials/glass/carton/polyethylene terephthalate
AU TROŠT, Kajetan
AA HRIBAR, Janez (supervisor)/GOLC WONDRA, Alenka (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and
Biotechnical Sciences
PY 2009
TI INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL PROCEDURES ON CHANGING OF PHENOLIC
SUBSTANCES IN JUICES AND NECTARS
DT Doctoral Dissertation
NO XXII, 186 p., 69 tab., 29 fig., 23 ann., 145 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Blueberry nectar and blueberry aronia nectar are known to be a rich source of anthocyanins, other phenols and antioxidants. These are mostly destroyed during shelf life of the commercial product. During storage, phenols and other antioxidants from orange juice are also destroyed. Influences determined in this study are oxygen availability depending on packaging type and chemical structure of individual substance. The initial concentration of observed parameters depended on the technological procedure used. Study compares content of polyphenols and other antioxidants during commercial storage for blueberry nectar and orange juice aseptically filled in polyethylene terephthalate (PET) packaging with different oxygen barriers. The second part compares orange juice and blueberry aronia nectar, commercially filled by aseptic technology in carton and by hot fill technology in glass. In blueberry nectar, stability studies were made using total polyphenols, individual anthocyanins and antioxidant activity. A scale for individual anthocyanin degradation rates was made. The scale determined cyanidin 3-glucoside as the most stable. In orange juice stability studies were made using total polyphenol, individual carotenoid, ascorbic acid, phenolic acids, flavonoid, HMF concentration and antioxidant activity. Among carotenoids analyzed, lutein was found to be the most stable. Regarding PET bottles the minimum preservation of the observed parameters was found in bottles made without oxygen scavenger. Three- layer bottles offered maximum protection to the product. Product filled by aseptic technology undergoes smaller initial changes than product filled by hot fill technology. However, laminated carton gives lower protection in comparison to glass packaging more common for hot fill technology. Regarding the observed parameters, orange juice was found to be more stable than blueberry nectar.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTAT	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO SLIK	XVI
KAZALO PRILOG	XVIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XX
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 TEHNOLOGIJE ASEPTIČNEGA TER VROČEGA POLNJENJA	4
2.1.1 Priprava pred polnjenjem	4
2.1.1.1 Filtracija	4
2.1.1.2 Deaeracija, homogenizacija, pasterizacija in hlajenje	4
2.1.2 Aseptično polnjenje v kartonsko embalažo	5
2.1.2.1 Sterilizacija embalaže	5
2.1.2.2 Sterilno polnjenje	6
2.1.2.3 Sterilizacija s paro	6
2.1.2.4 Sterilizacija s kombinacijo toplote in kemičnih sredstev	6
2.1.2.5 Vzdrževanje sterilnosti	6
2.1.2.6 Sterilnost napolnjenega proizvoda	6
2.1.2.7 Uporaba vodikovega peroksida za sterilizacijo	7
2.1.2.8 Ostanek vodikovega peroksida	7
2.1.2.9 Embalažni materiali	7
2.1.2.9.1 Permeacija	8
2.1.3 Aseptično polnjenje v PET embalažo	8
2.1.3.1 Polietilen tereftalat (PET)	8
2.1.3.1.1 Proizvodnja polietilen tereftalata	9
2.1.3.1.2 Mehanske lastnosti	9
2.1.3.1.3 Aplikacije PET-a v pakiranju	10
2.1.3.1.4 Prepustnost kisika in ogljikovega dioksida	10
2.1.3.2 Karakteristični procesi na aseptični polnilni liniji za polnjenje v PET embalažo	11
2.1.3.2.1 Napihovanje	11
2.1.3.2.2 Nanašanje barrier	12

2.1.3.2.3	Čiščenje	12
2.1.3.2.4	Polnjenje	13
2.1.3.2.5	Zapiranje	13
2.1.3.2.6	Pakirni postopki	13
2.1.3.2.7	Etiketiranje	14
2.1.3.2.8	Transportna embalaža	14
2.1.4	Tehnologija vročega polnjenja v steklo	14
2.1.4.1	Depaletizacija in izpiranje	15
2.1.4.2	Kontrola steklenic	15
2.1.4.3	Polnjenje iz zapiranje	15
2.1.4.4	Dogrevanje in hlajenje	15
2.1.4.5	Etiketiranje in datiranje	15
2.1.4.6	Transportno pakiranje	16
2.1.4.7	Paletizacija in skladiščenje	16
2.1.5	Čiščenje	16
2.1.5.1	Začetno izpiranje	16
2.1.5.2	Čiščenje	16
2.1.5.3	Končno izpiranje	17
2.1.5.4	Ročno čiščenje	17
2.1.5.5	CIP (Cleaning in place)	17
2.1.5.6	Vrste kemikalij	17
2.1.5.7	Koncentracija	17
2.1.5.8	Kontakt med čistilom in površino	18
2.1.5.9	Kontaktni čas	18
2.1.5.10	Temperatura	18
2.1.6	Preprečevanje oksidacijskih procesov v živilih	18
2.1.6.1	Uvod	18
2.1.6.2	Embalažni materiali	20
2.1.6.3	Tehnike pakiranja	21
2.2	KEMIJSKA SESTAVA SADJA IN OKSIDACIJA	22
2.2.1	Sestava sadja	22
2.2.1.1	Ogljikovi hidrati	22
2.2.1.2	Vitamini	22
2.2.1.3	Minerali	23
2.2.1.4	Prehranska vlaknina	23
2.2.1.5	Proteini	23
2.2.1.6	Lipidi	23
2.2.1.7	Arome	23
2.2.1.8	Organske kisline	24

2.2.1.9	Fenoli	24
2.2.1.10	Barvila	24
2.2.1.10.1	Karoteni in karotenoidi	25
2.2.1.10.2	Antociani	25
2.2.1.10.3	Melanoidi	25
2.2.1.11	Prehranska tabela za borovnice	26
2.2.1.12	Prehranska tabela za pomaranče	28
2.2.2	Mehanizmi oksidacije naravnih spojin v sadju	29
2.2.2.1	Encimsko porjavenje in polifenol oksidaze (PPO)	29
2.2.2.1.1	Polifenol oksidaze	30
2.2.2.1.2	Kontrola porjavenja	30
2.2.2.1.3	Toplotna obdelava in hlajenje	31
2.2.2.2	Neencimsko temnenje	31
2.3	OKSIDACIJSKI PROCESI V ČLOVEŠKEM ORGANIZMU	33
2.3.1	Reaktivne kisikove spojine (RKS)	33
2.3.1.1	Razdelitev in izvor prostih radikalov	33
2.3.1.2	Definicija RKS	33
2.3.1.3	Nastanek superoksidnega radikala	33
2.3.1.3.1	Nastanek superoksidnega radikala pri motnji v dihalni verigi	33
2.3.1.3.2	Nastanek superoksidnega radikala kot del imunskega odziva	34
2.3.1.3.3	Nastanek superoksidnega radikala zaradi zunanjih vplivov	34
2.3.1.4	Peroksid	35
2.3.1.5	Hidroksi radikal	35
2.3.1.6	Peroksi radikali	35
2.3.1.7	Singletni molekularni kisik	36
2.3.1.8	Dušikov anionski radikal	36
2.3.2	Encimsko in neencimsko preprečevanje oksidacije	36
2.3.2.1	Encimsko preprečevanje oksidacije	36
2.3.2.2	Neencimsko preprečevanje oksidacije	37
2.3.2.2.1	Vitamini	37
2.3.2.2.1.1	Vitamin C	37
2.3.2.2.1.2	Vitamin E	38
2.3.2.2.1.3	Vitamin A	39
2.3.2.2.2	Karotenoidi	40
2.3.2.2.2.1	Karotenoidi, ki so v hrani najbolj pogosti	41
2.3.2.2.3	Fenoli	46
2.3.2.2.3.1	Flavonoidi	48
2.3.2.2.3.2	Antociani	49
2.3.2.2.3.3	Vloga antocianov v rastlinah	50

2.3.2.2.3.4	Fenolne kisline	50
2.3.2.2.3.5	Hidroksibenzojske kisline	50
2.3.2.2.3.6	Hidroksicimetne kisline	51
2.3.2.3	Razpad antioksidantov	52
2.3.3	Oksidativne poškodbe tkiv in povezanost z boleznimi	52
2.3.3.1	Kardiovaskularne bolezni	53
2.3.3.2	Lipidna peroksidacija	54
2.3.3.3	Rakasta obolenja	55
2.3.3.4	Sladkorna bolezen	56
2.3.3.5	Neurološke bolezni: Alzheimerjeva bolezen (AD)	56
2.3.3.6	Bolezni imunskega sistema	57
2.3.3.7	AIDS	58
2.3.3.8	Starostne bolezni vida	58
3	MATERIALI IN METODE	59
3.1	ZASNOVA POSKUSOV	59
3.2	MATERIALI	62
3.2.1	Priprava vzorcev za aseptično polnjenje v kartonsko embalažo in vroče polnjenje v stekleno embalažo	62
3.2.1.1	Sestava nektarja iz borovnic in aronije	62
3.2.1.2	Sestava pomarančnega soka	62
3.2.1.3	Procesiranje	62
3.2.1.4	Pakiranje	62
3.2.1.5	Pakirni materiali	63
3.2.1.6	Hranjenje in vzorčevanje	63
3.2.2	Priprava vzorcev za aseptično polnjenje v PET	63
3.2.2.1	Sestava borovnica	63
3.2.2.2	Sestava pomaranča	63
3.2.2.3	Procesiranje	64
3.2.2.4	Pakirni materiali	64
3.2.2.5	Polnjenje in zapiranje	64
3.2.2.6	Skladiščenje in vzorčenje	64
3.3	METODE	65
3.3.1	Določanje antocianov	65
3.3.1.1	HPLC-MS – tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo	65
3.3.1.2	HPLC-Vis – tekočinska kromatografija z spektroskopijo v vidnem delu	70
3.3.2	Določanje polifenolov, fenolnih kislin in 5-hidroksimetil furfurala (HMF)	73
3.3.3	Določanje karotenoidov	76
3.3.4	Določanje C-vitamina	81

3.3.5	Določanje saharoze, glukoze in fruktoze z tankoplastno kromatografijo	82
3.3.6	Določanje skupnih polifenolov	84
3.3.7	Spektrofotometrično določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH	84
3.3.8	Določanje barve	85
3.3.9	Meritve kisika	85
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	86
3.4.1	Statistični model 1	86
3.4.2	Statistični model 2	86
4.	REZULTATI	88
4.1	NEKTAR IZ BOROVRTIC IN ARONIJE, NAPOLNEN V STEKLENO EMBALAŽO IN EMBALAŽO IZ VEČSLOJNEGA KARTONA	88
4.1.1	Analize antocianov v nektarju iz borovnic in aronije	88
4.1.1.1	Statistični testi za opredelitev signifikantnih razlik med različnimi nakloni degradacijskih krivulj	95
4.2	NEKTAR IZ BOROVRTIC, NAPOLNEN V PET EMBALAŽO	104
4.2.1	Analize antocianov v borovničevem nektarju	105
4.2.1.1	Normalizirana razlika procentualnih deležev pri različnih antocianih	112
4.2.2	Analize antioksidativne učinkovitosti po metodi DPPH v borovničevem nektarju	114
4.2.3	Analize skupnih fenolov kot ekvivalenta galne kisline v borovničevem nektarju	115
4.3	POMARANČNI SOK, NAPOLNEN V PET EMBALAŽO	115
4.3.1	Analize karotenoidov v pomarančnem soku, napolnjenem po aseptični tehnologiji	116
4.3.2	Analize antioksidativne učinkovitosti v pomarančnem soku, napolnjenem po aseptični tehnologiji	117
4.3.3	Analize skupnih fenolov kot ekvivalenta galne kisline v pomarančnem soku	117
4.3.4	Analize askorbinske kisline v pomarančnem soku	118
4.4	POMARANČNI SOK, NAPOLNEN V STEKLENO EMBALAŽO IN EMBALAŽO IZ VEČSLOJNEGA KARTONA	119
4.4.1	Meritve HMF	120
4.4.2	Meritve fenolnih kislin	121
4.4.3	Meritve flavonoidov	124
4.4.4	Meritve karotenoidov	128
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	133
5.1	RAZPRAVA	133
5.2	SKLEPI	144
6	POVZETEK	147

6.1	POVZETEK	147
6.2	SUMMARY	151
7	VIRI	155
	PRILOGE	170

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Količina kisika, ki povzroča nesprejemljive senzorične spremembe pakiranih živil (Plestenjak in Požrl, 2000)	19
Preglednica 2. Konstanta prepustnosti (p) različnih plastičnih mas za kisik, dušik, CO ₂ in vodne pare (Plestenjak in Požrl, 2000)	21
Preglednica 3. Prehranske vrednosti za 100 g svežih borovnic (Souci in sod., 2008)	26
Preglednica 4. Prehranske vrednosti za 100 g pomaranč (Souci in sod., 2008)	28
Preglednica 5. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvalitativno določanje antocianov	66
Preglednica 6. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje antocianov	71
Preglednica 7. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje fenolov, fenolnih kislin in HMF	75
Preglednica 8. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje karotenoidov	78
Preglednica 9. Tabela koncentracij posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v večslojni karton, v odvisnosti od časa termostatiranja	89
Preglednica 10. Tabela koncentracij posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v stekleno embalažo, v odvisnosti od časa termostatiranja	90
Preglednica 11. Koeficienti degradacijskih hitrosti v odvisnosti od vrste antociana in embalaže	94
Preglednica 12. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano glukozo v proizvodih, napolnjenih v steklo	95
Preglednica 13. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano galaktozo v proizvodih, napolnjenih v steklo	96
Preglednica 14. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano arabinozo v proizvodih, napolnjenih v steklo	96
Preglednica 15. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano glukozo v proizvodih, napolnjenih v večslojni karton	96

Preglednica 16. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano galaktozo v proizvodih, napolnjenih v večslojni karton	97
Preglednica 17. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano arabinozo v produktih, napolnjenih v večslojni karton	97
Preglednica 18. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za cianidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo	97
Preglednica 19. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za peonidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo	98
Preglednica 20. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za petunidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo	98
Preglednica 21. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za delfinidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo	98
Preglednica 22. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za malvidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo	99
Preglednica 23. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za cianidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton	99
Preglednica 24. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za peonidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton	99
Preglednica 25. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za petunidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton	100
Preglednica 26. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za delfinidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton	100
Preglednica 27. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za malvidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton	100
Preglednica 28. Signifikantne razlike med nakloni degradacijskih krivulj glede na posamezen aglikon	101
Preglednica 29. Povzetek statističnih testov za posamezen aglikon (N/M/O/P)	102

Preglednica 30. Tabela statističnih razlik med nakloni degradacijskih krivulj glede na posamezen glikozidiran sladkor	103
Preglednica 31. Povzetek statističnih testov za posamezen glikozidiran sladkor (A/B/C/D)	103
Preglednica 32. Koncentracije seštevka antocianov v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	106
Preglednica 33. Koncentracija Del 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	106
Preglednica 34. Koncentracija Del 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	107
Preglednica 35. Koncentracija Cy 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	107
Preglednica 36. Koncentracija Del 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	108
Preglednica 37. Koncentracija Cy 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	108
Preglednica 38. Koncentracija Pet 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	109
Preglednica 39. Koncentracija Cy 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	109
Preglednica 40. Koncentracija Pet 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	110
Preglednica 41. Koncentracija Peo 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	110
Preglednica 42. Koncentracija Mal 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	111
Preglednica 43. Koncentracija Mal 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	111
Preglednica 44. Koncentracija Mal 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo	112
Preglednica 45. Normalizirane razlike med procentualnimi koncentracijami antocianov med datumi vzorčenja 22. 12. 2004 in 01. 09. 2005 z GLM statistično obdelavo	113
Preglednica 46. Antioksidativna učinkovitost merjena po DPPH metodi v borovničevem nektarju pri različnih vzorčenjih in z GLM statistično obdelavo	114
Preglednica 47. Meritve skupnih polifenolov v borovničevem nektarju pri različnih vzorčenjih in z GLM statistično obdelavo	115

Preglednica 48. Koncentracija posameznega karotenoida v odvisnosti od vrste embalaže, vzorčena 22. 02. 2005, v pomarančnem soku z GLM statistično analizo	116
Preglednica 49. Antioksidativna učinkovitost, merjena po DPPH metodi, v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo	117
Preglednica 50. Meritve skupnih polifenolov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo	118
Preglednica 51. Meritve askorbinske kisline v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo	119
Preglednica 52. Meritve HMF v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo	120
Preglednica 53. Meritve HMF v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnjem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo	121
Preglednica 54. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za HMF v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	121
Preglednica 55. Meritve fenolnih kislin v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo	122
Preglednica 56. Meritve fenolnih kislin v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnjem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo	123
Preglednica 57. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za p-kumarno kislino v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	123
Preglednica 58. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za ferulno kislino v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	124
Preglednica 59. Meritve flavonoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo	125
Preglednica 60. Meritve flavonoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnjem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo	126
Preglednica 61. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za eriocitrin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	127
Preglednica 62. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za narirutin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	127

Preglednica 63. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za hesperidin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	128
Preglednica 64. Meritve karotenoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo	129
Preglednica 65. Meritve karotenoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo	130
Preglednica 66. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za zeaksantin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	131
Preglednica 67. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za lutein v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	131
Preglednica 68. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za β -kriptoksantin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	131
Preglednica 69. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za β -karoten v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže	132

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Polimerizacija PET-a (Selke in sod., 2004)	9
Slika 2. Barvni spekter naravnih pigmentov, ki se uporabljajo kot dodatki živilom, in njihove E številke (Ashurst, 1997)	24
Slika 3. Strukturna formula askorbinske kisline (vitamina C) (Schröter in sod., 1993)	38
Slika 4. Strukturna formula α -tokoferola (vitamina E) (Schröter in sod., 1993)	39
Slika 5. Strukturna formula vitamina A (Rodriguez-Amaya, 2001)	40
Slika 6. Strukturne formule in trivialna imena acikličnih karotenov (Rodriguez-Amaya, 2001)	42
Slika 7. Strukturne formule in trivialna imena cikličnih karotenov (Rodriguez-Amaya, 2001)	43
Slika 8. Strukturne formule in trivialna imena karotenolov (hidroksikarotenoidov) (Rodriguez-Amaya, 2001)	44
Slika 9. Strukturne formule in trivialna imena epoksikarotenoidov (Rodriguez-Amaya, 2001)	45
Slika 10. Strukturne formule in trivialna imena nekaterih posebnih karotenoidov (Rodriguez-Amaya, 2001)	46
Slika 11. Osnovni flavonoidni skelet (Macheix, 1990)	47
Slika 12. Osnovni katehinski skelet (Macheix, 1990)	47
Slika 13. Strukturna formula flavonolov in tipični predstavniki skupine (Macheix, 1990)	47
Slika 14. Antocianidinski skelet in tipični predstavniki skupine (DeMan, 1999)	49
Slika 15. Strukturna formula p-hidroksibenzojske kisline (Tomás-Barberán in sod., 2000)	50
Slika 16. Strukturna formula galne kisline (Strack, 1997)	51
Slika 17. Strukturna formula elagične kisline (Strack, 1997)	51
Slika 18. Strukturna formula p-kumarne kisline (Macheix in sod., 1990)	51
Slika 19. Razdelitev nabora vzorcev po različnih tehnoloških postopkih procesiranja, polnjenja in pakiranja sokov in nektarjev	59
Slika 20. Shema zasnove testiranja dveh proizvodov, napolnjenih v dve različni embalaži	60
Slika 21. Shema nabora vzorcev za testiranje dveh proizvodov, napolnjenih v štiri različne embalaže po istem tehnološkem postopku	61
Slika 22a. HPLC-MS kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo in m/z vrednostmi	68

Slika 22b.	HPLC-MS kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo in m/z vrednostmi	69
Slika 23.	HPLC-Vis kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo za kvantitativno določanje antocianov	72
Slika 24.	HPLC-Vis kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic z identifikacijo za kvantitativno določanje antocianov	73
Slika 25.	HPLC-UV kromatogram fenolov in fenolnih kislin v pomarančnem soku	76
Slika 26.	HPLC-Vis kromatogram karotenoidov v pomarančnem soku po metodi s saponifikacijo	80
Slika 27.	HPLC-Vis kromatogram karotenoidov v pomarančnem soku po metodi brez saponifikacije	81
Slika 28.	EkspONENTI degradacijskih krivulj skupnih antocianov za nektar iz borovnic in aronije, napolnjen v stekleno embalažo in embalažo iz večslojnega kartona	92
Slika 29.	Graf ln koncentracij Cy 3-Glu v odvisnosti od časa	93

KAZALO PRILOG

	str.
Priloga 1. HPLC-MS kromatogram antocianinskih standardov	170
Priloga 2. Umeritvena krivulja za cianidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)	171
Priloga 3. Umeritvena krivulja za delphinidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)	171
Priloga 4. Umeritvena krivulja za petunidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)	172
Priloga 5. Umeritvena krivulja za peonidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)	172
Priloga 6. Umeritvena krivulja za malvidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)	173
Priloga 7. Spekter β -apo-karotenala	173
Priloga 8. Spekter β -karotena	174
Priloga 9. Spekter zeaksantina	174
Priloga 10. Spekter luteina	175
Priloga 11. Spekter β -kriptoksantina	175
Priloga 12. Normalizirane koncentracije posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v stekleno embalažo	176
Priloga 13. Normalizirane koncentracije posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v večslojni karton	176
Priloga 14. Primerjalni graf koeficientov razpada posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije	177
Priloga 15. Normalizirani deleži posameznih antocianov v borovničevem nektarju, napolnjenem v različno PET embalažo in vzorčenem na različne datume	177
Priloga 16. Tabele koncentracij saharoze, fruktoze in glukoze v odvisnosti od vrste embalaže in datuma skladiščenja v borovničevem nektarju	180
Priloga 17. Tabele koncentracij saharoze, fruktoze in glukoze v odvisnosti od vrste embalaže in datuma skladiščenja v pomarančnem soku	181
Priloga 18. Tabele parametrov CIE 1976 barvnega prostora (L, a, b, ΔE) in njihovo spreminjanje s skladiščenjem in vrsto embalaže za borovničev nektar	182
Priloga 19. Tabele parametrov CIE 1976 barvnega prostora (L, a, b, ΔE) in njihovo spreminjanje s skladiščenjem in vrsto embalaže za pomarančni sok	183
Priloga 20. Koncentracija kisika v pomarančnem soku v odvisnosti od časa skladiščenja in vrste embalaže	185
Priloga 21. Koncentracija kisika v borovničevem nektarju v odvisnosti od časa skladiščenja in vrste embalaže	185

- Priloga 22.** Graf normaliziranih sprememb koncentracij posameznih karotenoidov v odvisnosti od trajanja termostatiranja za pomarančni sok, napolnjen v steklo 186
- Priloga 23.** Graf normaliziranih sprememb koncentracij posameznih karotenoidov v odvisnosti od trajanja termostatiranja za pomarančni sok, napolnjen v embalažo iz večslojnega kartona 186

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
4CL	encim 4-kumarat: CoA ligaza
8-EPG	marker lipidne peroksidacije
8-OHdG	8-hidroksideoksi guanozin
AD	alzheimerjeva bolezen
AGE	končni proizvodi napredovane glikacije (Advanced Glycation End products)
AIDS	sindrom imunske pomanjkljivosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AMD	siva mrena in starostna očesna pegavost (Age related Macular Degeneration)
ANOVA	analiza variance
ANS	encim antocianidin sintaza
ATP	adenozin trifosfat
BHT	butilhidroksi toluen
C4H	encim cinamat 4-hidroksilaza
CD4+	vrsta T limfocitnih celic
CHI	encim kalkon flavonon izomeraza
CHS	encim kalkon sintaza
CIE	barvni prostor specificiran s strani Commission Internationale d'Eclairage
CIP	čiščenje v zaprtem sistemu (Clean In Place)
CoA	koencim A
Cy 3-Ara	cianidin 3-arabinozid
Cy 3-Gal,	cianidin 3-galaktozid
Cy 3-Glu	cianidin 3-glukozid
DCM	diklorometan
Del 3-Ara	delfinidin 3-arabinozid
Del 3-Gal	delfinidin 3-galaktozid
Del 3-Glu	delfinidin 3-glukozid
DFR	encim dihidroflavonol reduktaza
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
E	številke, ki osnačujejo vrsto prehranskega aditiva
EVOH	etilenvinil alkohol
ESI	ionizacija z elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
F3H	encim flavanon 3-hidroksilaza
GLM	multivariantna analiza variance (General Linear Models)
GSH	glutation
HDL	lipoproteini visoke gostote
HDPE	polietilen visoke gostote
HIV	virus imunske pomanjkljivosti (Human Immunodeficiency Virus)
HMF	5-hidroksimetil furfural

HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Thin Layer Chromatography)
IR	infrardeč (elektromagnetni spekter pri malovnih dolžinah med 750 nm in 1 mm)
kDa	kDalton enota za označevanje dolžine proteinov
L	lipidni radikal
LDPE	polietilen nizke gostote
LDL	lipoproteini nizke gostote
LLDPE	linearni polietilen nizke gostote
LSD	Fisherjev test za izračun signifikantnih razlik (Fisher's Least Significant Difference)
Mal 3-Ara	malvidin 3-arabinozid
Mal 3-Gal	malvidin 3-galaktozid
Mal 3-Glu	malvidin 3-glukozid
MAP	embalaža s spremenjeno atmosfero (Modified Atmosphere Packaging)
MO	mikroorganizem
MRT	mnogokratna primerjava med vzorci (Multiple Range Test)
MS	masna spektrometrija
NADH	nikotinamid adenine dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenine dinukleotid fosfat
OPA-6	orientirani poliamid 6 (PolyAmide6 – Poly(ϵ -caprolactame))
OPET	orientirani polietilen tereftalat
OPP	orientirani polipropilen
OPVOH	orientirani polivinil alkohol
P	konstanta prepustnosti plinov skozi embalažo
PA-6	poliamid 6 (PolyAmide6 – Poly(ϵ -caprolactame))
PC	polikarbonat
Peo 3-Ara	peonidin 3-arabinozid
Peo 3-Gal	peonidin 3-galaktozid
Peo 3-Glu	peonidin 3-glukozid
PET	polietilen tereftalat
Pet 3-Ara	petunidin 3-arabinozid
Pet 3-Gal	petunidin 3-galaktozid
Pet 3-Glu	petunidin 3-glukozid
PP	polipropilen
PPO	polifenol oksidaze
PVDC	polivinildien klorid

PVDF	polivinildien fluorid
PUFA	polinenaniščene maščobne kisline
RKS	reaktivne kisikove spojine
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (Thin Layer Chromatography)
TPA	tereftalna kislina
UDP	uracil difosfat
UFGT	encim UDP glukoza-flavonoid 3-o-glukozil transferaza
UHT	postopek pasterizacije pri povišani temperaturi (Ultra High Temperature)
UV	ultravioletni (elektromagnetni spekter pri valovnih dolžinah med 400 in 10 nm)
Vis	vidni del elektromagnetnega spektra (med 400 in 750 nm)
X	rentgenski žarki (elektromagnetno valovanje med 0,01 in 10 nm)

1 UVOD

Za reaktivne kisikove spojine (RKS) je znano, da so povezane z nastankom različnih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, nekatere oblike raka, siva mrena, nekatere nevrodegenerativne bolezni, imunološke bolezni ter AIDS. Najbolj pogoste so oksidativne poškodbe ključnih biomolekul, RKS lahko prizadenejo tudi genski zapis in imunski sistem.

K nevtralizaciji reaktivnih kisikovih spojin pripomorejo poleg antioksidantov, ki nastanejo v človeškem organizmu, tudi antioksidanti, ki jih dobimo s hrano (vitamini, tokoferoli, karotenoidi, flavonoidi, antociani ter drugi fenoli). Vitamin C (askorbinska kislina, dehidroaskorbinska kislina) je eden najmočnejših naravnih antioksidantov. Karotenoidi so naravna barvila in antioksidanti. Flavonoidi so široka skupina polifenolnih antioksidantov, ki jih najdemo v različnem sadju in zelenjavi, vinu in pivu. Antociane uvrščamo med flavonoide. Lahko imajo glikozidiran sladkor ali so v obliki proantocianidinov. Antioksidanti imajo pri rastlinah podobno vlogo kot pri ljudeh. Rastline sintetizirajo antociane za uravnavanje oksidativnega stresa in fiziološkega stresa. Tvorba prostih radikalov v rastlinah je največkrat pogojena s fotosintezo.

Vsebnost antioksidantov v proizvodu tekom skladiščenja je poleg začetne vsebnosti v sadju ali zelenjavi odvisna tudi od načina predelave ter vrste embalaže. Glavni tehnološki postopki v proizvodnji sokov in nektarjev so aseptično polnjenje v kartonasto embalažo, aseptično polnjenje v PET embalažo ter vroče polnjenje v stekleno embalažo.

Poleg tega, da imajo antioksidanti pozitivne lastnosti na človeški organizem, so v primeru antocianov in karotenoidov tudi naravna barvila. Tako njihovo dodajanje vpliva na ustreznejšo barvo in daje proizvodom dodatno vrednost funkcionalnih živil. Za obarvanje in funkcionalno vrednost so najbolj primerni pigmenti, ki jih proizvod že sam vsebuje. Ker pa so bolj ali manj vsi podvrženi hitremu razpadu, je smiselna uporaba tistih, ki najpočasneje razpadajo. Te je mogoče opredeliti s stabilnostno študijo naravnih pigmentov v proizvodih.

Vroče polnjenje je najstarejša in ena najbolj priljubljenih oblik polnjenja. Tehnološko je ena najenostavnejših in najbolj varnih oblik, saj je po pasterizaciji proizvod vroč napolnjen ter nato podvržen naknadni pasterizaciji, ki zagotovi tesnjenje in sterilnost.

Leta 1969 je bila kot alternativna tehnologija je bila leta 1969 je bila prvič predstavljena tehnologija kombinacije visokotemperaturnega procesiranja in aseptičnega polnjenja v večplastne folije. Tehnologija je zaživela s komercialno ponudbo podjetja Tetra Pak.

Embalaža je sestavljena iz večih slojev: polietilen/karton/polietilen/Al-folija/polietilen. Tak material zagotavlja dobro zaščito pred svetlobo ter vdorom kisika, ki je glavni vir oksidacije že pakiranih proizvodov. Sistem je bil poimenovan TBA (Tetra Brik Aseptic) in je začetnik aseptičnih proizvodov z dolgim rokom trajanja tako za mlekarsko industrijo kot tudi za industrijo sokov in pijač.

Poleg aseptične polnitve v kartonsko embalažo je možna tudi aseptična polnitev v PET embalažo. Polietilen tereftalat (PET) je polimerni material, ki se uporablja pretežno v embalažni industriji. Je preprost visokomolekularni polimer, kemično inerten in zaradi svojih fizikalnih lastnosti zelo primeren kot embalaža za živila. Ena glavnih pomanjkljivosti PET embalaže je prepustnost kisika skozi steno – in s tem povzročanje oksidacije živil –, po drugi strani pa tudi izgubljanje CO₂ pri karboniziranih pijačah. Parametri, ki vplivajo na prepustnost so: debelina stene, površina materiala, sama struktura materiala in temperatura napihovanja. Predlaganih je bilo več rešitev problema prepustnosti PET-a, najbolj učinkovita se zdi večplastna (multilayer) plastenka z aktivnimi ali pasivnimi pregradami. Poliamid, ki se najbolj pogosto uporablja za izdelavo barrier je mešanica različnih komponent, pri katerih amidni most vsebuje vsaj en aromatski obroč in nearomatsko skupino. Vsebnosti poliamida variirajo med 1 in 10 % v bariernem sloju, odvisno od stopnje zaščite pred oksidacijo, ki jo želimo. V plastenkah, ki imajo funkcijo aktivnega lovljenja kisika, vlogo katalizatorja prevzame kobaltova sol.

Dosedanje raziskave obsegajo karakterizacijo različnih vrst PET embalaže, vendar se posvečajo samo osnovnim parametrom, kot so koncentracija dispergirane kisika, barva in koncentracija askorbinske kisline. Ker pa na kakovost vplivajo tudi drugi parametri, kot so posamezni antocijani, karotenoidi, vitamini in vmesni produkti Mailardove reakcije, je potrebno preučiti tudi te. To je pomembno zato, ker imajo omenjene komponente pozitiven vpliv na človekovo zdravje.

Analitski del disertacije obsega identifikacijo in kvantifikacijo antocijanov, flavonoidov, fenolnih kislin, karotenoidov, vitamina C in HMF s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Uporabljene so bile detekcije UV, Vis in MS. Za opredelitev skupnih polifenolov in antioksidativne učinkovitosti so bile uporabljene spektrofotometrične metode. Za pomožne analize sladkorjev se je uporabilo tankoplastno kromatografijo, za karakterizacijo barve kromometrične metode, za sledenje koncentracije raztopljenega kisika pa kisikovo elektrodo.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

PET embalaža z dodanimi aktivnimi lovilci kisika prispeva k ohranjanju antocianov, polifenolov in antioksidativne učinkovitosti v borovničevem nektarju.

PET embalaža z dodanimi aktivnimi lovilci kisika prispeva k ohranjanju fenolov, antioksidantov, karotenoidov in C vitamina v pomarančnem soku.

Borovničev nektar v kartonski embalaži je podvržen manjši izgubi antocianov kot nektar v stekleni embalaži.

Vsebnost karotenoidov in fenolov se pri pomarančnem soku manj spremeni pri tehnologiji aseptičnega polnjenja kot pri tehnologiji vročega polnjenja.

Med staranjem proizvoda nudi steklena embalaža boljšo zaščito barvil in fenolov kot kartonska embalaža.

Različni antociani imajo različne hitrosti razpada, zato je potrebno za namen mešanja sokov ali funkcionalnih dodatkov določiti najprimernejšega.

Različni karotenoidi imajo različne hitrosti razpada, zato je potrebno za namen mešanja sokov ali funkcionalnih dodatkov določiti najprimernejšega.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TEHNOLOGIJE ASEPTIČNEGA TER VROČEGA POLNJENJA

2.1.1 Priprava pred polnjenjem

Pred sestavo nepasteriziranega polproizvoda se preveri kakovost izhodnih surovin. Zgoščeni sokovi so podvrženi mikrobiološki, kemijski in organoleptični kontroli. Iz preverjenih surovin se sestavi nepasteriziran polproizvod.

V primeru sestavljanja sokov se zgoščenemu soku doda vodo, ki mu je bila v postopku zgoščevanja odvzeta, ter askorbinsko kislino, ki zadržuje oksidacijo. Potencialno je mogoče tudi dodajanje arome, ki je bila sadju pri postopku koncentracije odvzeta, v kolikor ni ta že predhodno vrnjena v zgoščeni sok. Pri sestavljanju nektarjev je poleg vode dovoljeno še dodajanje citronske kisline, saharoze ali glukozno-fruktoznega sirupa.

Sestavljen nepasteriziran proizvod se uravna glede na fizikalno-kemijske parametre: topno suho snov ($^{\circ}\text{Brix}$) ter odstotek (%) skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina. Uravnan proizvod se ponovno organoleptično oceni. (Fredsted, 1995).

2.1.1.1 Filtracija

Bistre sokove se pred pasterizacijo filtrira. S tem dosežemo odstranitev večjih neraztopljenih delcev. Za filtracijo se lahko uporabljajo membranski, naplavni in ploščni filtri (Taylor, 2005).

2.1.1.2 Deaeracija, homogenizacija, pasterizacija in hlajenje

Po filtraciji sledi pasterizacija proizvoda, ki ga dodatno zaščiti pred mikrobiološkim kvarom. Med procesom pasterizacije se izvede še deaeracija, ki odstrani neželen kisik, ki povzroča oksidacijo. V primeru gostih in motnih proizvodov se izvede tudi homogenizacija, ki razbije večje delce na stabilno suspendirane delce. S tem se zmanjša hitrost usedanja neraztopljenih delcev.

Predgrelna sekcija pasterizatorja segreje proizvod na 65–70 $^{\circ}\text{C}$. Predgretju sledi deaeracija. Deaeracija poteka pri podtlaku od 0,35 do 0,45 bar za kašaste in motne sokove in nektarje ter od 0,60 do 0,70 bar za bistre sokove in nektarje ter za pomarančni nektar in sok.

Homogenizacija poteka pri tlaku od 180 do 200 bar za kašaste sokove in nektarje ter pri tlaku od 90 do 110 bar za motne sokove in nektarje (Hosahalli, 2005).

Osnovni parametri pasterizacije so odvisni od pH proizvoda, ki ga pasteriziramo. Če je pH manjši od 4,0, potem je temperatura pasterizacije med 93 in 97 °C. Proizvode, ki pa imajo pH večji od 4,0, je potrebno pasterizirati pri temperaturah med 95 do 99 °C. Zadrževalni čas na izbrani temperaturi je 30 sekund. Pasteriziran proizvod se pri aseptičnih tehnologijah ohladi na temperaturo med 15 °C in 20 °C. (Fredsted, 1995).

2.1.2 Aseptično polnjenje v kartonsko embalažo

Rezultat UHT pasterizacije je sterilni proizvod, za katerega moramo poskrbeti, da tak tudi ostane. Glavna razlika med aseptičnim in neaseptičnim polnjenjem je ta, da pri aseptičnem polnjenju po začetni pasterizaciji ne potrebujemo dopasterizacije napolnjenega proizvoda. Tako je proizvodu prihranjena dodatna toplotna obdelava in vse posledice, ki jih ta povzroči. Zato je potrebno, da imamo poleg samega sterilnega proizvoda sterilne tudi vse materiale, ki prihajajo v stik z živilom, in prostor, v katerem se polnjenje izvaja.

Najpogosteje se uporablja »Form-fill-seal« tehnologija, pri kateri se vse tri operacije izvedejo v zelo majhnem sterilnem prostoru in v zelo kratkih časovnih intervalih. Mogoče je tudi polnjenje v že prej pripravljene sterilizirane enote (Combi block tehnologija) (von Bockelmann B. in von Bockelmann I., 1998)

2.1.2.1 Sterilizacija embalaže

Najosnovnejša embalaža je kompozitna folija, na kateri je mogoče še pred sterilizacijo izrezati razne odprtine in navariti trakove, ki omogočajo dobro varjenje.

Najpogostejše sredstvo za sterilizacijo je peroksid H₂O₂ v koncentracijah 20–50 %. Obstaja več možnih vrst nanosa na embalažo:

- v obliki spreja,
- hlapov,
- nanos z valji,
- nanos v obliki potopnih kopeli.

Nanos v obliki spreja se največkrat uporablja pri sterilizaciji že formiranih embalažnih enot. S tem postopkom dosežemo log 6 zmanjšanje števila MO (mikroorganizmov). Za dobro sterilizacijo je potrebno, da je celotna površina v stiku z sterilizacijskim sredstvom.

Po sterilizaciji je potrebno sušenje s sterilnim zrakom.

Nanos v obliki hlapov se izvrši tako, da tekoč peroksid vbrizgamo v vroč sterilni zrak, hlapi se nato kondenzirajo na površini in sterilizirajo embalažo. Kondenzat je potrebno odstraniti z vročim suhim sterilnim zrakom.

Za ravno sterilizacijsko površino sta primerna naslednja dva sterilizacijska postopka: nanos z valji in metoda s potapljanjem. Pri nanosu z valji prenos sterilizacijskega sredstva izvede valj, ki je spodaj potopljen v tekočo raztopino. Da se ustvari potreben film na valju, je potrebno dodati sterilizacijskemu sredstvu sredstvo za omočitev. Za popolno sterilizacijo pa je potrebna še višja temperatura pri izdelavi cevi, ki tudi pomaga pri izhlapevanju odvečne tekočine.

Naslednja metoda je metoda s potapljanjem, ki je tudi pri tej tehnologiji najpogosteje v uporabi. Potrebna temperatura raztopine peroksida je 70 °C, zadrževalni čas pa 10 s. Za odstranitev odvečnega peroksida se uporabljajo zračni noži, ki vpihujejo suh sterilni zrak pred formiranjem v tubo (Nermark, 1999).

2.1.2.2 Sterilno polnjenje

Poleg embalaže in proizvoda potrebujemo za sterilno polnjenje sterilni prostor, katerega vzpostavimo in ohranjamo na različne načine: s sterilizacijo s paro ter s kombinacijo pare in kemičnih sredstev (Nermark, 1999).

2.1.2.3 Sterilizacija s paro

Za doseganje sterilnosti so potrebne temperature vročega zraka 330–360 °C. Prepreka vročega zraka ločuje sterilni prostor za polnjenje in ostale nesterilne dele (Nermark, 1999).

2.1.2.4 Sterilizacija s kombinacijo toplote in kemičnih sredstev

Najpogosteje uporabljena kemikalija je peroksid, ki ga nanese na dele, ki jih želimo sterilizirati s pomočjo spreja ali pare.

2.1.2.5 Vzdrževanje sterilnosti

Za vzdrževanje sterilnosti prostora za polnjenje se uporablja nadpritisk sterilnega hladnega zraka v laminarnem toku. Sterilnost zraka dosežemo s filtracijo ali s segrevanjem nad 330 °C ter hlajenjem (Nermark, 1999).

2.1.2.6 Sterilnost napolnjenega proizvoda

Ko so izpolnjene vse zahteve za primarno sterilnost proizvoda, je potrebno paziti še na sekundarno sterilnost proizvoda, ki je odvisna od različnih faktorjev, kot so:

- pravilni in trdni vari,
- nepoškodovana embalaža,
- funkcionalno transportno pakiranje,
- pravilno hranjenje embalažnih materialov (Nermark, 1999).

2.1.2.7 Uporaba vodikovega peroksida za sterilizacijo

V sistemih, ki uporabljajo Tetrapakovo tehnologijo, v zadnjem času pa tudi v drugih sistemih, se uporablja kot sterilizacijsko sredstvo za sterilizacijo embalaže vodikov peroksid. Drugi sterilizant, ki se v uporablja v pretežni meri na linijah za aseptično polnjenje proizvodov v plastenko, pa je peroksi očetna kislina. (mešanica peroksida in očetne kisline v določenem razmerju). Dober sterilizant je:

- enostaven za nanos,
- del »in line« sterilizacije,
- brez ostanka po končani sterilizaciji,
- sposoben uničiti vse MO vključno z trdoživimi endosporami nekaterih bakterij,
- poceni,
- zdravju neškodljiv,
- nekoroziven,
- lahko dostopen (Watkinson, 2008).

2.1.2.8 Ostanek vodikovega peroksida

Za sterilizacijo embalaže z vodikovim peroksidom so tipične koncentracije 15–30 %. Kljub temu, da vodikov peroksid razpada na vodo in kisik, pa je njegov čas razgradnje odvisen od koncentracije, ki ostane po sterilizaciji.

2.1.2.9 Embalažni materiali

Za aseptično polnjenje je mogoče uporabljati različne materiale. Najpogosteje se zadnje čase uporabljajo plastenke in večslojni kartoni ter večslojni kartoni z dodatki raznih polietilenskih delov. Pri tehnologiji aseptičnega polnjenja je možno uporabljati tudi pločevinke in steklenice.

Gledano od zunaj proti produktu so večslojni kartoni sestavljeni iz:

- polietilena,
- kartona,
- polietilena,
- aluminija,

- polietilena,
- polietilena.

Zunanja plast polietilena ima funkcijo varovanja proizvoda pred zunanjimi vplivi in vlago, ki bi lahko škodovala kartonu. Karton nudi izdelku fizično stabilnost in želeno trdoto. Naslednja plast polietilena je namenjena temu, da povezuje karton z aluminijevo folijo in preprečuje razslojevanje. Al folija je ena najboljših barier proti prepustnosti kisika, vplivom svetlobe na proizvod ter prepustnosti arom iz proizvoda. Naslednja plast polietilena je spet namenjena vezavi plasti Al folije ter notranjega polietilena, ki je kemično prirejena temu, da ima čim boljše možnosti za varjenje. (Nermark, 1999).

2.1.2.9.1 Permeacija

Permeacija opisuje prehajanje snovi skozi embalažo iz zunanosti v proizvod ali obratno. Najpogostejši pojav je prehajanje plinov skozi embalažo. Pri tej vrsti embalaže (kartonska embalaža) so šibka točka vari, ki niso zaščiteni z aluminijem in so sestavljeni samo iz plastičnih materialov, ki pa so prepustni za pline, med katerimi je za proizvod najnevarnejši kisik. Za prehajanje kisika je pomembna tudi temperatura hranjenja, ki pa po drugi strani še sama vpliva na staranje proizvoda, tudi brez prisotnosti kisika (Siegmond in sod., 2004).

2.1.3 Aseptično polnjenje v PET embalažo

2.1.3.1 Polietilen tereftalat (PET)

Polietilen tereftalat (PET) je polimerni material, ki se uporablja pretežno v embalažni industriji. Je preprost visokomolekularni polimer, kemično inerten in zaradi svojih fizikalnih lastnosti zelo primeren za embalažo za živila.

PET je proizveden iz tereftalne kisline (TPA) in iz etilenglikola. Oba navedena intermedijata pridobivamo iz naftnih derivatov.

V svoji najčistejši obliki je amorfen in zato precej podoben steklu. Pod vplivom različnih dodatkov ter različnih pogojev predelave lahko dobi tudi kristalinično obliko.

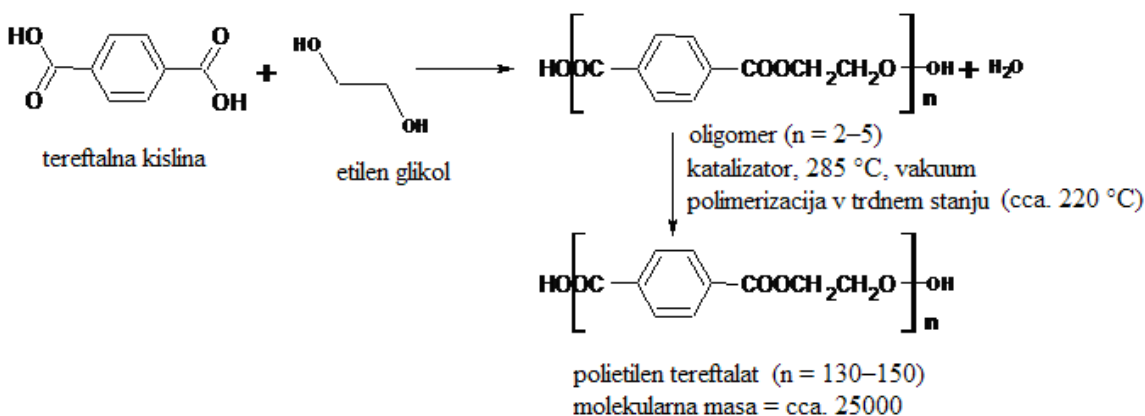
Razvit je bil za namene tekstilne industrije in poliestrskih vlaken, za izboljšanje lastnosti tekstila. V petdesetih letih so razvili prvi film za video, filmske in rentgenske aplikacije. Šele nato so razvili postopke, ki so omogočali uporabo PET-a v embalažne namene ter kot ekstrudirane predmete (Brody in Marsh, 1997).

2.1.3.1.1 Proizvodnja polietilen tereftalata

Poliestri so narejeni v kondenzaciji bifunkcionalnega alkohola in kisline, kjer se v ključnem koraku, ob prisotnosti kovinskega katalizatorja, odcepi voda. Nato sledi polimerizacija v trdnem stanju.

Ko oba intermedijata skupaj segrevamo, nastane najprej bishidroksietil tereftalat skupaj z nizkomolekularnimi oligomeri. V naslednji fazi sledi vakuumsko izparevanje vode in nato polimerizacija v trdnem stanju do visoko molekularnega PET-a. Ta faza je zelo pomembna, ker z učinkovitostjo te faze in s čistostjo samih surovin dosežemo čistost PET-a, ki je zelo pomembna pri embalaži za živila.

Katalizator antimonov trioksid se uporablja v zelo nizki koncentraciji za pospeševanje polimerizacije PET-a. Za to bi se lahko uporabljale še titanove, germanijeve, kobaltove, manganove in magnezijeve soli, vendar majhne količine le-teh ostanejo v polimerni verigi (Selke in sod., 2004).



Slika 1. Polimerizacija PET-a (Selke in sod., 2004)

Figure 1. PET polymerization (Selke in sod., 2004)

2.1.3.1.2 Mehanske lastnosti

PET je zelo priljubljen prav zaradi svojih mehanskih lastnosti. Je semikristaliničen in pri 72 °C spremeni zgradbo v gumijasto elastično stanje, ki omogoča preprosto oblikovanje, saj se verige poravnajo primerno modelu. Po dosegu primerne oblike se material hitro ohladi in verige se zamrznejo v želeno stanje. Če material ohlajamo počasi, spet dosežemo steklu podobno kristalinično stanje. V tej obliki je manj občutljiv na visoke temperature in ga lahko uporabljamo kot kuhinjsko posodo za peko.

Možni so še drugi postopki za spreminjanje mehanske strukture PET-a. Med drugim tudi dodajanje majhnih množin izoftalne kisline, ki zmanjša kristaliničnost materiala in s tem omogoča debelejša, nezlomljive stene embalažnih materialov (ILSI, 2000).

2.1.3.1.3 Aplikacije PET-a v pakiranju

Zaradi primerne zgradbe materiala in kemijskih lastnosti niso potrebni dodatni aditivi, kot so antioksidanti, plastifikatorji, toplotni ali UV-stabilizatorji, zato je tak način pakiranja primeren za aplikacije v živilski industriji. Tudi pigmenti barvil, ki se uporabljajo v nekaterih aplikacijah, se tesno vgradijo v sam material in je zato njihov prehod v samo živilo zanemarljiv.

Najbolj razširjene uporabe PET-a v živilstvu so: posode za hranjenje živil (plastenke, kozarci, tube), nosilci za termično obdelavo (pladnji, ...) in razne folije za ovijanje živil, ki so primerne tudi za pripravo hrane, ne da bi jo bilo potrebno vzeti iz vrečke (Selke in sod., 2004).

Za plastenke in kozarce se največkrat uporablja postopek napihovanja, pri katerem je vitalnega pomena temperatura napihovanja, od katere so odvisne nadaljnje lastnosti materiala. Od te temperature so odvisni: odpornost, prepustnost, trdnost, bariere za kisik in proti izgubi ogljikovega dioksida (Ros-Chumillas in sod., 2007).

Najbolj uveljavljen postopek za izdelavo pladnjev je postopek ekstrudiranja, ki je okarakteriziran s profilom ohlajanja in stiskanja, ki izdelku tudi določata končne lastnosti.

Najzahtevnejši postopek je postopek izdelave tankih filmov, ki se izplača zaradi izrednih fizikalnih lastnosti folije, ki obdrži svoje lastnosti med 70 in 150 °C. Zaradi teh lastnosti, ki omogočajo sterilizacijo, se to folijo v uporablja za različne namene v farmaciji, zdravstvu in živilstvu (Kirwan in Strawbridge, 2003).

Z uporabo koinjiciranja, koekstrudiranja in nanašanja prevlek lahko sam PET nadgradimo še z nekaterimi polimernimi materiali, ki proizvode še bolje zavarujejo proti vlagi in oksidaciji.

2.1.3.1.4 Prepustnost kisika in ogljikovega dioksida

Ena glavnih pomanjkljivosti PET embalaže je prepustnost kisika skozi stene in s tem povzročanje oksidacije živil, po drugi strani pa tudi izgubljanje CO₂ pri karboniziranih pijačah (Hernandez, 1997).

Parametri, ki vplivajo na prepustnost, so debelina stene, površina materiala, sama struktura materiala in temperatura napihovanja.

Predlaganih je bilo več rešitev problema prepustnosti kisika in CO₂. Med njimi se zdi najbolj učinkovita večplastna (multilayer) embalaža z aktivnimi ali pasivnimi pregradami (Selke in sod., 2004).

2.1.3.2 Karakteristični procesi na aseptični polnilni liniji za polnjenje v PET embalažo

Aseptična linija za polnjenje v PET embalažo obsega več vhodov različnih materialov. V tem delu bo predstavljena ta linija brez procesiranja, saj je bilo predstavljeno že v prejšnjih delih in je enako pri vseh aseptičnih linijah.

Deli aseptične linije:

- napihovanje,
- zračni transport,
- nanos bariernih materialov,
- sterilizacija materialov,
- polnjenje,
- zapiranje,
- ovijanje,
- paletizacija (Gunning, 1999).

2.1.3.2.1 Napihovanje

Napihovanje je začetni proces in je namenjen formiranju platenke, ki se običajno transportira v obliki epruvet, ki zavzemajo bistveno manjši prostor pri transportu, ter so tako lahko enake za različne polnilnice, saj da končno obliko platenki šele napihovanje.

Epruvete se razlikujejo glede na obliko grla, težo in dimenzije. Ker je linija običajno prirejena za zračni transport platenk s kontaktom na vratu, je na vsaki liniji predvidoma mogoče uporabljati samo eno vrsto vratu epruvete.

Epruvete se transportirajo v oktabinih in potujejo preko zalogovnika in elevatorja na razvrščanje ter nato v pihalko. V pihalki se izvede več različnih procesov: predgretje, gretje ter napihovanje.

Predgretje in gretje sta namenjena zmečanju kristalinične strukture PET-a in sta prirejena debelini sten in dimenzijam epruvete. Izvedeno sta z IR žarnicami, ki se jim lahko nastavlja jakost. Napihovanje se izvede v kalupih s pomočjo stisnjene zraka. Tu se formira končna

oblika plastenke po izdelanem kalupu. Možna sta krožno napihovanje ali linearno napihovanje (Selke in sod., 2004). Iz pihalke potujejo plastenke na zračni transport, ki nadomešča tekoče trakove, saj bi bile prazne plastenke na tekočih trakovih preveč nestabilne. Plastenke potujejo pod pritiskom stisnjenega zraka. (Gunning, 1999).

2.1.3.2.2 Nanašanje barrier

Trend polnjenja proizvodov v plastenke sledi potrebam in zanimanju kupcev. Ker je PET delno prepusten za določene proizvode, kot so sokovi ali pivo, se uveljavljajo določene tehnološke izboljšave in inovacije ter tudi različni kompozitni ali nekompozitni materiali, ki ne bi prepuščali plinov v tolikšni meri kot PET (Selke in sod., 2004).

Ena izmed delnih tehnoloških rešitev, ki izboljšajo lastnosti PET-a je nanos določenih materialov, kot so amorfni ogljik ali silicijevi oksidi, na notranjo stran plastenke.

Stopnje procesa:

- plastenka je vstavljena v kalup, ki zdrži nizke pritiske,
- v kalupu se znotraj in zunaj plastenke ustvari vakuum,
- v plastenko se injicira acetilen,
- mikrovalovanje povzroči, da se iz vnesenega acetilena ustvari oblak plazme,
- iz elektrode se na notranjo stran plastenke nanese amorfni ogljik,
- v kalupu se ponovno vzpostavi atmosferski tlak,
- plastenka zapusti kalup.

Postopek se največkrat uporablja pri polnjenju piva, ki je občutljivo tako na vstop kisika kot tudi na izgubljanje ogljikovega dioksida. Možne pa so tudi aplikacije za druge proizvode. Kljub temu, da bariera izboljša lastnosti, pa sama ni dovolj za preprečevanje oksidacije in se običajno uporablja s tehnologijo večplastnih plastenk, ki predstavljajo večji delež bariere. (Hernandez, 1997).

2.1.3.2.3 Čiščenje

Čiščenje plastenk in pokrovčkov se izvaja večinoma s peroksi očetno kislino, ki pa se ji v zadnjem času pridružuje čiščenje z vodikovim peroksidom v plinastem stanju.

Čiščenje poteka po programu:

- izpiranje z vročo vodo,
- čiščenje s peroksi očetno kislino,
- izpiranje s sterilno vodo,
- izpihovanje in sušenje.

Kritična točka tega procesa je koncentracija peroksi očetne kisline, ki mora zagotavljati ustrezno sterilizacijo materiala, po drugi strani pa lahko povzroča priokuse proizvodu, saj razpada na očetno kislino, kisik in vodo (Gunning, 1999).

2.1.3.2.4 Polnjenje

Polnjenje poteka tako, da se proizvod pretoči v nivojski bazenček, ki je na vrhu polnilca, nato pa se proizvod pod vplivom gravitacije izteka skozi polnilne glave, ki mu zagotavljajo določen volumen. Polnilne glave se razlikujejo glede na tehnologijo kontrole in glede preprečevanja raznih defektov polnjenja, kot je penjenje.

Polnjenje poteka v aseptičnem procesu v čisti beli sobi, prirejeni za vzdrževanje stanja brez prisotnosti MO. Bela soba je prirejena laminarnemu toku sterilnega zraka, poleg tega pa zahteva še redno in natančno čiščenje ter obvezno čiščenje po vsakem posegu vanjo. Zahteva tudi posebne sterilne obleke za operaterje ter poseben pravilnik rokovanja, saj po začetni sterilizaciji ni nobene varnostne zaslonke, ki bi preprečevala okužbo (Gunning, 1999).

2.1.3.2.5 Zapiranje

Zapiranje poteka na zapiralnih glavah, ki večinoma v novejših izvedbah delujejo po tehnologiji »Pick and place«. Pokrovčke poberejo iz nosilnega kanala ter jih zavrtijo čez navoje napolnjene platenke s točno določenim momentom zapiranja, ki je prirejen embalaži ter zelenemu momentu odpiranja.

Pred samim zapiranjem pokrovčki potujejo iz zalogovnika preko elevatorja v sterilizacijski kanal ali komoro, kjer jih sterilizirajo.

Sterilizacija pokrovčkov je eden izmed najobčutljivejših delov sterilizacije, saj pokrovček zaradi svoje funkcije tesnjenja ne more biti sestavljen samo iz ravnih pralnih površin, pač pa ima zaradi tesnilnih jezičkov in navojev razgibano površino, na kateri zaradi težkega dostopa sterilizacijskega sredstva MO povzročijo vir okužbe (Gunning, 1999).

2.1.3.2.6 Pakirni postopki

Zapiranju sledijo printanje datuma, etiketiranje, transportno pakiranje ter paletizacija. Printanje datuma uporabe je zakonsko predpisano z namenom zagotavljanja sledljivosti. Printer na liniji je običajno povezan na polnilni stroj in omogoča printanje številke polnilne glave ali drugih parametrov polnjenja (Gunning, 1999).

2.1.3.2.7 Etiketiranje

Poznamo več različnih vrst etiketiranja, ki se razlikujejo glede na vrsto materiala (papir, polimerni materiali, razne kombinacije) in uporabo lepila (točkovno lepljenje, celoten nanos, brez lepila – »shrink sleeve« ali »thermo shrink sleeve«).

Etiketa je najpomembnejši del označevanja, ki je predpisano po zakonodaji, hkrati pa predstavlja dizajnerski izziv in tako proizvod personalizira ter ga približa kupcu (Gunning, 1999).

2.1.3.2.8 Transportna embalaža

Etiketiranju običajno sledita razvrščanje in formiranje transportne embalaže, ki je pri tem tipu proizvoda iz termokrčljive folije ali le-te v kombinaciji s kartonsko podložko.

Po tem, ko se paket formira in ovije s folijo, sledi gretje v grelnem tunelu, ki skrči folijo na obliko pakiranih plasten.

Paketi nato potujejo na paletizacijo, kjer se ovijejo s samoskrčljivo folijo, ki zagotavlja trdnost in povezanost s paleto med transportom in skladiščenjem (Gunning, 1999).

2.1.4 Tehnologija vročega polnjenja v steklo

Tehnologija vročega polnjenja je tradicionalno vezana na stekleno embalažo zaprto s kovinskimi pokrovčki, ki imajo ustrezno tesnilno maso, ki zagotavlja sterilnost napolnjenega proizvoda (Twist off; Crown cork pokrovčki).

Vroč proizvod se po pasterizaciji zapre ter na dopasterizacijski sekciji dopasterizira in ohladi. Pri tem se v prostoru nad nivojem proizvoda ustvari podtlak, ki zatesni pokrovček na steklenico, pri tem pa tudi zagotavlja sterilnost proizvoda; saj dokler v steklenici obstaja podtlak pomeni, da še ni prišlo do vdora zraka vanjo in s tem mikroorganizmov, ki so značilni za sekundarne okužbe.

V zadnjem času se pojavljajo tudi tehnologije vročega polnjenja, ki bazirajo na PET plastenkah s kristaliničnim grlom ter posebej prirejenim HDPE pokrovčkom s tesnilno maso (Girling, 1999).

2.1.4.1 Depaletizacija in izpiranje

Tehnološki proces se začne z depaletizacijo in izpiranjem steklenic, ki poteka z vodo s temperaturo 50 °C za zunanji del steklenice in vodo s temperaturo 80 ± 5 °C za notranji del steklenice. Izpiranje sledi izpihovanje z zrakom (Girling, 1999).

2.1.4.2 Kontrola steklenic

Zaradi nevarnosti prisotnosti steklenih okruškov ali različnih nepravilnosti v steklenicah, ki bi botrovale nepravilnemu zapiranju, je potrebna tudi kontrola steklenic pred polnjenjem. Avtomatska kontrola temelji na primerjalnem avtomatskem slikanju različnih predelov steklenice (telo, dno, grlo). Posnetki se nato primerjajo z internimi standardi steklenic. Neustrezne steklenice se pred polnjenjem izločajo (Girling, 1999).

2.1.4.3 Polnjenje iz zapiranje

Če se steklenice preveč ohladijo, se pred polnjenjem dogrejejo na ustrezno temperaturo. Temperatura polnjenega proizvoda je med 80 in 85 °C. Polnjenje največkrat poteka na volumetričnih polnilcih, mogoči pa so tudi polnilci z drugimi principi regulacije volumna proizvoda (gravimetrijski polnilci). Polnjenju sledi zapiranje z navojnimi (Twist off) pokrovčki, ki so predhodno sterilizirani s paro. Zapiranju sledi avtomatska kontrola vakuuma v proizvodih, ki izloči vse nezaprte proizvode (Girling, 1999).

2.1.4.4 Dogrevanje in hlajenje

Ključna razlika med aseptično tehnologijo in tehnologijo vročega polnjenja je sekcijski grelni tunel z optimiziranim zadrževalnim časom, ki zagotavlja, da proizvodi ohranijo temperaturo med 80 in 90 °C za čas, potreben za mikrobiološko neoporečnost proizvoda. Grelnemu predelu tunela sledi hladilni del, ki zagotavlja konstantno temperaturo izhoda, ki je max. 35 °C. Hlajenju sledi sušenje z vročim zrakom (Girling, 1999).

2.1.4.5 Etiketiranje in datiranje

V naslednjem koraku se suhe napolnjene steklenice etiketira s papirnatimi etiketami, ki se jih datira z namenom označitve roka trajanja in sledljivosti proizvoda. Datiranje je mogoče tudi na ostale predele (na pokrovček). Etiketiranju sledi kontrola vakuuma ter prisotnosti pokrovčka in etikete (Girling, 1999).

2.1.4.6 Transportno pakiranje

Najsplošneje transportno pakiranje je pakiranje v kartone ali pa v kartonsko podložko ovito s termokrčljivo LDPE folijo. Paketi se označijo s transportnimi podatki in podatki potrebnimi za sledljivost proizvoda (Girling, 1999).

2.1.4.7 Paletizacija in skladiščenje

Transportne enote se na paletizerju zložijo na transportno paleto. Zatem se ovijejo s samoskrčljivo LLDPE folijo, ki zagotavlja stabilnost pri transportu in zaščito pred prahom.

2.1.5 Čiščenje

Ker sta sterilizacija mogoča samo na čistih površinah, je čiščenje in vzdrževanje čistoče samega sterilnega prostora ena poglavitnih nalog na aseptičnih linijah, ki že po definiciji pomenijo čist sterilni prostor (Walton, 2008).

Čiščenje poteka v treh korakih:

- začetno izpiranje,
- čiščenje,
- končno izpiranje.

2.1.5.1 Začetno izpiranje

Namen začetnega izpiranja je vodno odstranjevanje adsorbiranih delcev, da se le-ti ne bi zasušili. Opravljeno mora biti takoj po koncu proizvodnje, sestavljata pa ga šaržno pranje posod in cistern ter kontinuirano izpiranje cevi in ventilov. Zadrževalni čas mora biti prirejen proizvodu, ki se polni, da se odstranijo delci, ki se lahko zasušijo (Walton, 2008).

2.1.5.2 Čiščenje

Namenjeno je odstranjevanju ostankov, ki se ne morejo odstraniti z vodo pri izpiranju. Pri tej stopnji se uporablja čistila, kemijsko čiščenje (emulgacija, hidroliza, saponifikacija, disperzija, ...). Uporablja se baze, kisline in ostale detergente za čiščenje. Ker se med tem procesom izvajajo kemijske reakcije, je posebno pomembna temperatura čiščenja (Walton, 2008).

2.1.5.3 Končno izpiranje

Cilj končnega izpiranja je odstranitev sledov čiščenja s kislinami, bazami ali detergenti. Poseben poudarek je tu namenjen čistoči izpiralne vode, ki lahko vpliva na korozijo in mikrobiološke vidike (Walton, 2008).

2.1.5.4 Ročno čiščenje

Ročno čiščenje se uporablja za čiščenje površin, ki niso povezane na centralni čistilni sistem in niso tako občutljive za mikrobiološko kontaminacijo. Tu se lahko uporabljajo samo kemikalije, ki sicer niso tako učinkovite, so pa neškodljive človeku, ki jih uporablja.

2.1.5.5 CIP (Cleaning in place)

CIP je način avtomatskega čiščenja, pri katerem čistilne komponente (voda, kisline, baze, ...) krožijo po sistemu pasterizacije in polnilca. Mehanični efekt čiščenja je dosežen s turbulentnim tokom. Uspešnost čiščenja se karakterizira z uspešnostjo in ponovljivostjo čiščenja, ki se preverja z jemanjem brisov (Walton, 2008).

Kontrola obsega pet parametrov:

- vrsto kemikalije,
- koncentracijo kemikalije,
- pretok,
- kontaktni čas med kemikalijo in površino,
- temperaturo med kontaktom.

2.1.5.6 Vrsta kemikalije

Uporabljajo se večinoma preproste kemikalije, kot so natrijev hidroksid in dušikova ter fosforna kislina (Watkinson, 2008).

2.1.5.7 Koncentracija

Koncentracija je odvisna od vrste umazanije, ki jo želimo odstraniti. Segrevane površine zahtevajo višjo koncentracijo kemikalije kot hladne površine. Koncentracija natrijevega hidroksida se giblje med 1,5 in 2 %, koncentracija kisline pa med 1,0 in 1,6 %. Kontrola koncentracije se večinoma izvaja z merjenjem kondukcije.

Čas se giblje med petimi in desetimi minutami. (Watkinson, 2008).

2.1.5.8 Kontakt med čistilom in površino

Za primerno dezinfekcijo se uporablja turbulentni tok, ki ga dosežemo s približno hitrostjo 1,5 m/s. Posebno pozornost je potrebno nameniti mrtvim kotom v cevovodih. Za čiščenje aseptičnih posod in cistern je potrebno čiščenje celotne površine s pretokom 200–250 lm^2/uro . Potrebna je aplikacija čistilnih šob na vsaka dva metra in te morajo biti redno kontrolirane (Watkinson, 2008).

2.1.5.9 Kontaktni čas

Čas kroženja čistila je določen z učinkovitim kontaktnim časom in časom potrebnim za en krog kroženja čistila – to je časom kroženja. Za alkalni del čiščenja je običajno dovolj učinkoviti kontaktni čas 10 min, za začetno in končno izpiranje pa je dovolj učinkoviti kontaktni čas med petimi in desetimi minutami (Watkinson, 2008).

2.1.5.10 Temperatura

Temperatura začetnega izpiranja je nad točko taljenja za maščobe (50 °C) in pod točko denaturacije proteinov (70–80 °C).

Temperatura alkalnega čiščenja je izredno pomembna, saj se hitrost reakcije potroji z dvigovanjem temperature za 10 °C. Zato je pomembno, da se alkalno čiščenje izvaja pri čim višji temperaturi. Kljub temu, da je pri višji temperaturi tudi večja korozija cevovodov in ostalih kovinskih delov, se običajno uporabljajo temperature višje od 100 °C. Pri kislinskem čiščenju se uporabljajo nižje temperature, saj kislina še poveča korozijo in uničevanje gumijastih delov; temperatura je običajno 60–70 °C in ne presega 90 °C (Watkinson, 2008).

2.1.6 Preprečevanje oksidacijskih procesov v živilih

2.1.6.1 Uvod

V tehniki pakiranja so za preprečevanje oksidacijskih procesov v živilih znani postopki, ki preprečujejo dostop kisika do pakiranih živil. Take pogoje se lahko doseže z izbiro nepropustnih pakirnih materialov (steklo, kovina), lahko se dodatno spreminja atmosfera v embalaži s t. i. pakiranjem v modificirani atmosferi ali vakuumu. Najnovejši so postopki, ki so v svetu znani kot aktivno pakiranje (active packaging). To so tehnike pakiranja, pri katerih se s pomočjo aditivov v embalaži ali v pakirnih materialih doseže posebne učinke: adsorbcijo ali desorbcijo kisika, etilena, vode, ogljikovega dioksida, arom ali vonjav (Hernandez, 1997; Giles, 2005).

Živila so zaradi svoje sestave bolj ali manj občutljiva na oksidativne spremembe, ki so največkrat povezane s prisotnostjo kisika. Kisik vstopa v živilih v reakcije s snovmi, med katerimi so posebno občutljive nenasičene maščobne kisline, vitamini A, C in E, določene aminokisline (arginin, histidin, metionin, lizin), kot tudi barvila in aromatične snovi, posebno eterična olja. Razni ioni težkih kovin in kompleksi s kovinami (klorofil, hemin) te reakcije še pospešujejo (Ayton, 1999).

Pomembna parametra sta količina kisika v embalaži, ki lahko vpliva na oksidacijske spremembe živila, in hitrost oksidacijske reakcije, za katero je pomemben parcialni tlak kisika v embalaži pri opazovani temperaturi. Če količina kisika, ki je zaprta skupaj z živilom, ne zadošča za opazne spremembe kakovosti živila, je tudi sama hitrost reakcije nepomembna in obratno: če je v embalaži večja količina kisika, je hitrost oksidativnih sprememb še kako pomembna (Ayton, 1999).

O občutljivosti živil, ki že ob zelo majhnih količinah prisotnega kisika spremenijo senzorične lastnosti, obstaja malo zanesljivih podatkov. Iz prakse so znane nekatere maksimalne količine O₂, ki povzročijo nesprejemljive senzorične spremembe na določenih živilih in so prikazane v preglednici 1 (Plestenjak in Požrl, 2000).

Preglednica 1. Količina kisika, ki povzroča nesprejemljive senzorične spremembe pakiranih živil (Plestenjak in Požrl, 2000)

Table 1. Oxygen concentrations which cause unacceptable changes in packed foods (Plestenjak in Požrl, 2000)

Živilo	Količina O ₂ / živilo [mg/kg]
pražena kava	110
jedilno olje	50–100
jajca v prahu	35
sadni sokovi	10
orehi	1,5–5
zmrznjeno sadje	1,5–5
sterilno mleko	0,8–1
zmrznjeno meso, ribe, zelenjava	0,5–1
pivo	0,4–1
vino	3

Razen sprememb senzoričnih lastnosti, ki nastanejo pod vplivom oksidativnih sprememb na živilih, so pomembne tudi oksidativne spremembe, ki niso vezane na spremembe vonja,

okusa ali barve. Sem prištevajo predvsem spremembe nekaterih vitaminov in občutljivih aminokislin, ki prav tako zahtevajo poseben način pakiranja (Hernandez, 1997).

Pri pakiranju živil, ki jih je potrebno zaščititi pred oksidativnimi procesi v embalaži, je pomembno tudi poznavanje tistih količin kisika, ki so vezane na živilu pred pakiranjem. To je kisik, ki je lahko v živilu raztopljen ali adsorbiran na površini živila. Te količine so lahko take, da povzročijo negativne oksidacijske spremembe živila, zato se taka živila pred pakiranjem deoksigenirajo v vakuumu (mleko in jajca v prahu, sokovi iz citrusov, zamrznjeno meso in ribe) (Kirwan in Strawbridge, 2003).

2.1.6.2 Embalažni materiali

Za zaščito živil pred oksidacijo so že dolgo znane tehnike pakiranja v pločevinkah in stekleni embalaži, ki zaradi nekaterih svojih dobrih lastnosti (nepropustnost, trdnost) še vedno predstavljajo dober del pakiranja živil. Vendar se v zadnjih dvajsetih letih razvijajo tehnike, ki izkoriščajo kot barierni in zaščitni material med živilom in okolico plastične mase. Na trgu je cela vrsta plastičnih mas za pakiranje živilskih izdelkov. Med seboj se razen po sestavi razlikujejo predvsem po prepustnosti za pline in po reoloških lastnostih pri določenih temperaturah. Uporaba plastičnih mas omogoča zmanjšanje stroškov pakiranja, praktičnost rokovanja z embalažo in visoko avtomatizacijo pakirnih procesov (Conard in sod., 2005).

Preglednica 2. Konstanta prepustnosti (p) različnih plastičnih mas za kisik, dušik, CO₂ in vodne pare (Plestenjak in Požrl, 2000)

Table 2. Permeability constants (p) for different polymer materials measured for oxygen, nitrogen, CO₂ and water vapor (Plestenjak in Požrl, 2000)

Plastična masa	p(N ₂) [enota pod tabelo]	p(O ₂) [enota pod tabelo]	p(CO ₂) [enota pod tabelo]	p(H ₂ O) [enota pod tabelo]
LDPE	70000	200000	1000000	100
HDPE	20000	75000	300000	40
PC	11000	67000	430000	1500
PP	16000	75000	250000	70
OPP	9000	36000	130000	25
OPET	-	1800	-	550
PA-6	250	900	5000	900
OPA-6	90	450	2400	600
PVDC (lak)	6	20	100	8
PVDC (koekstrudiran)	10	4	-	-
EVOH	<1	4	-	-
OPVOH	<1	<1	1,5	150

$$p \left[\frac{\text{cm}^3 \mu\text{m}}{\text{m}^2 \text{ danbar}} \right] \quad \dots \text{Konstanta } p \text{ merjena za pline pri } 23 \text{ }^\circ\text{C} \text{ in } 0 \% \text{ RV}$$

$$P \left[\frac{\text{g} \mu\text{m}}{\text{m}^2 \text{ dan}} \right] \quad \dots \text{Konstanta } p \text{ merjena za vodno paro pri } 23 \text{ }^\circ\text{C} \text{ in } 85 \% \text{ RV}$$

2.1.6.3 Tehnike pakiranja

Tehnike pakiranja zmanjšujejo oz. preprečujejo oksidativne spremembe na pakiranih živilih. Te so bile do nedavnega pakiranje v pločevinke v vakuumu ali v stekleno embalažo, ki so jo zapirali po predhodnem odstranjevanju zraka iz praznega prostora nad vsebino s prepihanjem s paro, dušikom ali CO₂, odvisno od izdelka. Pred več kot dvajsetimi leti je šel razvoj naprej z vakuumskim pakiranjem v plastične folije. Pred več kot desetimi leti se je začelo uveljavljati pakiranje v modificirani atmosferi, na kratko MAP (modified atmosphere packaging). (Plestenjak in Požrl, 2000).

Tako kot prej pri pločevinkah ali stekleni embalaži pri MAP pakiranju atmosfero v plastični embalaži nadomestijo z inertnim plinom, ki preprečuje oksidativne procese. V

zadnjem času se je začelo zelo hitro razvijati tako imenovano aktivno pakiranje (active packaging). Predstavlja inovativen pristop k reševanju zahtev trga in potrošnikov. Aktivno pakiranje s pomočjo tehnike pakiranja in embalažnih materialov spremeni pogoje v sami embalaži, ki vodijo k večji trajnosti živila. Izboljša lahko njegovo higiensko sliko, pa tudi senzorično kakovost. Za preprečevanje oksidacije živil se pri aktivnem pakiranju uporabljajo lovilci kisika (Baiano in sod., 2004).

Aktivno pakiranje z lovilci kisika se uporablja pri pakiranju živil, ki vsebujejo sestavine, podvržene oksidaciji, ali aerobne mikroorganizme. Čeprav se ta živila že veliko polnijo v primerno modificirane atmosfere ali vakuumsko, vseh ostankov kisika ni moč odstraniti. Še več, kisika, ki difundira skozi embalažni material, te tehnike ne morejo odstraniti. S pomočjo prisotnega lovilca kisika lahko odstranimo tudi te majhne, preostale količine kisika in tako v veliki meri zmanjšamo spremembe, ki bi nastale zaradi njegove prisotnosti. Med snovi, ki jih danes uporabljamo kot lovilce kisika, štejemo: fine železne opilke, askorbinsko kislino, svetlobno občutljiva barvila, nenasičene maščobne kisline, encime (glukozaoksidazo in alkoholoksidazo), imobiliziran kvas na trdnih nosilcih. (Plestenjak in Požrl, 2000).

2.2 KEMIJSKA SESTAVA SADJA IN OKSIDACIJA

2.2.1 Sestava sadja

Sadje običajno vsebuje med 10 in 25 % ogljikovih hidratov, manj kot 1 % proteinov in manj kot 0,5 % maščob. (Ashurst, 1997; Nagy in sod., 1993; Somogyi in sod., 1996b; Hui, 2006; Kader in Barrett, 2005)

2.2.1.1 Ogljikovi hidrati

Glavni vir ogljikovih hidratov v sadju so sladkorji. Med njimi so najpomembnejši saharoza, glukoza in fruktoza. Koncentracija saharoze se med skladiščenjem znižuje, ker se hidrolizira na glukozo in fruktozo. Poleg treh omenjenih sladkorjev nekatero sadje vsebuje tudi sladkorne alkohole, kot je sorbitol (Somogyi in sod., 1996b).

2.2.1.2 Vitamini

Sadje in zelenjava sta glavni vir vitaminov v prehrani. Koncentracija le-teh je odvisna od vrste sadja. Približne vrednosti dnevnega vnosa vitaminov iz sadja in zelenjave so: 50 % za vitamin A, 60 % za tiamin, 30 % za riboflavin, 50 % za niacin in 100 % za vitamin C (Somogyi in sod., 1996b). Koncentracija vitaminov, ki jih zaužijemo, ni odvisna samo od

vsebnosti v sadju, ampak tudi od priprave. Tako lahko toplota, zamrzovanje, oksidacija, svetloba pripomorejo k zmanjšanju začetnih vrednosti (Hui, 2006).

2.2.1.3 Minerali

Glavni minerali v sadju so tisti, ki formirajo kisline in baze. Tako lahko v sadju zasledimo največ kalija, kalcija, magnezija, natrija ter fosforja, klor in žvepla. V sledovih najdemo tudi: mangan, cink, železo, baker, kobalt in molibden (Somogyi in sod., 1996b).

2.2.1.4 Prehranska vlaknina

V sadju predstavljajo največji delež vlaknine celuloza, hemiceluloza, lignin in pektin. Vsebnosti variirajo med 0,5 in 1,5 % sveže teže. Prehranska vlaknina pripomore k boljši prebavi in k preprečevanju raka na debelemu črevesu (Somogyi in sod., 1996b).

2.2.1.5 Proteini

V sadju so proteini relativno slabo zastopani in je njihova vsebnost največkrat povezana z encimi in proteini iz fotosinteznega aparata. Ostali encimi so povezani z zrelostjo in propadanjem sadja. Encimi, pomembni za kakovost sadja, so tako: oksidaze (askorbinska kislina, polifenol), klorofilaze, lipoksigenaze, poligalakturonaze, pektin esterase in celulaze (Somogyi in sod., 1996b).

2.2.1.6 Lipidi

Razen v redkem sadju, kot je avokado, se koncentracije lipidov gibljejo med 0,1 in 0,2 %. Kljub temu pa so pomembni, saj se običajno nahajajo na površini sadja, kjer varujejo sadje pred izsušitvijo in vdorom patogenih mikroorganizmov. Lipidi so tudi nosilci arom, ki dajejo sadju karakterističen vonj in okus (Somogyi in sod., 1996b).

2.2.1.7 Arome

Spojine, ki dajejo sadju aromo, predstavljajo relativno zelo majhen delež pri celotni teži sadja. Karakteristična aroma je običajno sestavljena iz precejšnjega števila različnih spojin v različnih koncentracijah. To so največkrat estri, terpeni, kratkoveržni aldehidi, ketoni in organske kisline. Njihov efekt je mnogokrat odvisen tudi od kombinacije z ostalimi komponentami, kot so sladkorji in maščobe (Ashurst, 1997).















2.2.1.8 Organske kisline

V sadju predstavljajo dvojno vlogo. Po eni strani so ključni prekursorji metabolnih poti, kot je Krebsov cikel, po drugi strani pa pripomorejo k okusu in vonju ter vplivajo na pH in s tem na zaščito pred mikrobiološko okužbo. V sadju največkrat najdemo citronsko, askorbinsko, jabolčno, kininsko in tartarno kislino (Ashurst, 1997).

2.2.1.9 Fenoli

Sekundarni rastlinski metaboliti, ki so karakteristični za sadje, so rastlinski fenoli. Najbolj karakteristični predstavniki so klorogenska kislina, katehin, epikatehin, leukoantocianidini, antociani, flavonoivi in derivati cimetne kisline (Hui, 2006).

2.2.1.10 Barvila

	klorofil	(E 140 + E 141)
	kurkumin	(E 100)
	lutein, ksantofili	(E161a)
	kartamin	
	α -karoten, β -karoten, γ -karoten	(E 160a)
	β -karoten	(E 160a)
	biksin, norbiksin	(E 160b)
	kapsantin, kapsorubin, karotenoidi	(E160c)
	karminska kislina	(E 120)
	betanin	(E 162)
	antociani	(E 163)
	melanoidi	(E 150a–d)
	melanoidi	
	ogljje	(E 153)

Slika 2. Barvni spekter naravnih pigmentov, ki se uporabljajo kot dodatki živilom, in njihove E številke (Ashurst, 1997)

Figure 2. Color spectrum of natural pigments which are used as food additives and their corresponding E numbers (Ashurst, 1997)

Barva je eden izmed pomembnih pokazateljev kontrole kakovosti sadja in soka, saj neencimsko temnenje odvrča kupce, in je zato pomembna pri določanju roka uporabe določenega proizvoda (Ashurst, 1997).

Najpomembnejši pigmenti so karotenski pigmenti vključno z likopenom in β -karotenom. Pri rdeči pomaranči so najpomembnejši antociani, ki jih najdemo samo v pulpi in ne v olupku. Poleg teh dveh vplivajo tudi flavononi in flavonoli.

Pomembnejši karoteni, ki dajejo barvo pomaranči, so α -karoten, β -karoten, ζ -karoten, α -kriptoksantin. Pigment, ki v največji meri obarva pomarančni sok, pa je β -kriptoksantin (Nagy in sod., 1993).

2.2.1.10.1 Karoteni in karotenoidi

Karotenoidi so alifatske ali alifatsko aliciklične spojine, ki imajo dolg sistem konjugiranih dvojnih vezi in so zelo razširjene v živalih in rastlinah. Dajejo jim značilno rumeno do rdečo barvo. Karotenoidi so predstopnje vitamina A. Med karotenoide uvrščamo tudi lutein in likopen (Schröter in sod., 1993).

Karotenoidi so podvrženi oksidaciji, vendar je njihov vpliv na temnenje majhen zaradi majhne vsebnosti ter relativne obstojnosti v sadju in procesu predelave.

2.2.1.10.2 Antociani

Antociani so vodotopni pigmenti, ki dajejo rastlinam rdeče, modro in vijolično obarvanje. Barva je odvisna od pH, tako so antociani pri pH 3,5 obarvani rdeče, z naraščanjem pH barva prehaja v modro. Količina teh snovi v sadju in zelenjavi je odvisna od agronomskih faktorjev, svetlobe in toplote. Stabilnost antocianov med tehnološkim procesom je odvisna od komponent hrane (npr. encimski sistemi), temperature, svetlobe, prisotnosti kovinskih ionov in različnih organskih kislin (Heredia in sod., 1998; Lee in sod., 2002).

Antociani, izolirani iz rastlin, se lahko uporabljajo kot barvila raznim živilom, kar je s pravilniki dovoljeno povsod po Evropi. Lahko pa se uporabljajo tudi kot antioksidativni funkcionalni dodatek (Känhkönen in Heinonen, 2003).

2.2.1.10.3 Melanoidi

Melanoidi so polimerni rjavi pigmenti, ki v živilih nastanejo s staranjem. Imajo podobno zgradbo kot melanini, s tem, da je vsebnost dušika manjša. Običajno so melanoidi znani kot končni produkt Maillardove reakcije.

2.2.1.11 Prehranska tabela za borovnice

Podatki so preračunani na 100 g svežih borovnic.

Preglednica 3. Prehranske vrednosti za 100 g svežih borovnic (Souci in sod., 2008)

Table 3. Nutritional values for 100 g of fresh blueberries (Souci in sod., 2008)

Opis parametra z enotami	Vsebnost
voda [%]	84,6
energijska vrednost [kcal]	36
proteini [g]	0,6
skupne maščobe [g]	0,6
dostopni ogljikovi hidrati [g]	6,05
prehranske vlaknine [g]	4,90
dostopne organske kisline [g]	1,37
minerali [g]	0,30
natrij [mg]	1,0
kalij [mg]	78
magnezij [mg]	2,4
kalcij [mg]	10
mangan [mg]	4,2
železo [μg]	740
kobalt [ng]	117
baker [μg]	75
cink [μg]	113
nikelj [μg]	7,0
krom [ng]	300
vanadij [ng]	160
fosfor [mg]	13
klor [mg]	5,0
fluor [μg]	2,0
bor [μg]	50
vitamini	
ekvivalent retinola [μg]	5,7
skupni karotenoidi [μg]	34
α-karoten	v sledovih
β-karoten [μg]	34
kriptoksantin	v sledovih
aktivnost vitamina E [mg]	2,1
skupni tokoferoli [mg]	2,7

Nadaljevanje preglednice 3. Prehranske vrednosti za 100 g svežih borovnic (Souci in sod., 2008)

Opis parametra z enotami	Vsebnost
vitamini	
α -tokoferol [mg]	1,9
γ -tokoferol [μ g]	210
α -tokotrienol [μ g]	660
vitamin K [μ g]	12
vitamin B1 [μ g]	20
vitamin B2 [μ g]	20
nikotinamid [μ g]	400
pantotenska kislina [μ g]	160
vitamin B6 [μ g]	60
biotin [μ g]	1,1
folna kislina [μ g]	11
vitamin C [mg]	22
sadne kisline	
jabolčna kislina [mg]	850
citronska kislina [mg]	523
tartarna kislina [μ g]	220
oksalna kislina	-
klorogenska kislina [mg]	121
kininska kislina [mg]	33
posebni karbohidrati	
glukoza [mg]	2465
fruktoza [mg]	3342
saharoza [mg]	236
ksiloza [mg]	21
pentosan [mg]	1080
sorbitol [mg]	4,3
ksilitol [mg]	2,1
purini	
skupni purini [mg]	22
posebne bioaktivne komponente	
kampferol [μ g]	300
kvercetin [mg]	7,0
mirecetin [mg]	4,0
izoramnetin	-
ostalo	
prehranska vlaknina vodotopna [mg]	1400
prehranska vlaknina: nevodotopna [mg]	3500
taninska kislina [mg]	220

2.2.1.12 Prehranska tabela za pomaranče

Podatki so preračunani na 100 g pomaranč.

Preglednica 4. Prehranske vrednosti za 100 g pomaranč (Souci in sod., 2008)

Table 4. Nutritional values for 100 g of fresh orange (Souci in sod., 2008)

Opis parametra z enotami	Vsebnost
voda [%]	85,7
energijska vrednost [kcal]	42
proteini [g]	1,00
skupne maščobe [g]	0,20
dostopni ogljikovi hidrati [g]	8,25
prehranske vlaknine [g]	1,6
dostopne organske kisline [g]	0,48
minerali [g]	
natrij [mg]	1,4
kalij [mg]	164
magnezij [mg]	12
kalcij [mg]	40
mangan [μ g]	35
železo [μ g]	186
kobalt [ng]	500
baker [μ g]	51
cink [μ g]	87
nikelj [μ g]	3,6
krom [μ g]	1,0
fosfor [mg]	20
klor [mg]	4,0
fluor [μ g]	5,0
jod [ng]	827
bor [μ g]	180
selen [μ g]	1,2
brom [μ g]	54
vitamini	
ekvivalent retinola [μ g]	13
skupni karotenoidi [μ g]	104
α -karoten [μ g]	24
β -karoten [μ g]	52
kriptoksantin [μ g]	28
aktivnost vitamina E [μ g]	320
skupni tokoferoli [μ g]	320

Nadaljevanje preglednice 4. Prehranske vrednosti za 100 g pomaranč (Souci in sod., 2008)

Opis parametra z enotami	Vsebnost
vitamini	
α -tokoferol [mg]	320
vitamin K [μ g]	3,8
vitamin B1 [μ g]	79
vitamin B2 [μ g]	42
nikotinamid [μ g]	300
pantotenska kislina [μ g]	240
vitamin B6 [μ g]	104
biotin [μ g]	2,3
folna kislina [μ g]	29
vitamin C [mg]	45
sadne kisline	
jabolčna kislina [mg]	89
citronska kislina [mg]	1027
ferulna kislina [mg]	1,0
kavna kislina [mg]	5,0
p-kumarna kislina [μ g]	500
salicilna kislina [mg]	2,4
posebni karbohidrati	
glukoza [mg]	2285
fruktoza [mg]	2576
saharoza [mg]	3406
pentosan [mg]	300
posebne bioaktivne komponente	
glutation [mg]	4
ostalo	
prehranske vlaknine: vodotopne [mg]	600
prehranske vlaknine: nevodotopne [mg]	1000

2.2.2 Mehanizmi oksidacije naravnih spojin v sadju**2.2.2.1 Encimsko porjavenje in polifenol oksidaze (PPO)**

Izgled, okus, vonj ter energijska vrednost so parametri, ki pri potrošniku igrajo ključno vlogo pri nakupu sadja in zelenjave ter izdelkov iz njiju. Ena prvih stvari, ki jih opazimo pri nakupu je barva. Barvo povzročajo naravni pigmenti: karotenoidi, antociani, klorofili; lahko pa k njej pripomorejo tudi pigmenti, ki nastanejo, kot produkti encimskega ali neencimskega porjavenja (Marshall in sod., 2000).

Encimsko porjavenje, ki pripomore k nastanku rjavih pigmentov, je eden izmed povzročiteljev spreminjanja barve živil in je katalizirano z encimom PPO.

Porjavenje živil igra pri potrošnikih različno vlogo: pri nekaterih živilih je zaželeno in ga spodbujamo, pri drugih pa je odbijajoče (Marshall in sod., 2000).

2.2.2.1.1 Polifenol oksidaze

PPO so v kloroplastih skoraj vseh višjih rastlin. Njihov genski zapis je v jedru, prepis pa se izvrši v citoplazmi. Ko so enkrat formirani, se prenesejo v membrane kloroplastov, kjer se proteolitsko aktivirajo, ko pridejo v stik s substratom (Hunt in sod., 1993; Newman in sod., 1993).

Velikosti PPO variirajo med 57 in 63 kDa. Čeprav so po večini prisotni v vseh organizmih, jih je težko pridobiti v čisti obliki, ker so po večini kontaminirani s pigmenti in zaradi njihove velike variabilnosti. Z rekombinantnimi DNK tehnologijami je bilo mogoče določiti sekvenčno zaporedje aminokislin PPO nekaterih mikroorganizmov iz rodu *streptomices*, paradiznika, krompirja, miši, človeka (Hunt in sod., 1993; Newman in sod., 1993). PPO različnih vrst se razlikujejo tudi po sami velikosti. Tako je velikost PPO za miši 58 kDa, za človeka 63 kDa in gobe 128 kDa. Rastlinske PPO so bakrovi metaloproteini z molekulsko maso 59 kDa in so v notranji strani membran plastidov.

2.2.2.1.2 Kontrola porjavenja

Encimsko porjavenje se ne pojavi v intaktnih celicah, saj so fenolne spojine v vakuolah in so tako ločene od PPO, ki so v citoplazmi in membranah. Ko se tkivo poškoduje zaradi mehanskih ali drugih vplivov, se začnejo tvoriti rjavi pigmenti, kar vpliva na organoleptične in biokemijske spremembe.

Hitrost porjavenja je pogojena z vsebnostjo aktivnih PPO, koncentracijo fenolnih spojin, pH, temperature in dostopnosti kisika. Za kontrolo se tako uporablja regulacija vseh teh parametrov. Najpogostejše metode tako bazirajo na:

- eliminaciji kisika s poškodovane površine (najpogosteje s potapljanjem v vodo, sirup ali pa z vakuumiranjem),
- nastanku kelatov med prostetično skupino encima in s tem deaktivacijo encima,
- inaktivaciji PPO s toplotno obdelavo (blanširanjem, pasteriziranjem, ...),
- kemijski modifikaciji substrata,
- odstranjevanju produktov oksidacije in redukciji ali preoblikovanju le teh (Marshall in sod., 2000).

2.2.2.1.3 Toplotna obdelava in hlajenje

Toplotna obdelava je verjetno ena najpogosteje uporabljenih metod za deaktivacijo PPO in s tem zaščito pred rjavenjem, vendar je ni mogoče uporabiti pri zaščiti svežega sadja. Poleg same deaktivacije encimov s toplotno obdelavo pasteriziramo in s tem uničimo mikroorganizme.

Temperatura in čas segrevanja, ki jo potrebujemo za denaturacijo encimov, sta odvisni od vrste encima. Pasterizacija poteka pri temperaturah 60–85 °C, medtem ko temperature pri blanširanju dosežejo med 70 in 105 °C. Deaktivacija PPO poteče med 70 in 90 °C.

Čeprav je blanširanje dobra zaščita proti porjavenju, pa z njo pospešimo uničenje vitaminov, vpliva pa tudi na okus in barvo. Po drugi strani lahko porjavenje reguliramo z ohlajevanjem ali zmrzovanjem. Kot približna ocena velja, da se s povišanjem temperature za 10 °C v razponu, ki je pomemben za biološko aktivnost, aktivnost encimov dvakrat poveča. Hlajenje tako vpliva na kinetične konstante, ki pospešujejo ali zavirajo kemijske reakcije.

Boljša metoda od samega hlajenja je zmrzovanje. Za trajno zamrzovanje sadja in zelenjave se uporablja temperatura –18 °C. Čeprav je globoko zamrzovanje dokaj uspešna metoda za preprečevanje porjavenja, pa pogosto vpliva na teksturo ter organoleptične lastnosti živil (Ashie in Simpson, 1996).

2.2.2.2 Neencimsko temnenje

Neencimska oksidacija je pogost pojav med skladiščenjem sadnih sokov. Tudi koncentradi, ki so sicer mikrobiološko stabilni, pri sobni temperaturi potemniijo, čemur je vzrok neencimska oksidacija. Ena glavnih reakcij, ki se odvija v sokovih, je Maillardova reakcija (reakcija med sladkorji in aminokislinami), pri kateri nastane intermediat 5-hidroksimetilfurfural, ki je karakterističen in se uporablja za karakterizacijo temnenja.

Poleg Maillardove reakcije ne smemo zanemariti tudi drugih vzrokov, ki so povezani z neencimskim temnenjem. To so:

- degradacija askorbinske kisline,
- karamelizacija sladkorja,
- radikalska oksidacija.

Neencimsko porjavenje lahko tako spremljamo z ugotavljanjem prisotnosti 5-hidroksimetilfurfurala ali spektrofotometrično pri 420 nm (Roig in sod., 1999; Rassis in Saguy, 1995).

Ker so naravni sokovi in koncentradi izredno kompleksne mešanice, je težko ugotoviti, katere komponente sodelujejo pri neencimskem porjavenju. Analize se zato izvajajo v glavnem na modelnih raztopinah. Te dobimo tako, da pripravimo mešanico komponent, ki so prisotne v sokovih in za katere menimo, da sodelujejo pri neencimskem porjavenju. Taka modelna raztopina je vodna raztopina glukoze, fruktoze, aminokislin (asparagin, glutaminska kislina, asparaginska kislina – za te kisline je značilno, da so izredno reaktivne pri Maillardovi reakciji in so tudi zastopane v jabolčnem soku). Analize se izvajajo s segrevanjem vzorcev, saj tako simuliramo vpliv časa in temperature skladiščenja. (Raghavan in sod., 2005).

Ugotovljeno je, da višja temperatura skladiščenja pospeši neencimsko porjavenje, zmanjšanje količine skupnih aminokislin znatno zmanjša stopnjo porjavenja, ravno tako tudi zmanjšanje količine asparagina, ki v soku predstavlja 70 % vseh aminokislin. Zmanjšanje vsebnosti jabolčne kisline pospeši reakcijo porjavenja bolj kot samo znižanje pH vrednosti. Na zmanjšano porjavenje vpliva tudi znižanje vsebnosti skupnih sladkorjev. Rezultati kažejo, da je glukoza bolj reaktivna (sprememba koncentracij glukoze in fruktoze) kot fruktoza. Pri delovanju pektolitičnih encimov nastaja galakturonska kislina, ki tudi pospešuje porjavenje (Raghavan in sod., 2005).

Največji vpliv na proces temnenja zaradi Maillardove reakcije imajo skupne aminokisliline, sledijo skupni sladkorji, razmerje fruktoze in glukoze, ter v končni fazi jabolčna kislina (Jejčič, 1996).

Tekom hranjenja je vrsta embalaže odločilnega pomena za kakovost proizvoda in želen rok trajanja. Zaradi praktičnosti PET embalaže in nekaterimi njenimi prednostmi pred kartonsko ali stekleno embalažo se v določeni meri uveljavlja polnjenje sokov in nektarjev v PET embalažo, ki ima izboljšane barierne lastnosti prepustnosti za kisik.

Obstaja več različnih vrst take embalaže, ki različno vpliva na kakovost proizvoda (aromo, barvo, vsebnost vitaminov, karotenoidov, antocianov, fenolnih antioksidantov, antioksidativno učinkovitost) (Taoukis in sod., 1997).

2.3 OKSIDACIJSKI PROCESI V ČLOVEŠKEM ORGANIZMU

2.3.1 Reaktivne kisikove spojine (RKS)

2.3.1.1 Razdelitev in izvor prostih radikalov

Kisik je nujno potreben za delovanje človeškega organizma, vendar pa je v največji meri tudi izhodna spojina za nastanek reaktivnih kisikovih spojin (RKS) tudi pod normalnimi fiziološkimi pogoji. RKS so odgovorne za oksidativne deformacije bioloških molekul, kot so DNK, ogljikovi hidrati in proteini (Sies, 1991; Halliwell, 1996). Ti procesi so večkrat vpleteni v začetek in razvoj patobiokemijskih mehanizmov, ki vodijo do nastanka različnih bolezni.

Ključne RKS za nastanek oksidacijskih poškodb so:

- hidroksi radikal (HO^\cdot),
- peroksi radikali (ROO^\cdot),
- dušikov oksidni radikal (NO^\cdot),
- superoksidni anionski radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$),
- singletni kisik ($^1\text{O}_2$),
- peroksinitrit (ONOO^-),
- peroksid (H_2O_2).

2.3.1.2 Definicija RKS

RKS so lahko radikali (molekule, ki vsebujejo vsaj en nesparjen elektron) ali pa reaktivne kisikove molekule, ki imajo sposobnost oksidacije biomolekul. Te spojine lahko poimenujemo tudi oksidanti ali bolje prooksidanti (Sies, 1991).

2.3.1.3 Nastanek superoksidnega radikala

2.3.1.3.1 Nastanek superoksidnega radikala pri motnji v dihalni verigi

Kljub temu, da so oksidanti lahko različne spojine, je začetna spojina za nastanek ostalih spojin superoksidni anionski radikal. $\text{O}_2^{\cdot-}$ nastane z encimatsko redukcijo (samo enega elektrona) kisika s katalizo ksantin oksidaze, NADPH oksidaze ali z nepravilnostmi v dihalni verigi. Ocenjeno je, da se 1–3 % kisika, ki ga uporabljamo, spremeni v $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Haliwell, 1996).

Poleg motenj v elektronskem transportu dihalne verige lahko prosti radikali nastanejo tudi v endoplazmatskem retikulumu s katalizo desaturaznega encimskega sistema. Desaturaze katalizirajo nastanek dvojnih vezi v nasičenih maščobnih kislinah. Za to reakcijo potrebujejo kisik, NADH ali NADPH ter citokrom b5. Elektroni potujejo od NAD(P)H do

citokroma preko flavoproteinskega encima. Nato reducirani citokrom b5 posreduje elektrone do desaturaznega encimskega sistema. Tako citokromu kot flavoproteinskemu kompleksu lahko uhajajo elektroni, ki tvorijo superoksidni anionski radikal.

Produkcija ($O_2^{\cdot-}$) nastaja v vseh aerobnih celicah in je odvisna od koncentracije kisika.

2.3.1.3.2 Nastanek superoksidnega radikala kot del imunskega odziva

RKS lahko nastajajo tudi iz strani aktiviranih levkocitov kot del imunskega odziva organizma. Makrofagi in neutrofili vsebujejo encim NADPH oksidazo, ki katalizira elektronsko redukcijo enega elektrona od kisika do $O_2^{\cdot-}$, iz katerega lahko nato nastanejo ostale RKS.

Drugi encim, ki ga najdemo v levkocitih, je mieloperoksidaza, ki katalizira nastanek H_2O_2 . Ta RKS se uporablja kot del imunskega odziva za uničenje zaužitih ali ekstracelularnih bakterij. Ampak delovanje teh encimov v uporabi ni omejeno samo na del imunskega odziva, pač pa lahko pripomore k oksidativnemu stresu lastnega organizma (Punchard in Kelly, 1997).

Naslednja možnost za nastanek nesparjenih elektronskih parov in s tem prehajanje elektronov v napačni smeri dihalne verige. Išemija lahko nastane med mitohondrijskim infarktoma ali presaditvijo organov. Pri tem nastanejo prosti radikali s katalizo ksantin oksidaze. Ta encim pretvori hipoksantin in ksantin do sečne kisline, pri tem pa nastaja superoksidni radikal (Punchard in Kelly, 1997).

2.3.1.3.3 Nastanek superoksidnega radikala zaradi zunanjih vplivov

Prosti radikali lahko nastanejo zaradi zunanjih vplivov, kot so ultravijolična svetloba, onesnaženje zraka ali cigaretne dim. Dušikov dioksid je eden glavnih antioksidantov kot tudi v cigaretne dimu. V cigaretne dimu pa je prisoten še (NO^{\cdot}) v katranu ter drugi radikali v plinski fazi, ki lahko privedejo do nastanka superoksidnega anionskega radikala (Chow, 1993).

Superoksidni anionski radikal lahko zmanjša aktivnost nekaterih encimov, med njimi encimov, ki imajo antioksidativno funkcijo: katalaze, glutathion peroksidaze in drugih, ki sodelujejo v dihalni verigi, kot je NADH dehidrogenaza.

Drugi encim, na katerega delujejo prosti radikali, je ribonukleotidna reduktaza, ki katalizira prekursorje za sintezo DNK. Lahko vpliva tudi na kalcinevrin, ki je udeležen pri prenosu signalov.

Poleg direktnega vpliva superoksidnega anionskega radikala lahko iz le-tega nastaja vodikov peroksid. Kljub temu, da vodikov peroksid ni radikal, je lahko citotoksičen nekaterim encimom, kot je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza.

2.3.1.4 Peroksid

Peroksid je neradikalska RKS in lahko prehaja med celicami. V kratkem času je spremenjen v vodo z pomočjo katalaz.

Poleg tega lahko vodikov peroksid oksidira nekatere keto-kislino, kot je piruvat, uničuje ATP, reducira glutation in NADPH. Pospešuje dvig prostih citosolnih kalcijevih ionov in aktivira polimeraze, ki lahko povzročijo celično smrt. Vodikov peroksid lahko preide čez membrano in reagira z železom in bakrom, kar vodi do reaktivnih hidroksi radikalov in peroksnitritnega radikala (Roberford in Calderon, 1995).

2.3.1.5 Hidroksi radikal

Najbolj reaktivna spojina je hidroksi radikal, ki ima povprečen razpolovni čas 10^{-9} s. V živih sistemih lahko nastaja s pomočjo visokoenergijskih sevanj (X žarki) iz vode ali H_2O_2 . Reakcija je katalizirana s kovinskimi ioni. Sevanja UV-Vis spektra niso dovolj za razgradnjo vode, lahko pa razgradijo peroksid. Prosti radikal reagira z nadaljnjimi spojinami na mestu nastanka.

2.3.1.6 Peroksi radikali

Peroksi radikali so relativno dolgo obstoječe spojine (rang je sekunda), poleg tega pa imajo tudi velike možnosti difuzije. Nastanejo lahko pri peroksidaciji lipidov. Reakcija se začne z odvzemom vodikovega atoma iz polinenasičenih maščobnih kislin. Hidroksi radikal je lahko iniciator te reakcije.

Pri peroksidaciji lipidov lahko nastanejo tudi alkoksi radikali ($RO\cdot$) in organski hidroperoksidi ($ROOH$). Kasneje se lahko pretvorijo v endoperoksidne intermediate in vplivajo na reakcijo vezave aldehydov na aminokislinske ostanke proteinov, kar povzroči tudi spremembo proteinskega dela lipoproteinov (Esterbauer in sod., 1992; Raeven in sod., 1996).

2.3.1.7 Singletni molekularni kisik

Singletni molekularni kisik je naslednja neradikalska spojina s kratko razpolovno dobo (10^{-6} s), ki nastane v živih organizmih pod vplivom UV svetlobe. $O_2^{\cdot-}$ lahko vpliva na okoliške molekule tako, da odda energijo vzbujenega stanja ali kemijsko reagira z okoliškimi spojinami. Ciljno mesto za reakcijo so dvojne vezi v polinasičenih maščobnih kislinah, gvaninu in bazah DNK (Cadet in sod., 1994).

2.3.1.8 Dušikov anionski radikal

Dušikov anionski radikal je signalna spojina, ki nastane encimsko iz arginina in sprošča gladke mišice žil, kar se odraža na znižanju krvnega tlaka. Sintetizirajo ga tudi aktivirani makrofagi, kar prispeva k primarni imunski zaščiti. Kljub koristnosti pa je prevelika količina dušikovega oksidnega radikala citotoksična. Reagira lahko z okoliškimi biomolekulami ali pa se z 1O_2 pretvori v peroksinitritni anion, ki spodbuja lipidno peroksidacijo in moti celično signaliziranje z nitracijo tirozinskih ostankov v proteinih (Beckman, 1996).

2.3.2 Encimsko in neencimsko preprečevanje oksidacije

Pri obrambi pred prostimi radikali sodelujejo tako encimski, kot neencimski antioksidanti. Antioksidant je spojina, ki je v primerjavi s substratom prisotna v nizkih koncentracijah in občutno zaustavlja ali preprečuje oksidacijo substrata (Sies, 1991).

Prva linija zaščite deluje na nastanek prostih radikalov. To so peroksidaze ter proteini, ki kelatizirajo kovine. Druga linija so antioksidanti, ki lovijo proste radikale in s tem inhibirajo radikalsko oksidacijo. Zadnji nastopijo De novo encimi, ki popravijo škodo, ki so jo naredili prosti radikali (lipaze, proteaze, DNK popravljalni encimi, transferaze (Niki, 1997).

2.3.2.1 Encimsko preprečevanje oksidacije

Glavni encimi, ki so direktno povezani z detoksifikacijo RKS, so: superoksidne dismutaze, ki lovijo kisikov anionski radikal, katalaze in glutation peroksidaze, ki zmanjšujejo koncentracijo vodikovega peroksida ter hidroperoksidov. Kofaktor za delovanje glutation peroksidaz je selen. Študije na živalih so pokazale, da uživanje selena zmanjša možnost za nastanek raka. Študije na ljudeh so še vedno v razvoju (Levander in Burk, 1996).

Druga možnost za kontrolo nastanka RKS je regulacija koncentracije prostih železovih in bakrovih ionov, ki katalizirajo nastanek RKS. Drugi kofaktorji, ki vplivajo na encimsko delovanje, so še GSH (glavni citosolni tiol), ubikinol-10, ureat, bilirubin (Jacob in Burri, 1996).

2.3.2.2 Neencimsko preprečevanje oksidacije

Neencimsko obrambo v človekovem organizmu predstavljajo antioksidanti, ki jih dobimo s hrano (Kalt in sod., 1999).

2.3.2.2.1 Vitamini

Vitamini so kemijske spojine, ki jih organizem ne more sintetizirati sam, kljub temu pa so esencialnega pomena za njegovo delovanje.

Vitamine delimo na:

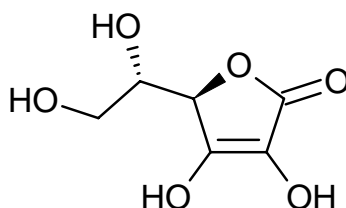
- v maščobah topne vitamine: vitamin A (retinol), vitamin D (kalciferol), vitamin E (tokoferol) in vitamin K;
- v vodi topne vitamine: vitamini B-kompleksa: B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B6 (piridoksin), B12 (kobalamin); niacin; pantotenska kislina; folna kislina; biotin in vitamin C (Schröter in sod., 1993).

Večina vitaminov je sestavni del encimov ali koencimov in so tako pomembni za normalno presnovo organizma. Vitamini C in E ter β -karoten delujejo tudi kot antioksidanti.

2.3.2.2.1.1 Vitamin C

Vitamin C je kemijsko L-askorbinska kislina (1,4-lakton-2,3-diketogulonska kislina); ta lahko ob prisotnosti kisika, toplote ali encimov oksidira v L-dehidroaskorbinsko kislino. Med L-askorbinsko kislino in L-dehidroaskorbinsko kislino poteka oksidacijsko-redukcijska reakcija, katera naj bi bila odgovorna za fiziološko aktivnost vitamina C.

Največ vitamina C najdemo v svežem sadju: jagodičevju (šipek, črni ribez, jagoda, malina, rdeči ribez) in južnem sadju (mango, papaja, pomaranča, limona, kivi) ter v zelenjavi (peteršilj, krompir, paprika, brokoli, brstični ohrovt, cvetača, por, paradižnik).



Slika 3. Strukturna formula askorbinske kisline (vitamina C) (Schröter in sod., 1993)

Figure 3. Ascorbic acid structural formula (vitamin C) (Schröter in sod., 1993)

Vitamin C je zelo neobstoje in se pri pripravi hrane hitro uniči, zato je najbolje, da sadje in zelenjavo uživamo sveže in nepredelano.

Vitamin C je priznan kot eden najmočnejših in najmanj škodljivih naravnih antioksidantov (Weber in sod., 1996). Je vodotopen in se nahaja v visokih koncentracijah v mnogih tkivih. Človeška plazma vsebuje približno 60 μmol askorbata/l. V interakciji z RKS se oksidira preko intermedijata askorbil radikala v dehidroaskorbat. Ta se nato reciklira s pomočjo dehidroaskorbat reduktaze, zato se dehidroaskorbat najde v krvni plazmi samo v majhnih koncentracijah.

V funkciji lovilca RKS se je vitamin C izkazal koristen kot lovilec superoksidnega anionskega radikala, vodikovega peroksida, hidrosilnega radikala in singletnega kisika. V vodnih raztopinah askorbinska kislina lovi tudi dušikove oksidne radikale.

Glavni vir C-vitamina v hrani je sadje, še posebno citrusi, kivi, višnje in melone; v visokih koncentracijah ga najdemo tudi v zelenjavi: paradižniku, listnati zelenjavi, brokoliju, cvetači in zelju. V majhnih količinah (100 mg) je biološka sposobnost absorpcije tako sintetično pridobljenega kot naravnega C-vitamina enaka, vendar zmožnost absorpcije sintetičnega C-vitamina s količino pada (Levine in sod., 1996). Potrebno je tudi upoštevati, da v prevelikih količinah ob prisotnosti železovih in bakrovih ionov C-vitamin lahko deluje tudi kot prooksidant.

2.3.2.2.1.2 Vitamin E

Termin vitamin E je generična oznaka za vse tokolne in tokotrienolne derivate, ki prikazujejo biološko aktivnost α -tokoferola. Ta skupina spojin je visoko lipofilna in deluje v membranah ali lipoproteinih. Njihova največja vloga je inhibicija peroksidacije lipidov, lovljenje lipidnih prostih radikalov, tako da nastanejo lipidni hidroperoksidi in tokoferoksi radikali. Tokoferoksi radikal je mnogo manj reaktiven kot lipidni peroksi radikal. Tako so polinenasičene maščobne kisline varnejše pred oksidacijo. Kasneje se tokoferoksi radikal

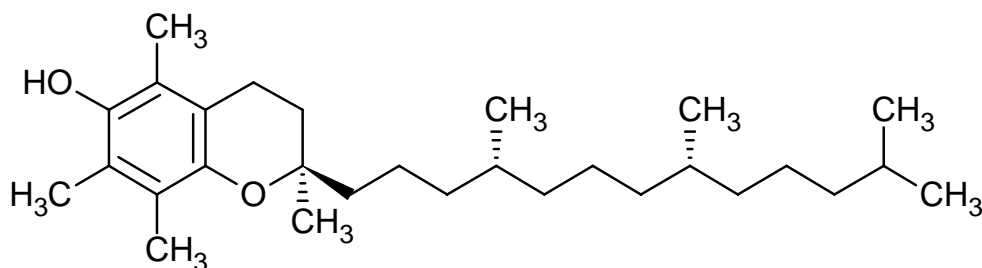
reducira z askorbatom ali se še najprej oksidira v odgovarjajoč kinon. Ker so koncentracije tokoferolnih kinonov v celicah nizke, je v živih sistemih preferirana pot redukcije.

V nasprotju z askorbatom so tokoferoli najbolj učinkoviti v lipidnih fazah. Dokazane so bile interakcije s singletnim kisikom in peroksinitritom.

Vitamin E uravnava normalno celično zgradbo, delovanje hormonov, razvoj in delovanje živčevja, varuje celične stene in membrane; ugodno vpliva na kožo; pomemben je za normalen pretok krvi po žilah (uravnava strjevanje krvi), pomaga širiti zožene krvne žile; varuje jetra, pljuča in kožo pred vnetji. Organizem naj bi varoval pred razvojem raka in arterioskleroze.

Največ vitamina E najdemo v rastlinskih oljih, kot so: sojino, koruzno in bombažno olje, ter produktih, ki jih izdelujemo iz teh olj: margarini in majonezi. Tokoferole najdemo tudi v pšeničnih kalčkih, oreških in nekateri listnati zelenjavi.

V krvni plazmi najdemo približno 22 mmol vitamina E/l. Večje količine vitamina E najdemo tudi v jetrih, ledvicah in nadledvičnih žlezah (Traber in Sies, 1993).



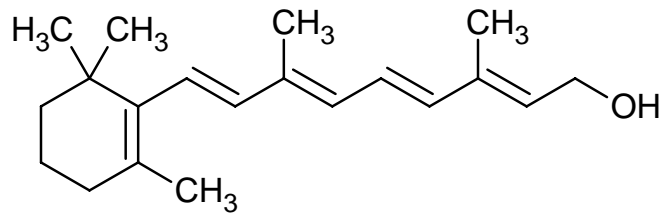
Slika 4. Strukturna formula α -tokoferola (vitamina E) (Schröter in sod., 1993)

Figure 4. α -tocopherol structural formula (vitamin E) (Schröter in sod., 1993)

2.3.2.2.1.3 Vitamin A

Vitamin A nastaja v črevesni sluznici iz provitamina (β -karotena). β -karoten najdemo v korenju, melonah, zelenjavi z rumenimi in zelenimi listi (špinača, artičoke, endivija, radič, motovilec) in sadju (marelice, bezeg).

Prehrana, bogata s karotenoidi, zmanjšuje tveganje za nastanek različnih vrst raka in sive mreže, ščiti kožo pred učinki UV-svetlobe in varuje pred odebelitvijo sten arterij.



Slika 5. Strukturna formula vitamina A (Rodriguez-Amaya, 2001)

Figure 5. Vitamin A structural formula (Rodriguez-Amaya, 2001)

Glavni antioksidanti, ki jih lahko dobimo s hrano, so vitamini, tokoferoli, flavonoidi in karotenoidi. Razen vitaminov C in A vse ostale skupine obsegajo večje število spojin, ki so lahko strukturno tudi zelo različne.

2.3.2.2.2 Karotenoidi

Karotenoidi so naravna barvila, ki imajo funkcijo antioksidantov zaradi konjugiranih dvojnih vezi. RKS, ki jih karotenoidi uspešno lovijo, so: singletni kisik in peroksi radikali. Reakcija s prostimi radikali lahko poteka na dva načina: fizikalno in kemijsko lovljenje (Truscott, 1990).

Fizikalno lovljenje obsega deaktivacijo singletnega kisika s prenosom energije z vzbujenega elektrona singletnega kisika na karotenoid, ki nato preide v vzbujeno stanje. Energija se izgubi z vibracijskimi interakcijami s topilom. Pri tem ostane karotenoid nedotaknjen. Kemično lovljenje prostih radikalov obsega mnogo manjši delež od fizikalnega lovljenja, pri tem se karotenoid uniči.

Karotenoidi so od vseh antioksidantov najboljši lovci singletnega kisika (Kennedy in Liebler, 1992).

Tako kot tokoferoli so tudi karotenoidi lipofilni antioksidanti, prisotni v lipoproteinih, kot sta LDL in HDL. Po oksidaciji karotenoidov ni znane poti regeneracije.

Karotenoidi v rastlinah so običajno C40 tetraterpenoidi, zgrajeni iz osmih C5 izoprenskih enot združenih tako, da so sredinsko centrirane. Osrednji linearni simetrični skelet je cikliziran na enem ali na obeh koncih, ima lateralne metilne skupine, ločene z šestimi C-atomi v centru in petimi C-atomi drugje. Ciklizacija in druge modifikacije, kot so hidrogenacija, dehidrogenacija, migracija dvojne vezi, skrajševanje ali podaljšanje verige, preureditve, izomerizacija, uvajanje kisika ali kombinacija teh procesov, povzročijo raznolikost v funkciji in strukturi karotenoidov.

Skupna lastnost karotenoidov je dolg konjugiran sistem dvojnih vezi, ki služi kot kromofor, ki absorbira svetlobo in tako povzroči obarvanost z rumeno, oranžno in rdečo barvo.

Karotenoide, sestavljene samo iz ogljika in vodika, imenujemo karoteni; ostale, ki vsebujejo tudi kisik, pa ksantofili. V naravi obstajajo primarno v bolj stabilni all-trans izomeri, kljub temu pa je mogoča tudi cis izomera. Prvi dve izomeri iz biosintezne poti imata v naravni obliki tudi 15-cis konfiguracijo. Ker imajo rastline možnost sinteze karotenoidov, najdemo v njih majhne količine vseh biosinteznih prekurzorjev skupaj z derivati glavnih sinteznih produktov.

2.3.2.2.2.1 Karotenoidi, ki so v hrani najbolj pogosti

Od acikličnih karotenoidov so najbolj pogosti likopen in ζ -karoten. Likopen je osnoven karotenoid pri večini rdečega sadja in rastlin: paradižniku, meloni, papaji, guavi in rdeči ali rožnati grenivki. ζ -karoten je običajno prisoten v manjših koncentracijah razen pri brazilski pasijonki in karamboli (Mercadante in sod., 1998).

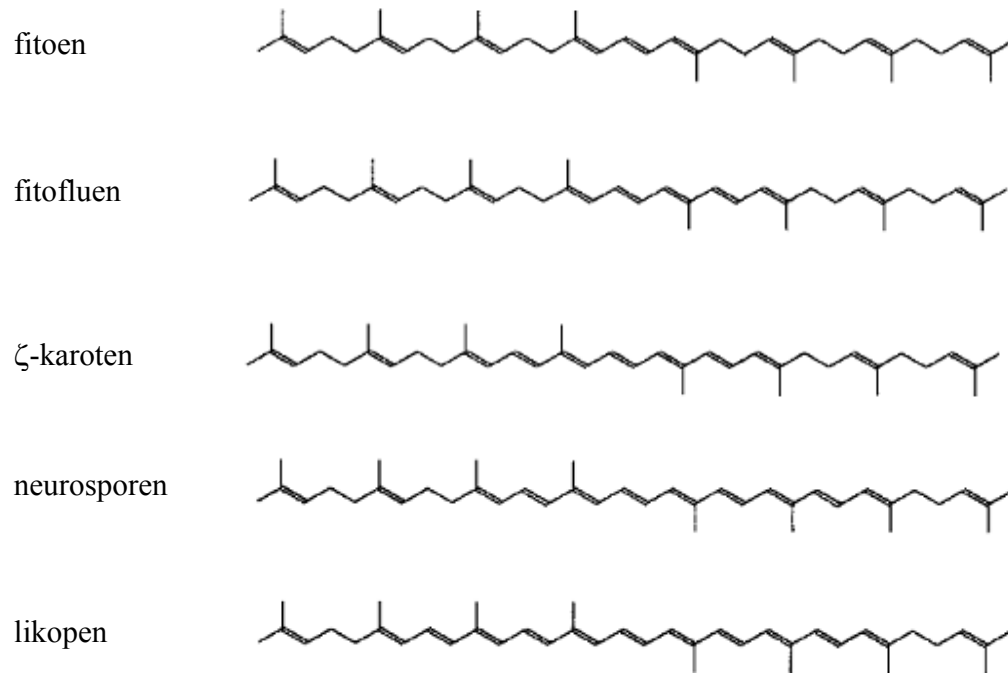
Fitoen in fitofluon sta brezbarvna in neaktivna v funkciji vitamina A. Neurosporen pa je v normalnih razmerah prisoten v relativno majhnih količinah.

Biciklični β -karoten je eden izmed najbolj razširjenih karotenoidov v večjih ali manjših koncentracijah (marelica, korenje, mango, češnje). Biciklični α -karoten in monociklični γ -karoten sta običajno pridružena β -karotenu, vendar v mnogo manjših koncentracijah. α -karoten je v večji meri prisoten v korenju in v nekaterih vrstah buč (Arima in Rodriguez-Amaya, 1990).

Hidroksi derivate likopena, lipoksantina in likofila redkeje najdemo v najbolj razširjenem sadju in zelenjavi. V manjših koncentracijah so prisotni v paradižniku (Cavalcante in Rodriguez-Amaya 1992).

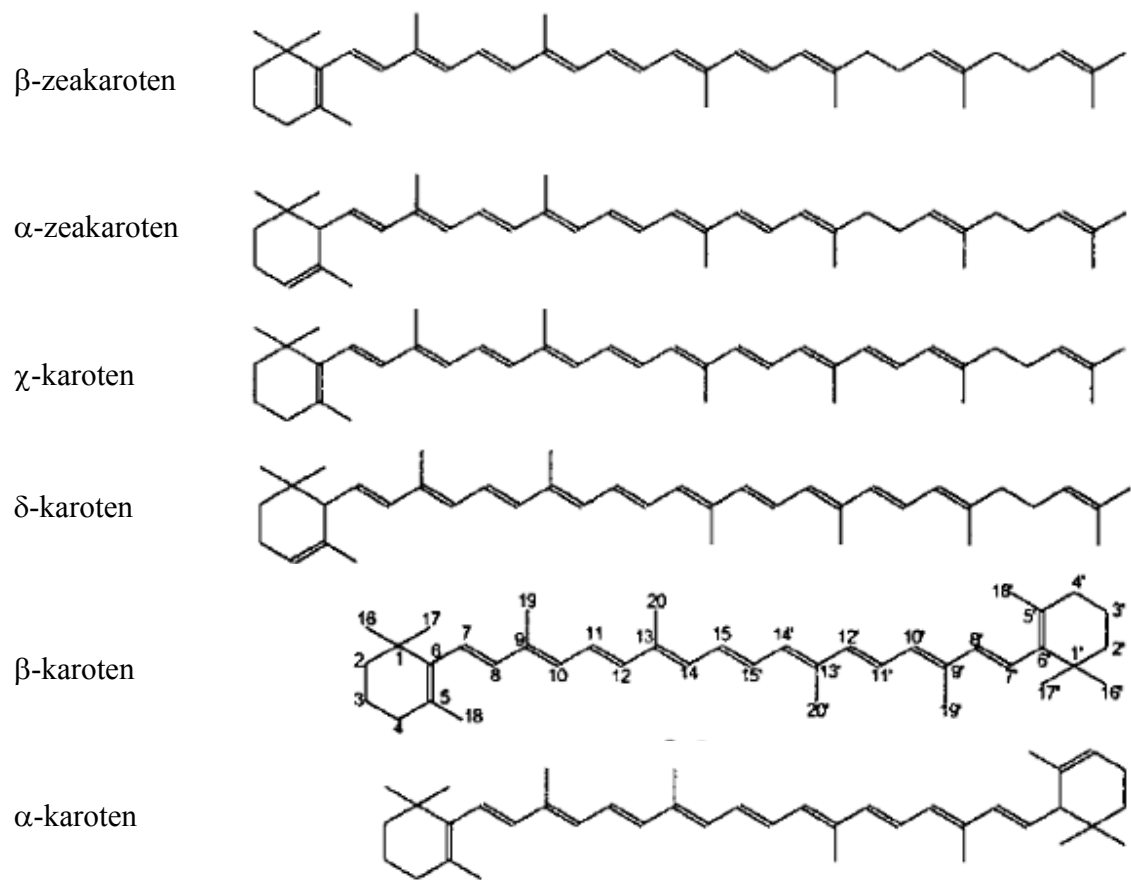
Ksantofili, kot sta α -kriptoksantin in zeaksantin, so prisotni v večini sadja in zelenjave, vendar v majhnih koncentracijah, medtem ko je β -kriptoksantin eden glavnih pigmentov v oranžno obarvanem sadju (breskve, nektarine, papaja).

V nasprotju s pogostostjo izvornih substanc α - in β -karotena je lutein v tkivih prisoten v višjih koncentracijah kot zeaksantin. Lutein je eden pomembnejših pigmentov v zeleni zelenjavi in rumenih rožah. Zeaksantin je v tkivih manj prisoten, ker se lahko pretvori v anteraksantin in violaksantin.



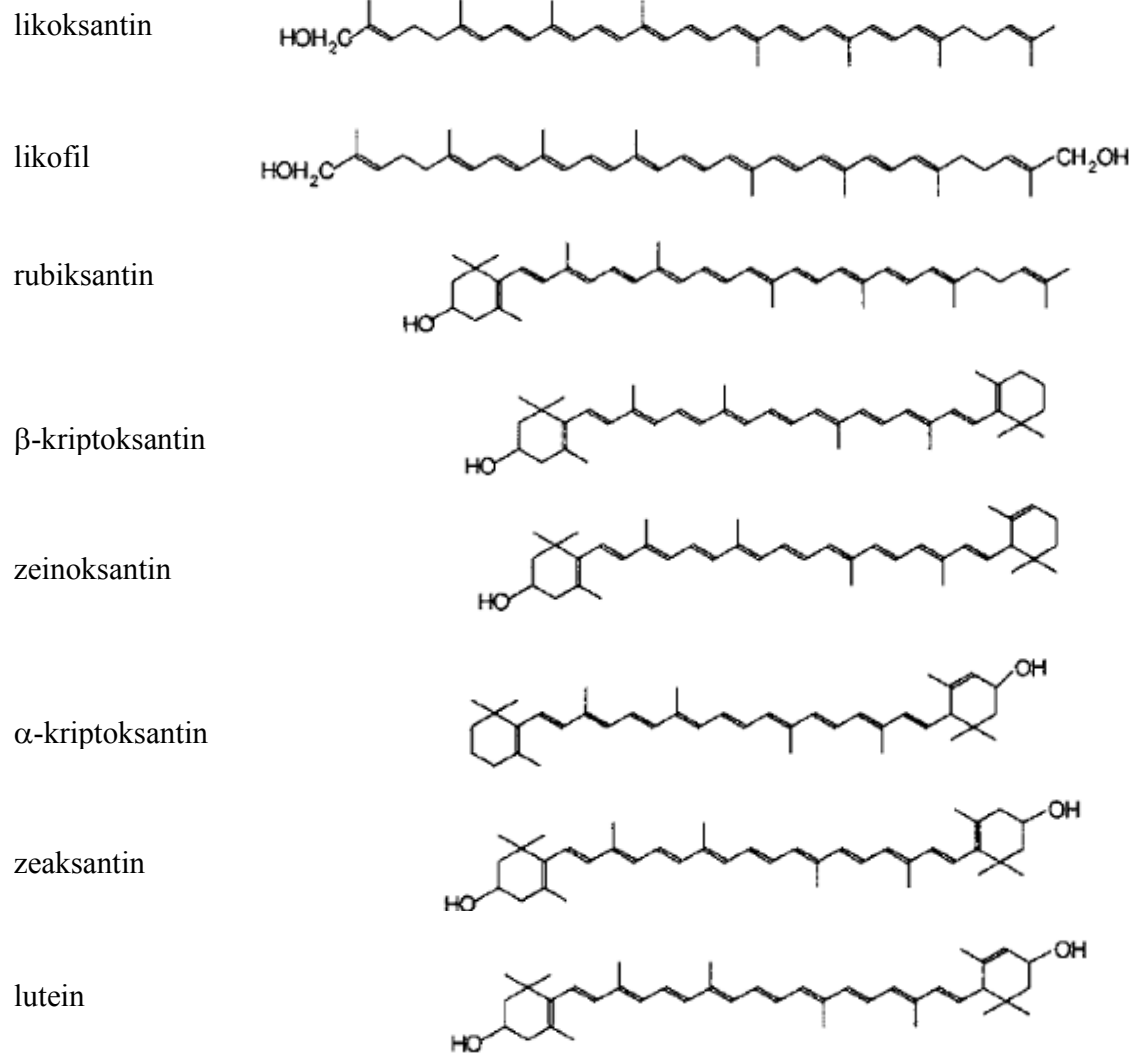
Slika 6. Strukturne formule in trivialna imena acikličnih karotenov (Rodriguez-Amaya, 2001)

Figure 6. Structural formulas and trivial names of acyclic carotenes (Rodriguez-Amaya, 2001)



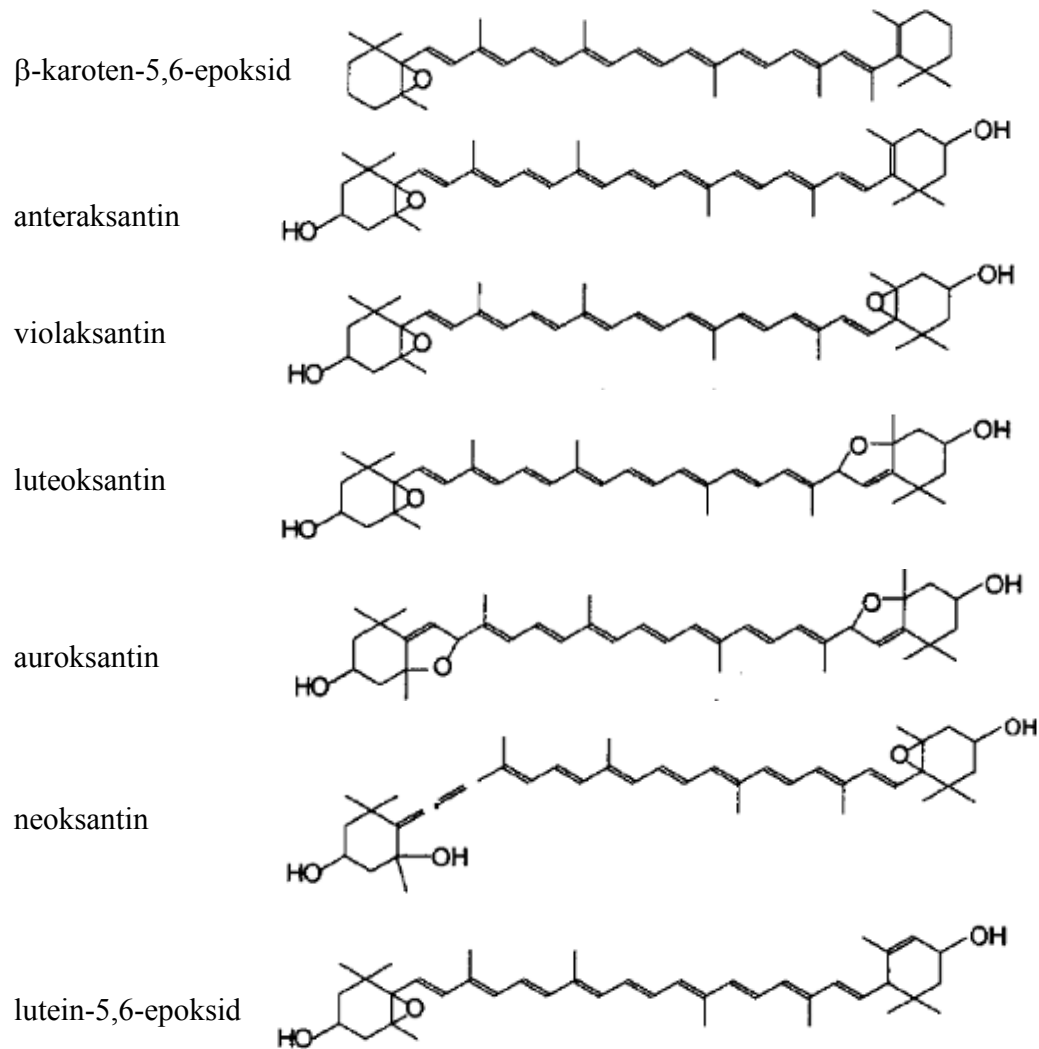
Slika 7. Strukturne formule in trivialna imena cikličnih karotenov (Rodriguez-Amaya, 2001)

Figure 7. Structural formulas and trivial names of cyclic carotenenes (Rodriguez-Amaya, 2001)



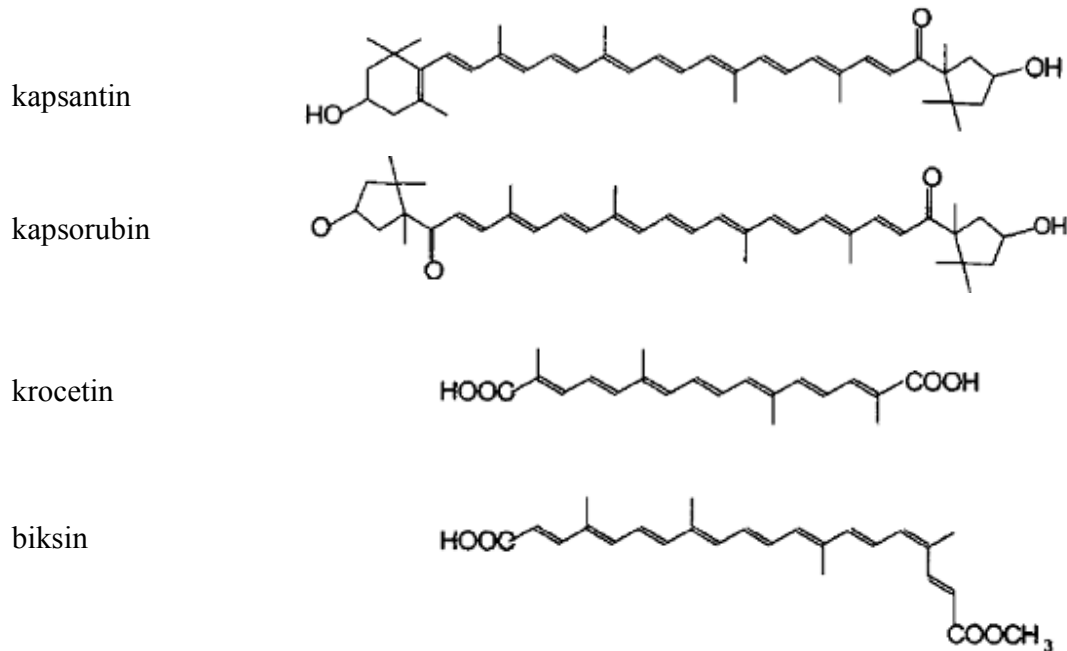
Slika 8. Strukturne formule in trivialna imena karotenolov (hidroksikarotenoidov) (Rodriguez-Amaya, 2001)

Figure 8. Structural formulas and trivial names of carotenols (hydroxycarotenoids) (Rodriguez-Amaya, 2001)



Slika 9. Strukturne formule in trivialna imena epoksikarotenoidov (Rodriguez-Amaya, 2001)

Figure 9. Structural formulas and trivial names of epoxy-carotenoids (Rodriguez-Amaya, 2001)



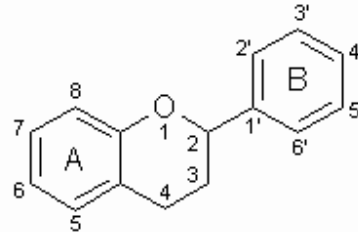
Slika 10. Strukturne formule in trivialna imena nekaterih posebnih karotenoidov (Rodriguez-Amaya, 2001)
Figure 10. Structural formulas and trivial names of some unique carotenoids (Rodriguez-Amaya, 2001)

2.3.2.2.3 Fenoli

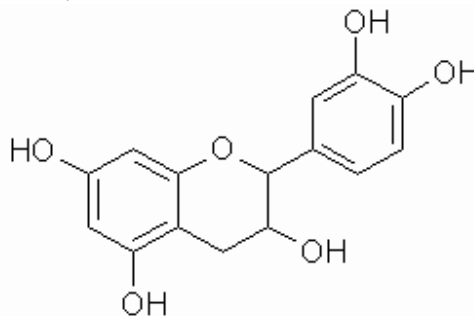
Substrati za reakcije, ki jih katalizirajo PPO, so zelo razširjeni med rastlinami in jih lahko označimo kot sekundarne metabolite. Strukturno vsebujejo vsaj en aromatski obroč in eno ali več fenolnih skupin. Vsebnost in vrsta fenolnih spojin se razlikujeta glede na vrsto, kultivar, stopnjo zrelosti in klimatskih pogojev. Fenolne skupine pripomorejo k barvi, okusu in aromi sadja (Cheynier in Moutounet, 1992; Joseph in Lloyd, 2004).

Najbolj razširjeni fenolni substrati v rastlinah so flavonoidi (antocijanidini, flavonoli, cimetna kislina, ...) ter fenolne kisline (cimetna kislina, kavna kislina in klorogenska kislina ...) (Rice-Evans in Miller, 1996).

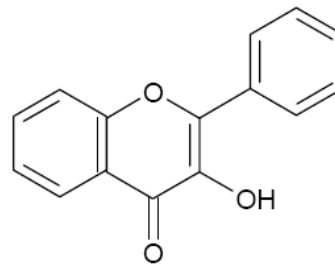
flavonoidni skelet

**Slika 11.** Osnovni flavonoidni skelet (Macheix, 1990)**Figure 11.** Basic flavonoid structure (Macheix, 1990)

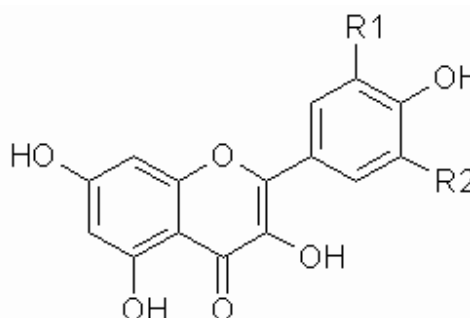
katehini

**Slika 12.** Osnovni katehinski skelet (Macheix, 1990)**Figure 12.** Basic catechin structure (Macheix, 1990)

flavonoli



kvercetin (R1=OH; R2=H)
 mirecetin (R1=R2=OH)
 kampferol (R1=R2=H)

**Slika 13.** Strukturna formula flavonolov in tipični predstavniki skupine (Macheix, 1990)**Figure 13.** Structural formula of flavonols with typical representatives (Macheix, 1990)

2.3.2.2.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi so široka skupina polifenolnih antioksidantov, ki jih najdemo v različnem sadju in zelenjavi, čaju, vinu in pivu. Nahajajo se v obliki O-glukozidov. Flavonoidi so sposobni lovljenja peroksi radikalov, hidroksi radikalov in kisikovega anionskega radikala. Pri tem nastane fenoksi radikal (Rice-Evans in sod., 1995).

Flavonoide lahko razdelimo na različne skupine:

- flavanole (katehin, epikatehin),
- flavonole (kvercetin, mirecetin, kamferol),
- flavanone (naringin, taksifolin),
- flavone (apigenin, hesperetin),
- izoflavone (genestein),
- antociane (cianidin, malvidin).

Za uspešno lovljenje prostih radikalov mora biti izpoljenih več pogojev:

- 3',4'-dihidroksi struktura v B-obroču,
- prisotnost 2,3 dvojne vezi konjugirane s 4-okso skupino v C-obroču,
- prisotnost 5-hidroksi skupine v A-obroču,
- 3-hidroksi skupine v C-obroču,
- 4-okso funkcije v C-obroču.

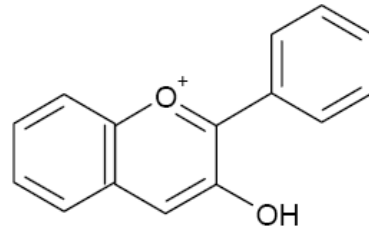
Flavonoidi so nizko molekularne fenolne komponente, ki so široko zastopane v rastlinah. Do sedaj jih je bilo opisanih preko 6000 različnih naravno sintetiziranih (Stafford, 1991; Winkel-Shirley, 1999, 2001).

V mnogo primerih so to naravni pigmenti v rastlinah, udeleženi so v mnogih bioloških aktivnostih. Osnova flavonoidov je C₆-C₃-C₆ flavonski skelet, pri katerem je 3-ogljikov obroč običajno cikliziran s kisikom. Glede na stopnjo nenasičenosti in oksidacije lahko flavonoide razvrstimo v več razredov. Večina opisanih flavonoidov se nahaja v obliki flavonoid glikonov, ki so večinoma vodotopni in se nahajajo v vakuolah rastlinskih celic (Bohm, 1998).

Glavne ugotovitve zadnjega časa so potencialni ugodni vplivi na zdravje. Flavonoidi kot antioksidanti varujejo pred nastankom kardiovaskularnih bolezni in raka. Imajo tudi antivirusne, antibakterijske in antialergene lastnosti (Hertog in sod., 1995). Njihova učinkovitost pa se lahko zaradi skladiščenja tudi zmanjša ali celo izniči (Srivastava, 2007).

2.3.2.2.3.2 Antociani

antocianidin



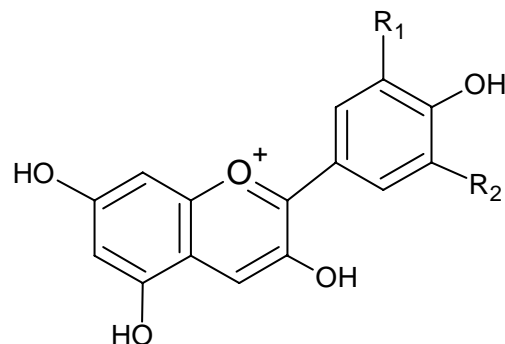
petunidin R1=H R2=H

cianidin R1=OH R2=H

delfinidin R1=OH R2=OH

peonidin R1=Ome R2=H

malvidin R1=Ome R2=OMe

**Slika 14.** Antocianidinski skelet in tipični predstavniki skupine (DeMan, 1999)**Figure 14.** Structural formula of anthocyanidins and typical representatives of the group (DeMan, 1999)

Antociani predstavljajo eno od vrst flavonoidov. Lahko so prisotni v obliki antocianozidov, to so antociani povezani z glukozo. Najdemo jih lahko tudi v obliki proantocianidinov. Antociani so polihidroksi in polimetoksi derivati 2-fenil benzopirilija. Razlike v antocianih lahko določimo z različnimi funkcionalnimi skupinami na mestih A 5,7, B 3',4',5' in C 3.

Antociani so občutljivi na spremembo pH. Pri pH pod 2 obstajajo v rdeči ali rumeni obliki. Pri pH od 2 do 4 so lahko rumeni, modri ali vijoličasti, pri pH 4–4,5 modri ali vijoličasti. Če pH naraste nad 4,5, antociani postanejo brezbarvni (Ichiyanagi, 2000).

Antociani so naravno barvilo mnogih rastlin. Antociane lahko najdemo v borovnicah, brusnicah, jagodah, črnem grozdu, rdečem zelju, slivah, ... V rastlinah je prisotnih največ 6 antocianov in to so: malvidin, cianidin, petunidin, peonidin, delfinidin in pelargonidin (Scalbert in Williamson, 2000).

2.3.2.2.3.3 Vloga antocianov v rastlinah

Antioksidanti imajo pri rastlinah isto vlogo kot pri ljudeh. Rastline sintetizirajo antociane za uravnavanje oksidativnega stresa, fiziološkega stresa ter naravnih nepravil. Tvorba prostih radikalov v rastlinah je pogojena s fotosintezo. Pri preveliki izpostavljenosti svetlobi med nizkimi temperaturami ali pri izredno hitrih močnih spremembah osvetljenosti – ko rastlina nima možnosti prilagoditve – se v preveliki meri tvorijo prosti radikali, ki povzročijo oksidativni stres, ki se odraža v bledenju pigmentov in lipidni peroksidaciji (Inze in Montagu 2002).

Povečana količina prostih radikalov lahko nastane tudi zaradi onesnaženja zraka in žveplovega dioksida, ultravijolične svetlobe B (290–320 nm) ter temperaturnega šoka (Teramura in Sullivan, 1994). Proste radikale lahko sintetizira tudi sama rastlina za obrambo pred mikroorganizmi ter v mehanizmu celične smrti.

2.3.2.2.3.4 Fenolne kisline

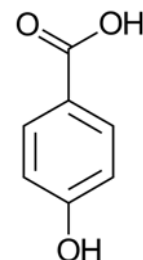
2.3.2.2.3.5 Hidroksibenzojske kisline

Osnovna struktura hidroksibenzojskih kislin je sestavljena iz C6-C1 konfiguracije, ki izvira direktno iz benzojske kisline (slika 15). Posamezni derivati se razlikujejo po substituiranih hidroksi ali metilnih skupinah na aromatskem obroču (Tomás-Barberán in sod., 2000).

Kisline te skupine, ki se največkrat pojavljajo kot sekundarni rastlinski metaboliti, so: p-hidroksibenzojska, vanilinska, siringinska in prokateuhinska kislina. Lahko so prisotne kot samostojne ali pa so konjugirane s sladkorji ali organskimi kisljinami. Lahko so tudi pripete na ligninske predele celična stene (Strack, 1997).

Poleg naštetih so ostale hidroksibenzojske kisline še: salicilna, galna (slika 16), ki je trihidroksi derivat benzojske, in elagična kislina (slika 17) (Strack 1997).

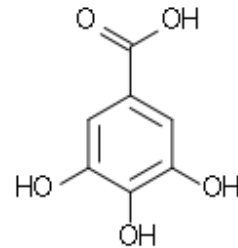
p-hidroksibenzojska kislina



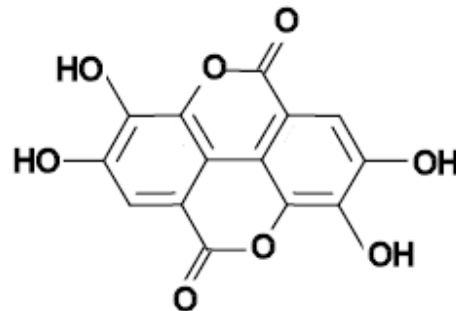
Slika 15. Strukturna formula p-hidroksibenzojske kisline (Tomás-Barberán in sod., 2000)

Figure 15. p-hydroxybenzoic acid structural formula (Tomás-Barberán in sod., 2000)

galna kislina

**Slika 16.** Strukturna formula galne kisline (Strack, 1997)**Figure 16.** Gallic acid structural formula (Strack, 1997)

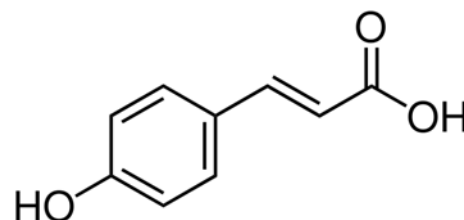
elagična kislina

**Slika 17.** Strukturna formula elagične kisline (Strack, 1997)**Figure 17.** Ellagic acid structural formula (Strack, 1997)

2.3.2.2.3.6 Hidroksicimetne kisline

Štiri najbolj razširjene kisline te skupine so: p-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska kislina. (slika 17) (Macheix in sod., 1990). Sinteza kavne, ferulne, 5-hidroksiferulne in sinapinske kisline poteka s hidroksilacijo in metiliranjem p-kumarne kisline.

p-kumarna kislina

**Slika 18.** Strukturna formula p-kumarne kisline (Macheix in sod., 1990)**Figure 18.** p-coumaric acid structural formula (Macheix in sod., 1990)

2.3.2.3 Razpad antioksidantov

Antioksidanti so zaradi svoje funkcije podvrženi razpadu. To se odraža v izgubi njihove aktivnosti, ki jo imajo kot bioaktivne komponente sadja ali funkcionalnih živil. Antociani in tudi drugi flavonoidi so zelo občutljivi na visoke pH, ki pogojujejo kislinsko hidrolizo in s tem uničenje. Zelo so občutljivi na koncentracijo kisika in s tem na prepustnost embalaže in shranjevanje proizvodov. Narejene so raziskave, ki karakterizirajo občutljivost antioksidantov na svetlobo, ki je vzrok za iniciacijo radikalskih reakcij (Turker in sod., 2004; Iversen, 1999).

Hitrost razpada antioksidantov je mogoče regulirati s kinetičnimi parametri, kot sta koncentracija polifenol oksidaz in temperatura (Torskangerpoll in Andersen, 2005; Kalt in sod., 1999; Zheng in sod., 2003). Za nekatere antioksidante, kot so antociani, so bile že narejene eksperimentalne kinetične krivulje, ki predpostavljajo, da je razpad eksponentna funkcija s karakteristično konstanto razpada, ki je odvisna od zunanjih pogojev (Wang in Xu, 2007; Lee in sod., 2002; Skrede in sod., 2000).

2.3.3 Oksidativne poškodbe tkiv in povezanost z boleznimi

V idealnih pogojih bi telo lahko nevtraliziralo vpliv prostih radikalov z lastnimi antioksidanti, vendar pa ravnotežje ni popolno, zato lahko zaradi oksidativnega stresa nastanejo poškodbe na DNK, proteinih, lipidih in manjših molekulah tudi že v normalnih fizioloških pogojih.

Oksidativni stres je definiran kot neravnotežje med prostimi radikali in antioksidativnim obrambnim sistemom.

Oksidativni stres lahko nastane zaradi:

- zmanjšane vnosa antioksidantov,
- zmanjšane aktivnosti antioksidativnega obrambnega sistema (glutation peroksidaze),
- povečanega nastajanja oksidacijskih produktov (malondialdehid).

Oksidativni stres lahko povzroči:

- dvigovanje antioksidativne odpornosti s spremembami v genski ekspresiji,
- celične poškodbe, ki vodijo do poškodb DNK,
- spremembe v celičnem vedenju in nenadzorovano rast (fibroza),
- celično smrt skozi nekrozo (otekanje/pretrganje) ali apoptozo.

Celice se lahko branijo pred manjšim oksidativnim stresom s sintezo antioksidativne zaščite, pogojeno s spremembo v genski ekspresiji. V kolikor nastane večji oksidativni stres, celica ni sposobna postaviti antioksidativne zaščite, ki bi nevtralizirala proste radikale, kar vodi do poškodb različnih tipov biomolekul, kot so DNK, proteini in lipidi. Poškodbe teh molekul lahko vodijo do nastanka različnih bolezni. Cilj poškodb je lahko različen in je odvisen od vrste celice ter RKS (De Groot in Rauen, 1998).

Nekatere bolezni so lahko povzročene zaradi poškodb DNK, proteinov ali lipidov, medtem ko je lahko pri drugih boleznih oksidativni stres posledica teh bolezni. Tako lahko RKS še povečajo poškodbe tkiva, ki so lahko podvržena infekciji, stresu, toksinom ali temperaturnim ekstremom (Halliwell in Gutteridge 1999).

Za RKS je znano, da so povezane s patogenimi procesi in nastankom različnih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, nekatere oblike raka, siva mrena, nekatere nevrodegenerativne bolezni, imunološke bolezni ter AIDS.

Najpogostejše so oksidativne poškodbe ključnih biomolekul, lahko pa prizadenejo tudi genski zapis in imunski sistem.

2.3.3.1 Kardiovaskularne bolezni

Kardiovaskularne bolezni so eden izmed glavnih vzrokov za smrt v ZDA in Evropi. Večina kardiovaskularnih defektov je posledica arterioskleroze. Za arteriosklerozo je značilna lokalna odebelitev žilnih sten, najbolj značilna za srednje velike mišične arterije. Za to bolezen so tipični trije patološki procesi: nastanek penastih celic, nastanek maščobnih prog in nastanek fibriloznih ploščic. Nastanek kapi ali miokardialnega infarkta pogojuje zožanje žilnega lumna na mestu ploščic (Ross, 1992).

Arteriosklerozne poškodbe se začnejo z imigracijo monocitov v arterijsko sredico (tunica intima), kjer jih privabijo receptorska mesta, ki jih povzročijo poškodbe arterijskega endoteliuma.

Na nastanek poškodbe lahko vpliva več vzrokov. Najpomembnejši vzroki so: visok krvni pritisk, ki povzroča pokanje žilnih sten, virusne infekcije (herpes virusi in citomegalovirusi), izpostavljenost krvno prenosljivim toksinom (ksenobiotiki iz cigaretne dima) ter povišane vrednosti metabolitov, kot so glukoza, holesterol ali homocistein (Halliwell in Gutteridge 1999).

Maščobne proge so eden prvih in najbolj običajnih znakov začetka arterioskleroze. Sestavljene so iz agregatov penastih celic v subendotelijskem prostoru žilne stene. Penaste celice vsebujejo visoke vrednosti oksidirane LDL holesterola, obdanega z makrofagi, ki so nastali iz monocitov.

In vitro laboratorijske raziskave so pokazale, da receptorji lovilnih makrofagov zaznavajo oksidirani LDL ter se nekontrolirano obložijo v lipidno oblogo. Transformirani makrofagi so prekursorji za nastanek zapornih ploščic (Westhuysen, 1997).

V nasprotju z oksidiranim je neodksidirani LDL pod skrbno homeostatsko kontrolo. Nastanek je reguliran z intracelularnim holesterolom. Med drugim je holesterol lahko oksidiran s strani prostih radikalov, ki nato vodi v proces arterioskleroze. Ta teorija na živih sistemih še ni bila potrjena, kljub temu pa je dokazano, da lipidi iz arterioskleroznih žilnih sten vsebujejo peroksidirane produkte, ki jih ne moremo najti v zdravih žilnih stenah (Pratico in sod., 1997). Pri pacientih z arteriosklerozo je dokazana povečana vsebnost oksidiranih LDL, ki reagirajo s človeškimi poškodbami žilnih sten, prisotno pa je tudi povečano število protiteles za oksidirane LDL.

2.3.3.2 Lipidna peroksidacija

Prehranske maščobe, prebavljene, absorbirane in združene v lipoproteine, so transportirane po telesu. LDL (low density lipoprotein) je bogat s holesterolom in vsebuje približno 2700 maščobnih kislin, izmed katerih je večina polinenasičenih maščobnih kislin (PUFA), ki so zelo občutljive na oksidacijo (Esterbauer, 1991). Polinenasičene maščobne kisline lahko najdemo tudi v membranah celic.

Membrane so sestavljene iz lipidnega dvosloja, ki ima hidrofilne glave obrnjene navzven, hidrofobne repe pa navznoter. Polinenasičene stranske verige vplivajo na fleksibilnost membran, ta pa se zmanjšuje z oksidacijo lipidov. Fleksibilnost je pomembna za pravilno funkcijo membrane, ki vsebuje aktivnost LDL receptorja.

Povečane koncentracije superoksidnega anionskega radikala, vodikovega peroksida in prisotnost kovinskih ionov lahko vzpostavijo pogoje za nastanek hidroksilnega radikala. Hidroksilni radikal je eden izmed najbolj reaktivnih in lahko reagira skoraj z vsako izmed biomolekul.

Hidroksilni radikal reagira z vodikom, ki mu odvzame elektron. Tako lahko dobimo različne radikale, med njimi pa je tudi lipidni radikal (L \cdot).

Ob prisotnosti kisika nastane lipidni peroksilni radikal, ki nadaljuje serijo oksidacij na ostalih lipidih. Verižna radikalska reakcija se nato nadaljuje in oksidira bližnje polinenasičene maščobne kisline v membranah ali lipoproteinih. Tako oksidiran lipoprotein je identificiran z makrofagovim receptorjem.

En sam prosti radikal lahko povzroči verižno reakcijo, ki povzroči oksidacijo več stotih molekul PUFA, ki spremenijo integriteto lipidnih membran (Yoshikawa in sod., 1997). Druga pot oksidiranih maščobnih kislin je formacija cikličnih peroksidov, ki so nato oksidirani do malondialdehidov, F2-isoprostanov ali drugih oksidiranih produktov (Roberts in Morrow, 2000).

2.3.3.3 Rakasta obolenja

Sum, da je prehrana povezana z nastankom rakastih obolenj je prisoten že dolgo, zato so bile že zelo zgodaj narejene študije o varovalnih lastnostih hrane pred nastankom raka. Pri tem se je izkazalo, da so nekateri mikronutrienti povezani s preprečitvijo nastanka nekaterih rakastih obolenj. Med te mikronutriente lahko uvrščamo tudi antioksidante, kot so: β -karoten, vitamin E in vitamin C.

Predvideva se, da je 88–90 % raka pri človeku pogojenega z zunanjimi vplivi, od tega kar 35 % predstavlja prehrana. Raziskave kažejo na to, da imajo prosti radikali vpliv na začetek in razvoj bolezni. Začetki in napredovanje tumorjev so pogojeni s spremembami DNK na način nepravilne ekspresije genov ali poškodb na samem DNK. Ker so nastanek tumorjev in poškodbe DNK povezane, je verjetno, da je vsaka spojina, ki je sposobna spreminjanja DNK, tudi že kancerogena. Prosti radikali se uvrščajo v to kategorijo.

Hidroksi radikal poškoduje DNK tako, da povzroči nastanek modificiranih purinov in pirimidinov. Predvideva se, da se v zdravem DNK oksidirane baze ponovijo v razmerju 1 : 106, da je več kot število poškodovanih baz pri izpostavitvi DNK določenemu kancerogenemu agensu. To nakazuje, da endogene poškodbe DNK s prostimi radikali pomembno prispevajo k razvoju starostno pogojenega raka (Loft in Poulsen, 1996). Pomemben faktor za razvoj raka so mutacije na p53 tumor-zavirajočem genu (transkripcijski faktor, ki blokira delitev celic). Če je gen p53 poškodovan, lahko celice začnejo delitev s poškodovano DNK. Poškodbam na genu p53 pripisujejo vzrok za nastanek raka v 50 %, za nastanek raka na debelem črevesu v 75 %, za razvoj kožnega raka pa kar 90 %. Oksidacija lahko povzroči genu p53 poškodbe na citozinu, gvaninu, adeninu in timinu.

Najbolj karakterističen produkt oksidacije DNK je 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), ki je upoštevan kot biološki marker oksidativnega stresa.

Poleg same oksidacije DNK lahko prosti radikali vplivajo na oksidacijo lipidov, ki so sestavni del reparativnih encimov DNK, kar lahko vodi tudi do mutacij DNK.

Narejena je bila študija vpliva antioksidantov na razvoj raka pri ljudeh, v kateri so bili ljudje podvrženi dieti z visoko vsebnostjo sadja in zelenjave. Pri tem se je nivo plazemskih karotenoidov, α - in β -karotenov ter luteinov občutno povečal. Nivo tokoferola je ostal enak. Pri tem je nivo 8-OHdG v urinu in limfocitih pospešeno padel. Koncentracija 8-EPG (prostanoidni epimer in marker lipidne peroksidacije) v urinu je padla za 33 %. Sprememba koncentracije 8-EPG v urinu je bila povezana s spremembo 8-OHdG, kar podpira koncept lipidne peroksidacije in poškodb DNK, ki so povezane z oksidativnim stresom, reduciranim z uživanjem sadja in zelenjave (Thompson in sod., 1999).

2.3.3.4 Sladkorna bolezen

Ljudje, ki imajo diabetes, imajo tudi večjo možnost nastanka arterioskleroze, ki jo lahko delno razložimo z oksidacijo LDL. Za diabetične bolnike je značilno, da imajo nižje vrednosti C-vitamina v krvi od normalnih. Diabetični bolniki imajo tudi višje koncentracije markerjev oksidacije v krvi (F2-izoprostani) (Mezzetti in sod., 2000).

Zapleti pri diabetesu so mnogokrat povezani s poškodbami DNK, ki so posledica oksidativnega stresa, kjer je pri bolnikih z diabetesom tipa I razvidna ista koncentracija oksidiranih pirimidinov.

Glukolizacija proteinov vodi do produktov AGE (advanced glycation end products), ki so znani kot dober izvor prostih radikalov in so močno povezani s komplikacijami pri diabetesu (Sautue-Gracia in sod., 1997)

Iz teh glukoznih produktov se lahko direktno cepita superoksidni anionski radikal in vodikov peroksid. Aktivirajo pa tudi fagocite in zmanjšajo koncentracijo glutaciona (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3.3.5 Nevrološke bolezni: Alzheimerjeva bolezen (AD)

Hipoteza, ki povezuje proste radikale z boleznijo, razlaga heterogeno izražanje Alzheimerjeve bolezni in dejstvo, da je staranje faktor tveganja za razvoj te bolezni (Christen, 2000). Za to hipotezo je več vzrokov.

Nevroni so izredno občutljivi na napad prostih radikalov, saj je njihova vsebnost glutaciona zelo nizka, imajo visoke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin ter njihov metabolizem potrebuje za svoje delovanje visoke vsebnosti kisika

Za možgane, ki jih prizadene AD, so značilni tipični produkti poškodb oksidativnega stresa:

- v parietalnem korteksu je prisoten oksidiran DNK,
- prisotna je le lipidna peroksidacija in njeni produkti,
- v območjih, ki kažejo največje patofiziološke spremembe, so prisotni oksidirani proteini.

V možganih, ki jih prizadene AD, so prisotni produkti oksidacije ter encimi, kot so: malondialdehid, peroksinitrit, karbonili ter AGE, superoksidne dismutaze in hem oksigenaze. Dva markerja povezujeta AD z AGE: dolgi β -amiloidni peptidi ter nevrofibrilarni vozlički, ki tvorijo senilne otočke. AGE receptor je isti kot β -amiloidni receptor.

V možganih je mnogo kovin, ki so sposobne katalize radikalov (železo).

Koncentracija železa je v možganih, ki jih je prizadela AD, večja kot v zdravih možganih.

V možganih z AD boleznijo je manjša koncentracija bakra, ki ga vsebujejo encimi, ki zavirajo oksidativni stres (citokrome –c oksidaze).

Cink je potreben za formacijo amiloida (znan toksični efekt na nevrone) v ljudeh (Christen, 2000).

2.3.3.6 Bolezni imunskega sistema

Oksidacija in tvorba prostih radikalov sta ključnega pomena za pravilno delovanje imunske obrambe. Prosti radikali so vitalnega pomena za delovanje antigenov in delitve celice, kljub temu pa prevelika sinteza prostih radikalov lahko privede do slabšanja imunske obrambe. Oksidativni stres lahko poškoduje limfocite s peroksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin ter z oksidacijo plazemske DNK. Izguba fleksibilnosti limfocitnih membran se odraža na zmanjšanem imunološkem odzivu (Douziech in sod., 2002).

Antioksidanti lahko izboljšajo delovanje imunskega sistema s kontrolo produkcije prostih radikalov v celicah. Vitamin E, ki ga nevtróciti absorbirajo pred napadom ekstracelularnih patogenov s prostimi radikali, varuje nevtrócit pred temi istimi prostimi radikali. Odraz slabšanja imunske zaščite so revmatidni artritis in črevesna vnetja.

Narejena je bila študija na tridesetih starejših pacientih, ki so bili hospitalizirani več kot tri mesece. V raziskavi so jim dali kombinacijo vitaminov A, C in E ali placebo. Odziv celičnega imunskega sistema je bil merjen pred in po končani terapiji. Izboljšanje je bilo vidno samo pri skupini, ki je jemala vitamine (Douziech in sod., 2002).

2.3.3.7 AIDS

Izboljšanje imunskega sistema je ključno tudi za AIDS, kjer padec CD4+ limfocitov igra ključno vlogo pri napredovanju od infekcije HIV k bolezenskim znakom. Pacienti z AIDS-om imajo nižje vrednosti glutaciona ter vitamina E, kar pripomore k večji podvrženosti oksidativnemu stresu.

Vitamin tudi pripomore k višji koncentraciji CD4+ limfocitov, kar upočasni razvoj bolezni (Abrams in sod., 1993). Poleg tega so v krvi bolnikov z AIDS-om manjše koncentracije ostalih antioksidantov ter kovin.

2.3.3.8 Starostne bolezni vida

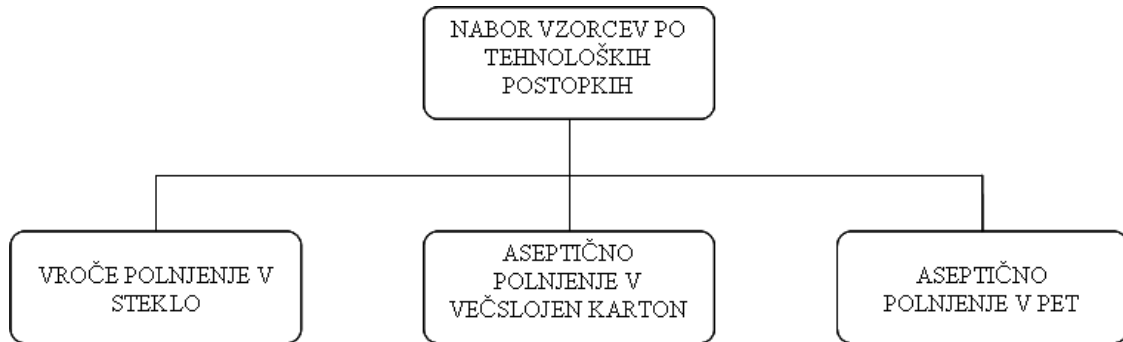
Z delovanjem prostih radikalov lahko povežemo dve različni bolezni vida: sivo mreno in starostno očesno pegavost (AMD). Starostna siva mrena je bolezen, ki prizadene očesne leče in zmanjša njihovo funkcijo. Leče vsebujejo izrazito dolgo živeče proteine, ki mnogokrat kažejo oksidativne poškodbe, saj so ves čas izpostavljene kisiku in UV-sevanju, ki sta odgovorna za nastanek RKS s tem, ko reagirata s proteini v lečah. Proteini nato tvorijo agregate in percipitate ter izgubljajo svojo funkcijo, zato lahko s povečanim vnosom antioksidantov zaustavimo razvoj bolezni (Seddon in sod., 1994b).

AMD je eden glavnih vzrokov za slabšanje vida v zahodnem svetu. AMD poškoduje del roženice, ki ima funkcijsko največjo vizualno aktivnost. Pigment, ki nastane (rumena pika), blokira svetlobo pri vходу v oko. Glavna pigmenta sta lutein in zeaksantin. Roženico naj bi obvarovala pred fotooksidacijo, vendar s tem povzročita slabšanje njene funkcije. (Seddon in sod., 1994a).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZASNOVA POSKUSOV

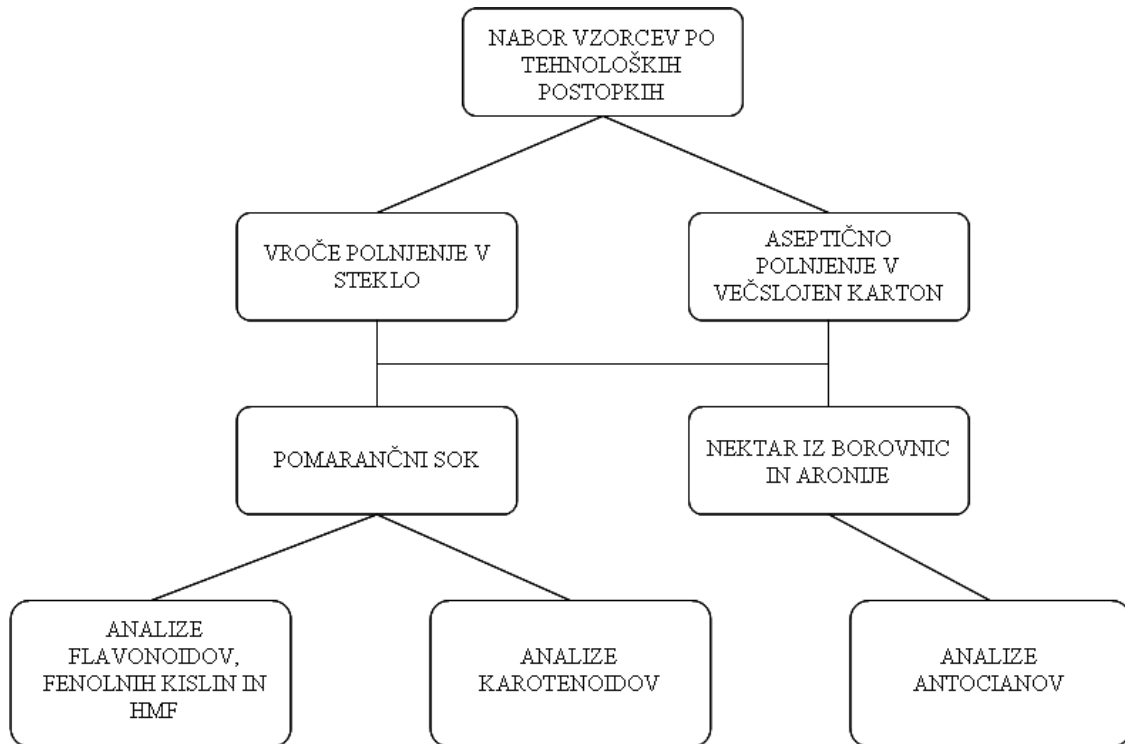
Zasnova nabora vzorcev je bila prirejena testiranju različnih tehnoloških postopkov glede na parametre, ki se spreminjajo s časom. Tako so bili testirani proizvodi izdelani po treh različnih tehnoloških postopkih, prikazanih na sliki 19.



Slika 19. Razdelitev nabora vzorcev po različnih tehnoloških postopkih procesiranja, polnjenja in pakiranja sokov in nektarjev

Figure 19. Distribution of analyzed samples by different technological procedures for juices and nectar processing, filling and packaging

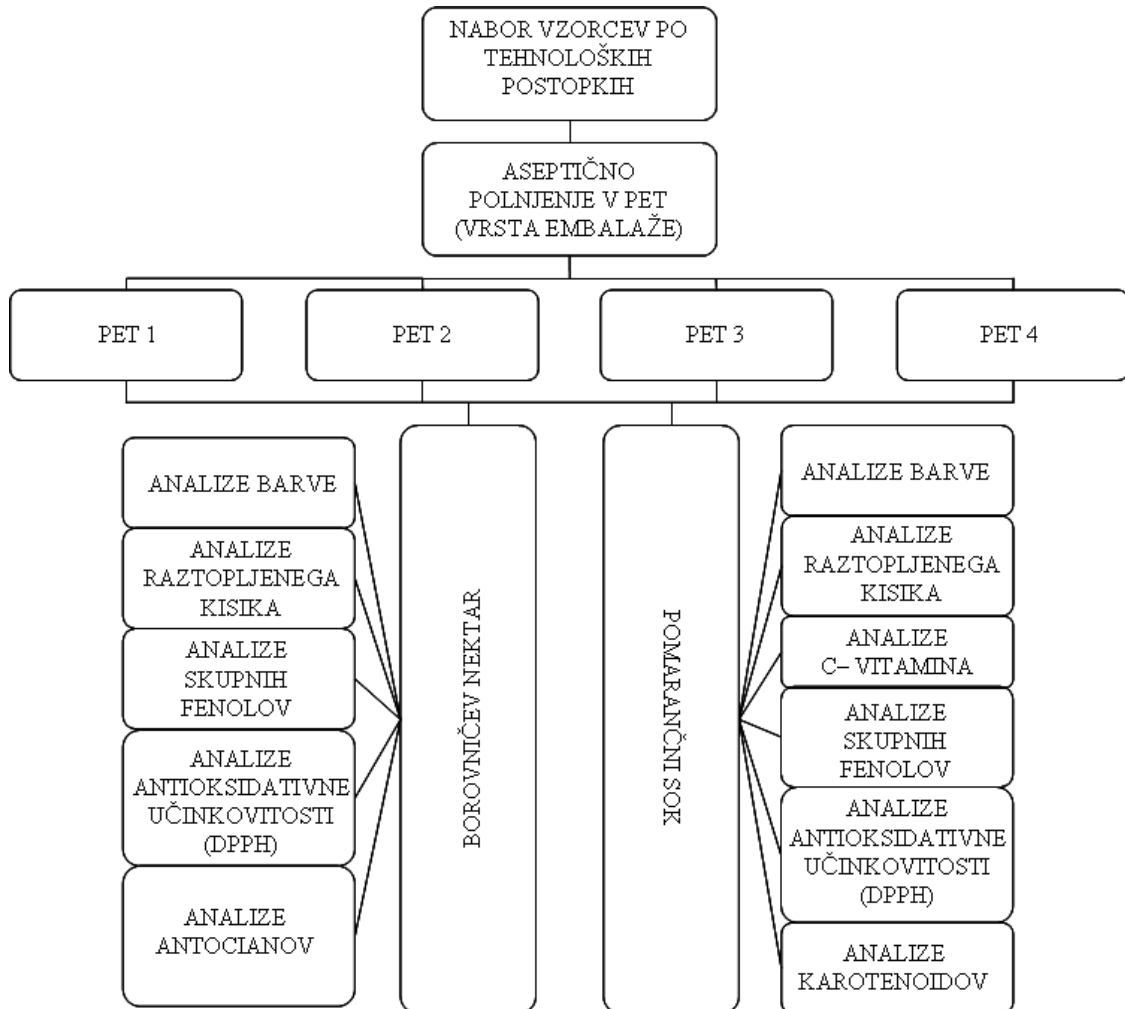
Prvi del je bil namenjen testiranju dveh istih proizvodov, napolnjenih po dveh različnih tehnoloških postopkih v različno embalažo.



Slika 20. Shema zasnove testiranja dveh proizvodov, napoljenih v dve različni embalaži

Figure 20. Flowchart of two technological procedures for two different juice products

V drugem delu testiranja sta bila izbrana dva proizvoda, ki sta se po istem tehnološkem postopku napolnila v 4 različne embalaže.



Slika 21. Shema nabora vzorcev za testiranje dveh proizvodov, napoljenih v štiri različne embalaže po istem tehnološkem postopku

Figure 21. Flowchart of sample distribution for two different juice products testing filled in four different packaging

V obeh delih testiranja so bile izbrane analize, ki pomenijo parametre kakovosti za sokove in nektarje s poudarkom na različnih fenolih, nekaterih karotenoidih in ostalih antioksidantih.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Priprava vzorcev za aseptično polnjenje v kartonsko embalažo in vroče polnjenje v stekleno embalažo

Sestava, procesiranje, polnjenje in pakiranje vzorcev so bili izvedeni v proizvodnih prostorih podjetja Fructal d. d., Ajdovščina.

3.2.1.1 Sestava nektarja iz borovnic in aronije

Za sestavo nektarja po recepturi Fructal d. d., Ajdovščina, so bili uporabljeni voda, citronska kislina, sladkor (saharoza), borovničev (*Vaccinium angustifolium*) zgoščeni sok (65 % brix; 5,5 % skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina) in aronijin (*Aronia melanocarpa*) zgoščeni sok (65 % brix; 4,0 % skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina). Korekcije so bile opravljene do 35 % sadnega deleža (24 % borovničevega soka in 11 % aronijinega soka). Vsebnost raztopljenih suhih snovi je bila 11,6 % brix, vsebnost skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina, pa 0,48 %. Proizvod se je premešal do homogenosti v 14400-litrski cisterni.

3.2.1.2 Sestava pomarančnega soka

Za sestavo pomarančnega soka s 100-odstotnim sadnim deležem (11,4 % brix; 0,78 % skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina) sta bila uporabljena predhodno mikrobiološko preverjen pomarančni (*Citrus sinensis*) zgoščeni sok (66 % brix; 4,4 % kislin, izraženih kot citronska kislina) in voda. Proizvod se je premešal do homogenosti v 14400-litrski cisterni.

3.2.1.3 Procesiranje

Borovničev nektar se je filtriral na ploščnih filtrih. Ker je pomarančni sok motni sok, se ni filtriral, pač pa je bil podvržen postopku homogenizacije (90–110 bar). Oba proizvoda sta se deaerirala v industrijskem deaeratorju do koncentracije 0,2 mg/l raztopljenega kisika ter pasterizirala na temperaturi med 93 in 97 °C 30 s. Po pasterizaciji in hlajenju se je proizvod shranil v sterilnem tanku, z izjemo pri tehnologiji vročega polnjenja, kjer je napredoval direktno na polnilec (Tetrapak, Švedska).

3.2.1.4 Pakiranje

Pakiranje je bilo izvedeno na dveh različnih polnilnih linijah. Za aseptično polnjenje v kartonsko embalažo se je uporabila Tetrapakova (Švedska) polnilna in pakirna linija s

pakirnim strojem TBA 21 v embalažo z volumnom 200 ml. Pri polnjenju proizvoda v steklo sta bili uporabljeni oprema in tehnologija vročega polnjenja proizvajalca KHS (Nemčija). Volumen steklenic je bil 200 ml. Med redno proizvodnjo so bili vzorčeni proizvodi za teste stabilnosti.

3.2.1.5 Pakirni materiali

Za vsak proizvod sta bila uporabljena dva pakirna materiala:

- temno modra 200-mililitrska steklenička, zaprta s kovinskim pokrovčkom s tesnilno maso (twist off cap),
- standardna svetlobno neprepustna večslojna kartonska folija proizvajalca Tetrapak z volumnom 200 ml.

3.2.1.6 Hranjenje in vzorčevanje

Vzorci so bili hranjeni v temi v termostatu na konstantni temperaturi 30 °C. Po različnih časovnih obdobjih, merjenih od polnitve naprej, so bili vzeti iz termostata in zamrznjeni na -20 °C. Vzorci so bili takoj po odtajevanju analizirani.

3.2.2 Priprava vzorcev za aseptično polnjenje v PET

Sestava, procesiranje, polnjenje in pakiranje vzorcev so bili izvedeni v testnem aseptičnem centru podjetja Sidel Group na lokaciji Octaville sur Mer, Francija. Na istem mestu je bilo izvedeno tudi napihovanje plastenk.

3.2.2.1 Sestava borovnica

Borovničev nektar je bil narejen iz borovničevega zgoščenega soka (*Vaccinium angustifolium*) po recepturi Fructala d. d. Nektar je vseboval 40 % sadnega deleža. Zgoščeni sok je bil zmešan z vodo, sladkorjem (saharozo) in citronsko kislino. Vsebnost topnih suhih snovi je bila 12,3 % brix, vsebnost skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina, pa 0,52 %. Po sestavi sta sledila mešanje in korekcija na izbrane vrednosti.

3.2.2.2 Sestava pomaranča

Pomarančni sok je bil sestavljen iz pomarančnega zgoščenega soka (*Citrus sinensis*) in vode (100-odstotni sadni delež) po recepturi Fructala d. d., Ajdovščina. Vsebnost topnih suhih snovi je bila 11,4 % brix, vsebnost skupnih kislin, izraženih kot citronska kislina, pa 0,78 %. Po sestavi sta sledila mešanje in korekcija na izbrane vrednosti.

3.2.2.3 Procesiranje

Sestavi sta sledili deaeracija do predvidene vsebnosti raztopljenega kisika, 0,2 mg/l, in pasterizacija. Temperatura pasterizacije je bila 93–97 °C, čas pasterizacije pa 30 s. Po pasterizaciji se je proizvod ohladil na sobno temperaturo v aseptičnem tanku.

3.2.2.4 Pakirni materiali

Za pakiranje so bili izbrani karakteristični PET materiali, komercialno dostopni na evropskem in ameriškem trgu. Plastenke so bile napihnjene na pihalki SBO proizvajalca Sidel, Francija.

- PET 1: Standardna enoslojna PET plastenka, ki je služila kot referenčni material, zaprta je bila z HDPE pokrovčkom brez dodatne zaščite proti oksidaciji. Teža plastenke je bila 41 g.
- PET 2: PET plastenka z vmešanim polimernim lovilec kisika. Lovilec kisika je bil porazdeljen enakomerno čez celoten PET material. Plastenka je bila zaprta z HDPE pokrovčkom brez dodatne zaščite proti oksidaciji. Teža plastenke je bila 41 g.
- PET 3: Petslojna plastenka, značilna za ameriški trg, z maso 36 g, zaprta s pokrovčkom z dodatno zaščito proti oksidaciji.
- PET 4: Trislojna plastenka, značilna za evropski trg, z maso 39 g, zaprta s pokrovčkom brez dodatne zaščite proti oksidaciji.

3.2.2.5 Polnjenje in zapiranje

Polnjenje je potekalo v pilotni aseptični sobi. Vse operacije so potekale pod laminarnim tokom. Pred polnjenjem je bil ves embalažni material opran s peroksi očetno kislino in izpran s sterilno vodo. Polnjenje je bilo izvedeno na pilotni napravi z eno polnilno glavo. Pred zapiranjem je bila v plastenko aplicirana kapljica tekočega dušika, ki je nadomestila kisikovo atmosfero nad proizvodom. Zapiranje je bilo izvedeno ročno. Napolnjenih je bilo 150 kosov vsake testirane verzije.

3.2.2.6 Skladiščenje in vzorčenje

Vzorci so bili hranjeni v skladišču podjetja Fructal d. d. Temperatura hranjenja je variirala med 4 in 20 °C. Vzorci so bili hranjeni v temi. Vzorčenje za analize kisika in barve se je izvajalo mesečno. Ostali parametri so bili analizirani štirikrat med predvidenim rokom uporabnosti. Po vzorčenju so se plastenke shranile na temperaturi –80 °C, dokler proizvodi niso bili analizirani glede na predvidene parametre.

3.3 METODE

3.3.1 Določanje antocianov

Ker so antociani vodotopni rastlinski pigmenti, imajo karakterističen absorpcijski spekter in jih lahko analiziramo tako spektrofotometrično v vidnem delu kot tudi z masnim detektorjem. Spektrofotometrično imajo absorpcijski maksimum med 520 in 546 nm. Ker so vodotopni, posebna priprava vzorcev z izjemo filtracije in redčenja ni potrebna. Posamezni antociani se na koloni ločijo glede na njihovo polarnost, ki je v največji meri odvisna od aglikonskega dela. Večja polarnost (več OH skupin) pomeni krajši retenzijski čas eluiranja iz kolone pri reverzni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti. Uporabljena je bila metoda po Herediu in sod. (1998). Metoda je bila modificirana v Laboratoriju za prehrabeno kemijo, Kemijski inštitut, Slovenija.

Ker sama razlika v polarnosti med mobilno in stacionarno fazo še ni bila dovolj za ustrezno ločbo vseh antocianov, smo se pri razvoju same ločbe pri obeh metodah osredotočili na gradientno tehniko mešanja mobilnih faz z različnimi polarnostmi.

3.3.1.1 HPLC-MS – tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo

Metoda za identifikacijo antocianov je bila razvita na kombinaciji HPLC povezave z masnim spektrometrom. Ta sistem omogoča identifikacijo posameznih karakterističnih molskih mas glede na retenzijski čas elucije posameznih antocianov. Ker imajo nekateri antociani iste molske mase, so bile potrebne tudi primerjalne analize z antocianinskimi standardi in navzkrižno preverjanje s predhodno objavljenimi viri identifikacije (Zheng in sod., 2003).

Kemikalije:

- mravljična kislina (Kemika, Hrvaška),
- voda (deionizirana),
- metanol (Merck, Nemčija).

Standardi:

- malvidin 3-glukozid,
- cianidin 3-glukozid,
- peonidin 3-glukozid,
- petunidin 3-glukozid,
- delfinidin 3-glukozid.

Standardi so bili nabavljeni pri podjetju Polyphenol laboratories, Norveška.

Raztopine:

- malvidin 3-glukozid v metanolu (c = 250 µg/ml),
- cianidin 3-glukozid v metanolu (c = 250 µg/ml),
- peonidin 3-glukozid v metanolu (c = 250 µg/ml),
- petunidin 3-glukozid v metanolu (c = 250 µg/ml),
- delphinidin 3-glukozid v metanolu (c = 250 µg/ml),

Aparature:

- analitska tehtnica (Sartorius A 2005),
- HPLC sistem Thermo electron corporation (ZDA):
 - gradientna črpalka,
 - avtomatski podajalnik vzorcev z možnostjo termostatiranja,
 - kolona SUPERSPHER 100 RP, 18,5 µm, 250 × 4.6 mm (Merck, Nemčija);
- masni spektrometer LCQTM ion trap, Finnigan, MAT,
- HPLC-MS vmesnik: ESI ionizator.

Pogoji kromatografske ločbe:

- temperatura termostatiranja kolone je bila 30 °C,
- vzorci so bili analizirani pri kontrolirani sobni temperaturi,
- volumen injiciranja 10 µl,
- pretok mobilne faze 0,8 ml/min,
- mobilni fazi:
 - mobilna faza A: 10-odstotna mravljična kislina v vodi (v/v),
 - mobilna faza B: metanol: voda: mravljična kislina = 45 : 45 : 10 (v/v/v);
- gradient mobilne faze (prikazan v preglednici 5).

Preglednica 5. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvalitativno določanje antocianov
Table 5. Changing the volume of mobile phase B by time for qualitative anthocyanin determination method

Čas t [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	78	22
23	40	60
40	40	60

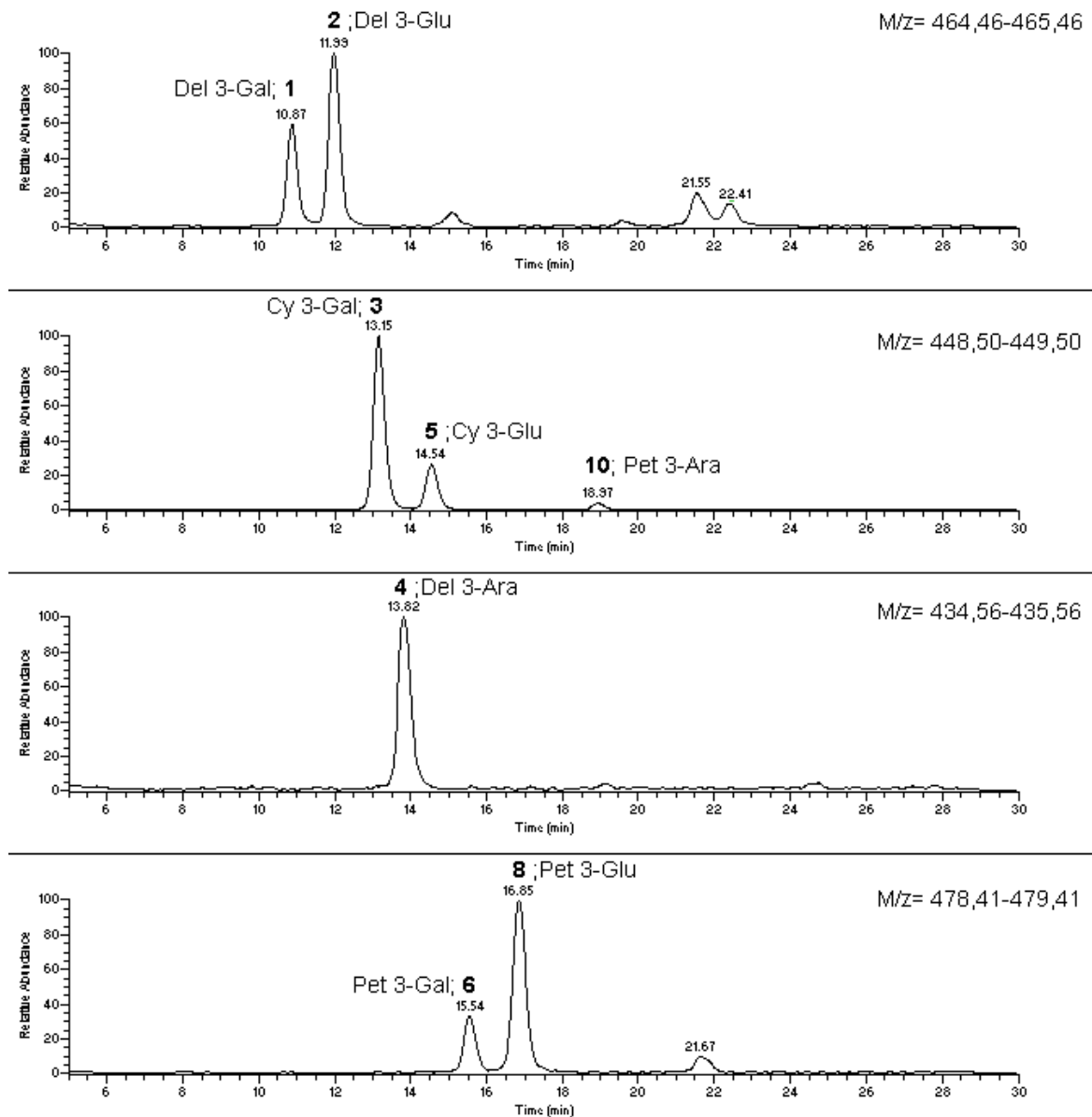
Pogoji ESI ionizacije:

- m/z razmerje: 250–700,
- polarnost: pozitivna,
- napetost razelektritve: 4,5 kV,
- temperatura kapilare: 250 °C,
- pritisk zaščitnega plina: 5,52 bar,
- pretok pomožnega plina: 6,67 l/min.

Priprava vzorcev za analizo

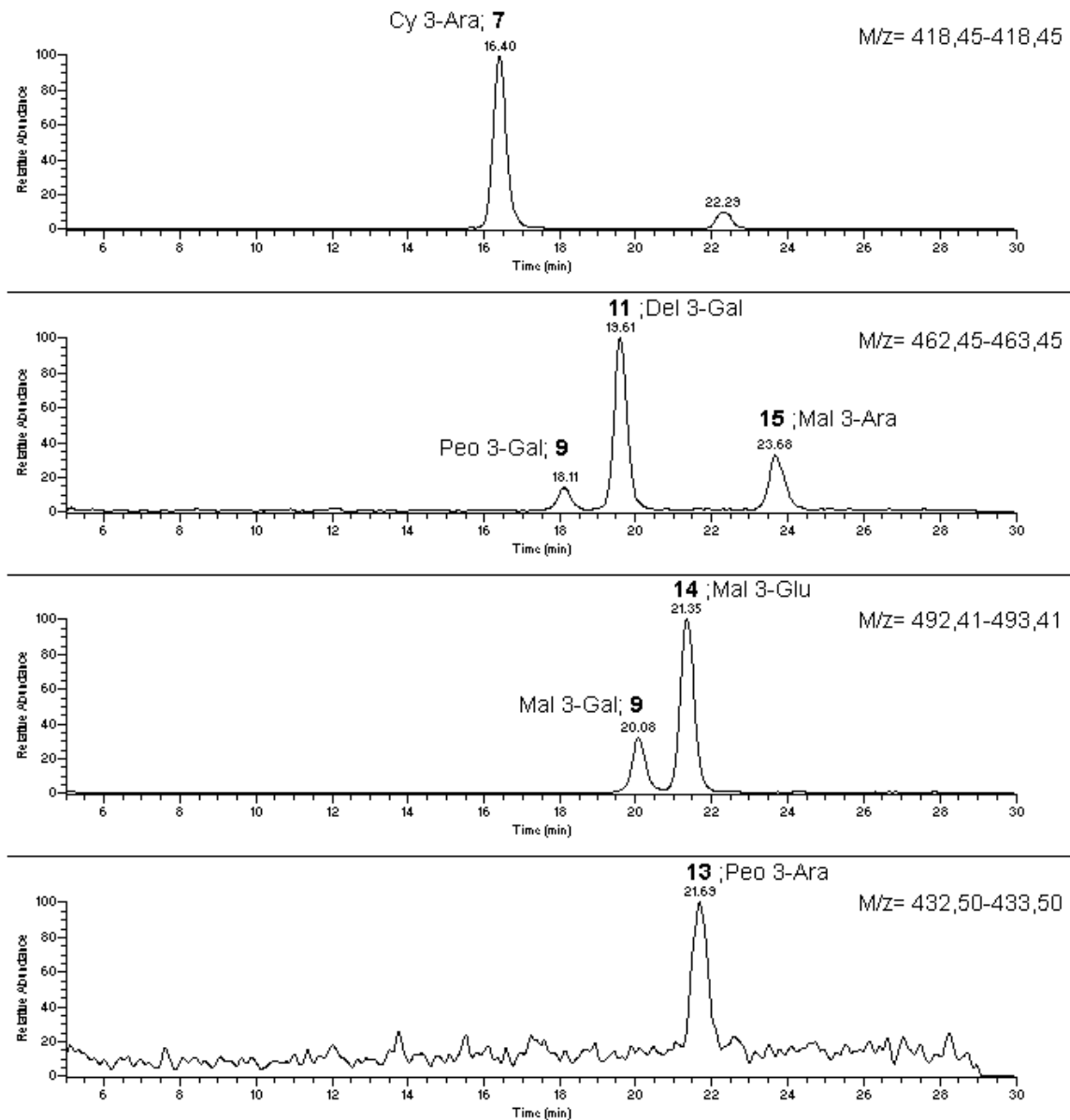
Vzorci so se pred analizo filtrirali skozi 0,45 µm PVDF filtre (Millipore, ZDA) v HPLC vialo. Standardi so se ustrezno razredčili od opisanih koncentracij.

Na osnovi standardov, karakterističnega m/z razmerja in omenjenih virov je bila opravljena identifikacija posameznih antocianov. Kromatogram standardov je v prilogah, kromatogram vzorcev z identifikacijo pa na slikah 22a in 22b.



Slika 22a. HPLC-MS kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo in m/z vrednostmi

Figure 22a. HPLC-MS chromatogram of anthocyanins in blueberry-aronia nectar with identification and characteristic m/z values



Slika 22b. HPLC-MS kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo in m/z vrednostmi

Figure 22b. HPLC-MS chromatogram of anthocyanins in blueberry-aronia nectar with identification and characteristic m/z values

3.3.1.2 HPLC-Vis – tekočinska kromatografija s spektroskopijo v vidnem delu

Kromatografska tehnika z masno spektroskopijo je za identifikacijo spojin primernejša, saj je zaradi sistema detekcije precej težje zadovoljiti statistično natančnost metode. Za kvantitativno analizo je bila tako razvita metoda HPLC-Vis metoda, ki zadostuje tem parametrom. Zaradi nadaljnjega kinetičnega modeliranja razpada antocianov so bila potrebna izredno majhna nihanja v koncentracijah posameznih antocianov med paralelkami.

Metoda temelji na gradientnem ločevanju posameznih spojin z detekcijo v vidnem delu spektra. To je omogočeno zato, ker imajo posamezni antociani karakteristični absorpcijski maksimum pri določenih valovnih dolžinah. Metoda je bila razvita v Laboratoriju za prehransko kemijo na Kemijskem inštitutu in predhodno predstavljena (Trošt in sod., 2008).

Kemikalije:

- acetonitril (Merck, Nemčija),
- voda (deionizirana),
- perklorna kislina (Kemika, Hrvaška).

Standardi:

- malvidin 3-glukozid,
- cianidin 3-glukozid,
- peonidin 3-glukozid,
- petunidin 3-glukozid,
- delfinidin 3-glukozid.

Standardi so bili nabavljeni pri podjetju Polyphenol laboratories, Norveška.

Raztopine:

- malvidin 3-glukozid v mobilni fazi A (koncentracije v prilogah),
- cianidin 3-glukozid v mobilni fazi A (koncentracije v prilogah),
- peonidin 3-glukozid v mobilni fazi A (koncentracije v prilogah),
- petunidin 3-glukozid v mobilni fazi A (koncentracije v prilogah),
- delfinidin 3-glukozid v mobilni fazi A (koncentracije v prilogah).

Aparature:

- HPLC sistem TSP (Thermo separation products, ZDA):
 - gradientna črpalka: Constametric 4100,
 - detektor: Spectromonitor 3200,
 - avtomatski podajalnik vzorcev: AS 3000,
 - program za obdelavo podatkov: TSP, verzija 4,1;
- kolona: Nova-Pak C18, 3,9 × 150 mm (Waters, ZDA).

Pogoji kromatografske ločbe:

- valovna dolžina detekcije: 530 nm,
- analize so se izvajale pri kontrolirani sobni temperaturi (cca. 22 °C).
- Volumen injiciranja: 20 µl,
- pretok mobilne faze: 1,5 ml/min,
- mobilni fazi:
 - mobilna faza A: acetonitril: voda = 5 : 95 (v/v); mobilna faza je bila prirejena na pH = 1,3 s perklorno kislino,
 - mobilna faza B: acetonitril: voda = 60 : 40 (v/v); mobilna faza je bila prirejena na pH = 1,3 s perklorno kislino;
- gradient mobilne faze (glej preglednico 6).

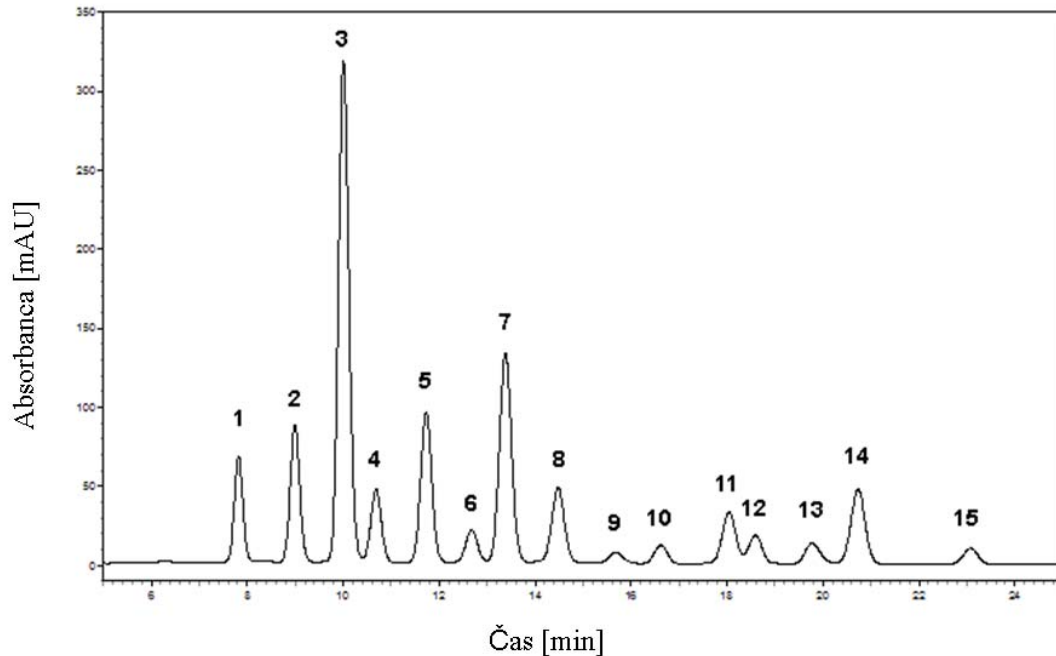
Preglednica 6. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje antocianov
Table 6. Changing the volume of mobile phase B by time for qualitative anthocyanin determination method

Čas t [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	95	5
5	90	10
25	80	20
38	75	25
45	0	100
50	0	100

Priprava vzorcev

Vzorci so se pred analizo filtrirali skozi 0,45 µm PVDF filtre (Millipore, ZDA) v HPLC vialo.

Na sliki 23 je viden tipičen kromatogram antocianskega profila za nektar iz borovnic in aronije, na sliki 24 pa kromatogram borovničevega nektarja.



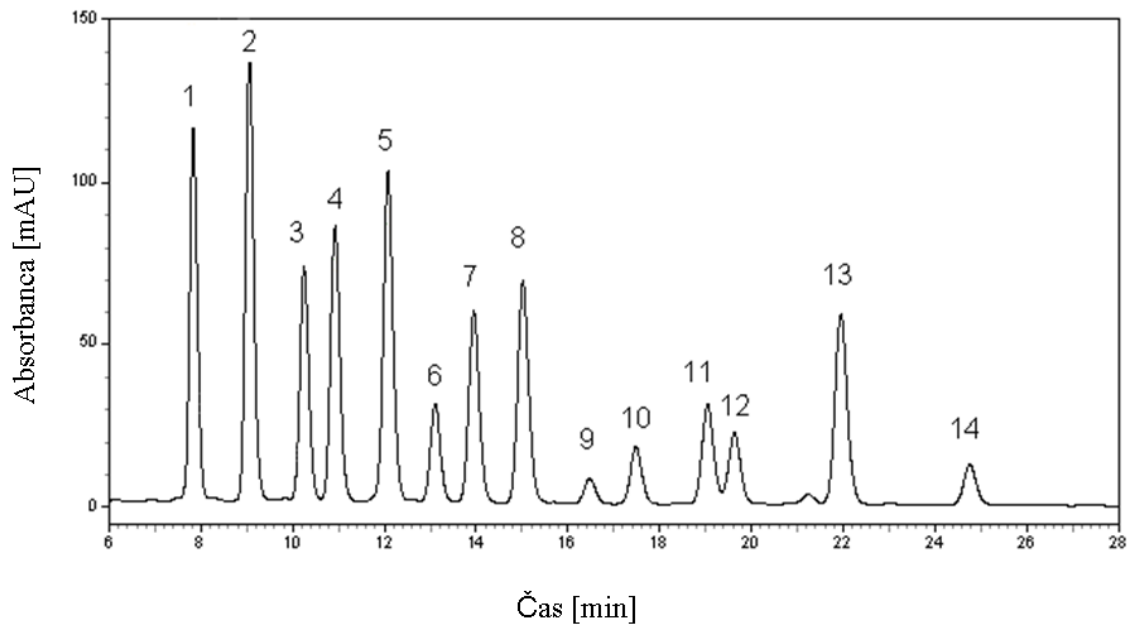
1 – Del 3-Gal, delphinidin 3-galaktozid; 2 – Del 3-Glu, delphinidin 3-glukozid; 3 – Cy 3-Gal, cianidin 3-galaktozid; 4 – Del 3-Ara, delphinidin 3-arabinozid; 5 – Cy 3-Glu, cianidin 3-glukozid; 6 – Pet 3-Gal, petunidin galaktozid; 7 – Cy 3-Ara, cianidin 3-arabinozid; 8 – Pet 3-Glu, petunidin 3-glukozid; 9 – Peo 3-Gal, peonidin 3-galaktozid; 10 – Pet 3-Ara, petunidin 3-arabinozid; 11 – Peo 3-Glu, peonidin 3-glukozid; 12 – Mal 3-Gal, malvidin 3-galaktozid; 13 – Peo 3-Ara + nn1, peonidin 3-arabinozid + nn1; 14 – Mal 3-Glu, malvidin 3-glukozid; 15 – Mal 3-Ara, malvidin 3-arabinozid

Slika 23. HPLC-Vis kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic in aronije z identifikacijo za kvantitativno določanje antocianov

Figure 23. HPLC-Vis chromatogram of anthocyanins in blueberry-aronia nectar with identification for quantitative anthocyanin determination

Vrednotenje:

Glede na izvedene identifikacije z masnim spektrometrom in primerjave s standardi, ki so bili na razpolago, se je primerjalo izmerjene površine posameznih vrhov s površinami iz umeritvenih krivulj. Za kvantifikacijo so se izdelale umeritvene krivulje, ki so predstavljene v prilogah. Ker na trgu ni dostopnih standardov aglikonov, glikozidiranih z galaktozo in arabinozo, se je za izračun koncentracij privzelo ustrezen glukozidirani aglikon.



1 – Del 3-Gal, delphinidin 3-galaktosid; 2 – Del 3-Glu, delphinidin 3-glukozid; 3 – Cy 3-Gal, cianidin 3-galaktosid; 4 – Del 3-Ara, delphinidin 3-arabinozid; 5 – Cy 3-Glu, cianidin 3-glukozid; 6 – Pet 3-Gal, petunidin galaktosid; 7 – Cy 3-Ara, cianidin 3-arabinozid; 8 – Pet 3-Glu, petunidin 3-glukozid; 9 – Peo 3-Gal, peonidin 3-galaktosid; 10 – Pet 3-Ara, petunidin 3-arabinozid; 11 – Peo 3-Glu, peonidin 3-glukozid; 12 – Mal 3-Gal, malvidin 3-galaktosid; 13 – Mal 3-Glu, malvidin 3-glukozid; 14 – Mal 3-Ara, malvidin 3-arabinozid

Slika 24. HPLC-Vis kromatogram antocianov v nektarju iz borovnic z identifikacijo za kvantitativno določanje antocianov

Figure 24. HPLC-Vis chromatogram of anthocyanins in blueberry nectar with identification for quantitative anthocyanin determination

3.3.2 Določanje polifenolov, fenolnih kislin in 5-hidroksimetil furfurala (HMF)

Za razliko od antocianov ostali fenoli nimajo absorbcije v vidnem delu spektra in je zato detekcija prilagojena na UV del spektra. Ker so sokovi kompleksen sistem spojin, v tem delu spektra absorbira veliko število molekul, je izbira kolone, mobilne faze in gradienta pomembna za učinkovito ločbo zelenih spojin.

Metoda temelji na predhodnih delih Schieberja in sod. (2001) ter L. Milivojeviča (2007) in je bila z namenom prilagoditve drugi vrsti vzorcev spremenjena v Laboratoriju za prehransko kemijo na Kemijskem inštitutu, Slovenija.

Kemikalije:

- acetonitril (Merck, Nemčija),
- voda (deionizirana),
- očetna kislina (Kemika, Hrvaška).

Standardi:

- p-kumarna kislina,
- ferulna kislina,
- eriocitrin,
- narirutin,
- hesperidin,
- 5 – HMF.

Standardi fenolnih kislin in flavononov so bili kupljeni pri podjetju Chemos GmbH (Nemčija), standard 5 – HMF je bil kupljen pri podjetju Sigma, Nemčija.

Raztopine:

- p-kumarna kislina v mobilni fazi A,
- ferulna kislina v mobilni fazi A,
- eriocitrin v mobilni fazi A,
- narirutin v mobilni fazi A,
- hesperidin v mobilni fazi A,
- 5 – HMF v mobilni fazi A.

Standardi so bili raztopljeni v koncentracijskem območju rezultatov.

Aparature:

- analitska tehtnica (Sartorius A 2005),
- centrifuga (Centric 322 A),
- HPLC sistem TSP (Thermo separation products, ZDA):
 - gradientna črpalka: Constametric 4100,
 - detektor: Spectromonitor 3200,
 - avtomatski podajalnik vzorcev: AS 3000,
 - program za obdelavo podatkov: TSP, verzija 4,1;
- kolona: Aqua C18, 250 × 4,6 mm, 5µm (Phenomex, UK).

Pogoji kromatografske ločbe:

- valovna dolžina detekcije: 280 nm,
- analize so se izvajale pri kontrolirani sobni temperaturi (cca 22 °C);
- volumen injiciranja 20: µl,
- pretok mobilne faze: 1,0 ml/min,

- mobilni fazi:

- mobilna faza A: voda: očetna kislina = 99 : 1 (v/v),
- mobilna faza B: voda: acetonitril: očetna kislina = 59,75 : 40 : 0,25 (v/v/v);
- gradient mobilne faze (preglednica 7).

Preglednica 7. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje fenolov, fenolnih kislin in HMF

Table 7. Changing the volume of mobile phase B by time for qualitative phenol, phenolic acid and HMF determination method

Čas t [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	85	15
35	65	35
70	0	100
75	0	100

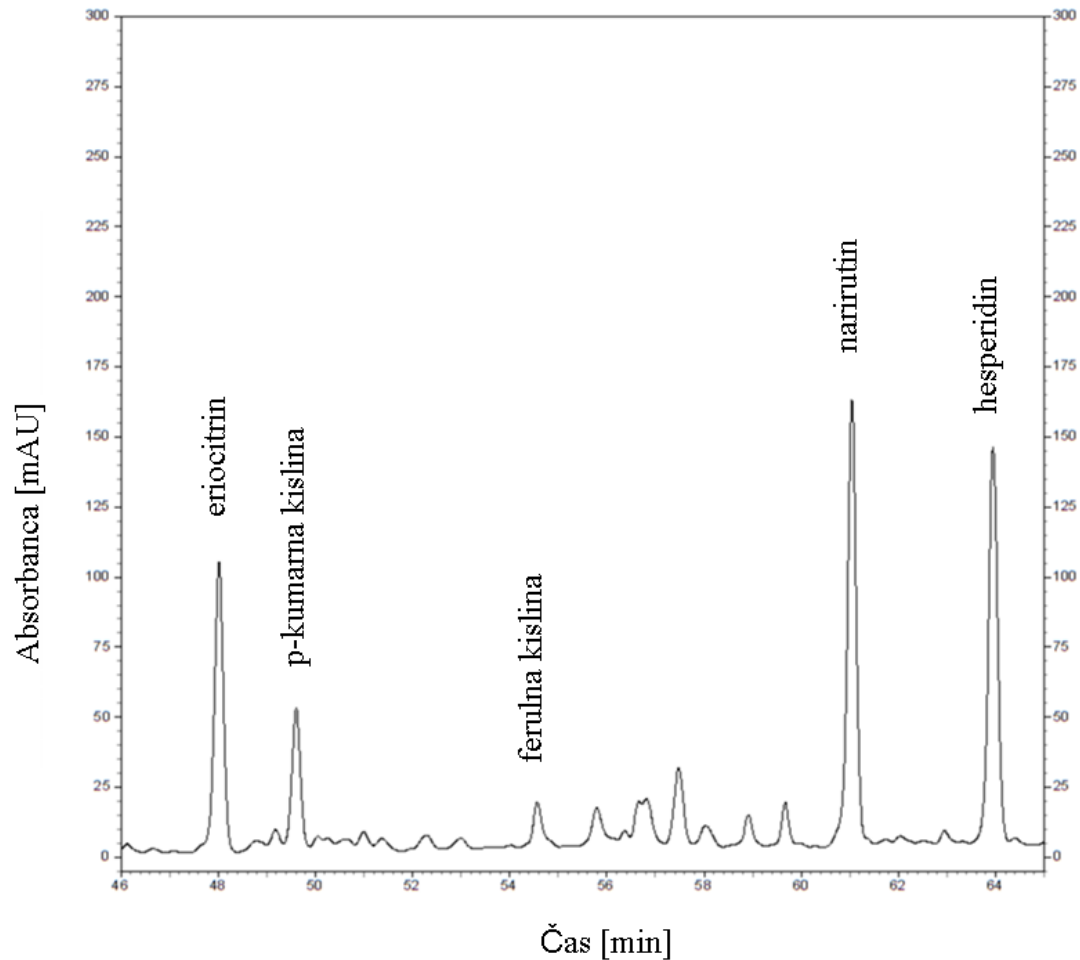
Priprava vzorcev

Ker je pomarančni sok motni sok, ga je bilo potrebno pred filtracijo z 0,45 µm PVDF filtri (Millipore, ZDA) centrifugirati (10 min; 4000 rpm).

Vrednotenje

Identifikacijo spojin se je izvršilo s standardnim dodatkom. Kvantifikacija je bila izvedena s primerjanjem površin izbranih spojin, ki so imele karakterističen retenzijski čas s predhodno izdelanimi umeritvenimi krivuljami.

Tipičen kromatogram je viden na sliki 25.



Slika 25. HPLC-UV kromatogram fenolov in fenolnih kislin v pomarančnem soku
Figure 25. HPLC-UV chromatogram of phenols and phenolic acids in orange juice

3.3.3 Določanje karotenoidov

Karotenoidi večinoma niso topni v polarnih, pač pa bolj v nepolarnih topilih, zato je način separacije drugačen, uporabljene so drugačne mobilne faze. Predvsem je drugačna priprava vzorca, ki zahteva ekstrakcijo. V nekaterih primerih je priporočljiva tudi saponifikacija s KOH. Pri tem pa prihaja tudi do izgub, zato je predvidena uporaba internega standarda, ki te izgube kompenzira.

V ta namen sta bili razviti dve različni pripravi vzorcev: ena s saponifikacijo in koncentriranjem, druga pa brez omenjenih postopkov. Metoda je zato postavljena malo nad mejo kvantifikacije.

Ker so karotenoidi rastlinski pigmenti, je njihova detekcija možna v vidnem delu spektra.

Priprava vzorcev s saponifikacijo je bila že prej opisana v Rodriguez-Amayu (2001), medtem ko sta bili tako priprava vzorcev brez saponifikacije kot tudi instrumentalna metoda v celoti razviti na Oddelku za prehrabeno kemijo, Kemijski inštitut, Slovenija.

Kemikalije:

- voda (deionizirana),
- MgSO₄ (Merck, Nemčija),
- THF (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- petroleter (Merck, Nemčija),
- BHT (Fluka, Švica),
- natrijev klorid (Merck, Nemčija),
- DCM (Merck, Nemčija),
- KOH (Merck, Nemčija),
- aceton (Merck, Nemčija),
- acetonitril (Merck, Nemčija),
- amonijev acetat (Merck, Nemčija).

Standardi:

- β-apo-8'-karotenal,
- zeaksantin,
- lutein,
- β-kriptoksantin,
- β-karoten.

Standardi so bili kupljeni pri podjetju Apin chemicals Ltd (UK).

Raztopine:

- ekstrakcijsko topilo: THF: metanol = 1: 1 (v/v),
- raztopina BHT v petroletru (c = 1 g/l),
- raztopina KOH v metanolu (c = 100 g/l),
- raztopina NaCl v vodi (c = 100 g/l),
- interni standard: β-apo-8'-karotenal v metanolu (c = 20 mg/l),

- zeaksantin v metanolu,
- lutein v metanolu,
- β -kriptoksantin v metanolu,
- β -karoten v metanolu.

Standardi so bili raztopljeni v koncentracijskem območju rezultatov.

Aparature:

- analitska tehtnica (Sartorius A 2005),
- centrifuga (Centric 322 A),
- rotavapor (Büchi, Švica),
- ultrazvočna kopel (Iskra, Slovenija),
- spektrofotometer (Beckman DU 640 ZDA),
- HPLC sistem TSP (Thermo separation products, ZDA):
 - gradientna črpalka: Constametric 4100,
 - detektor: Spectromonitor 3200,
 - avtomatski podajalnik vzorcev: AS 3000,
 - program za obdelavo podatkov: TSP, verzija 4,1;
- kolona: Aqasil C18, 250 × 4,6 mm, 5 μ m (Thermo; ZDA).

Pogoji kromatografske ločbe:

- valovna dolžina detekcije: 450 nm,
- analize so se izvajale pri kontrolirani sobni temperaturi (cca 22 °C);
- volumen injiciranja: 20 μ l,
- pretok mobilne faze: 1,50 ml/min,
- mobilni fazi:
 - mobilna faza A: raztopina 3,84 g/l amonijevega acetata v metanolu,
 - mobilna faza B: acetonitril;
- gradient mobilne faze (preglednica 8).

Preglednica 8. Spreminjanje deleža mobilne faze B s časom pri metodi za kvantitativno določanje karotenoidov

Table 8. Changing the volume of mobile phase B by time for quantitative carotenoid analysis

Čas t [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	95	5
25	50	50
26	0	100
36	0	100

Priprava vzorcev z saponifikacijo

Paralelki 50 g soka smo dodali 5 g $MgSO_4$ ter 50 ml ekstrakcijskega topila. V vzorec smo dodali 5 ml internega standarda. Zmes smo homogenizirali 1 minuto. Sledila je filtracija skozi črni filter papir trak (Sartorius, Nemčija). Filtrno pogačo in posodo smo izprali še z dvema paralelkama ekstrakcijskega topila. Ekstrakcijsko topilo s pigmentom smo prelili v lij ločnik ter dodali 50 ml petroletra, ki je vseboval 0,1 % BHT. V lij ločnik smo dodali še 50 ml raztopine natrijevega klorida in premešali.

Fazo z ekstrakcijskim topilom smo odtočili, petroleterno fazo pa smo prelili v izparilno bučko, kjer smo pigment na rotavaporju izpareli do suhega pri max. 30 °C. Ostanek smo raztopili v 5 ml DCM.

Saponifikacija

5 ml DCM-ja smo saponificirali s 5 ml raztopine KOH v metanolu. Vzorec smo hranili pod dušikom eno uro. V ločitvenem liju smo raztopino zmešali z 20 ml petroletra in raztopino natrijevega klorida. Petroleterno fazo smo odtočili in postopek še dvakrat ponovili. Petroleterno fazo smo izpirali z destilirano vodo, dokler ni bil pH nevtralen. V rotavaporju smo do suhega pigmenta izparili petroleter pri max. 30 °C. Pigment smo raztopili s 4 ml DCM in filtrirali skozi 0,45 μm PVDF filtre (Millipore, ZDA).

Priprava vzorcev brez saponifikacije

4 g pomarančnega soka smo v viali zmešali z 8 ml hladnega acetona in 4 ml petroletra. Vialo smo zaprli in ovili z aluminijem. Vialo smo premešali in vzorce položili v ultrazvočno kopel za 20 min. Vzorce smo nato centrifugirali 10 min pri 4000 rpm, da so se faze ločile. Petroleterno fazo smo pretočili v izparilno bučko. Vzorec smo izparevali do suhega pri max. 28 °C. Suh pigment smo raztopili z 1 ml metanola in filtrirali skozi 0,45 μm PVDF filtre (Millipore, ZDA).

Vrednotenje

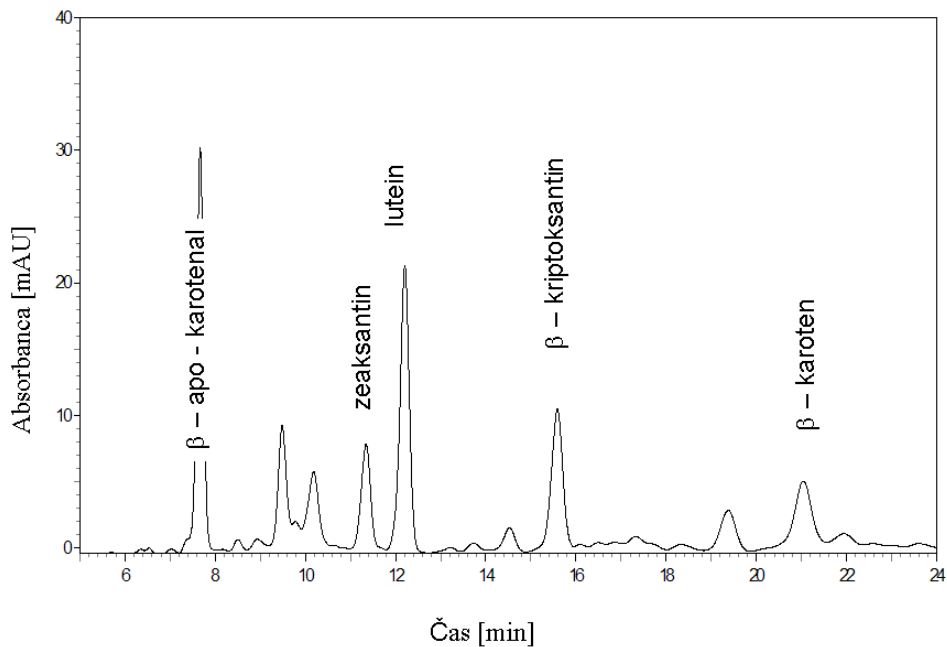
Kot priporoča Rodriguez-Amaya (2001) smo natehtali prave količine standardov in jih raztopili v topilih; nato smo jim spektrofotometrično izmerili absorbanco in preverili koncentracijo.

Karakteristični spektri izbranih karotenoidov so podani v prilogah.

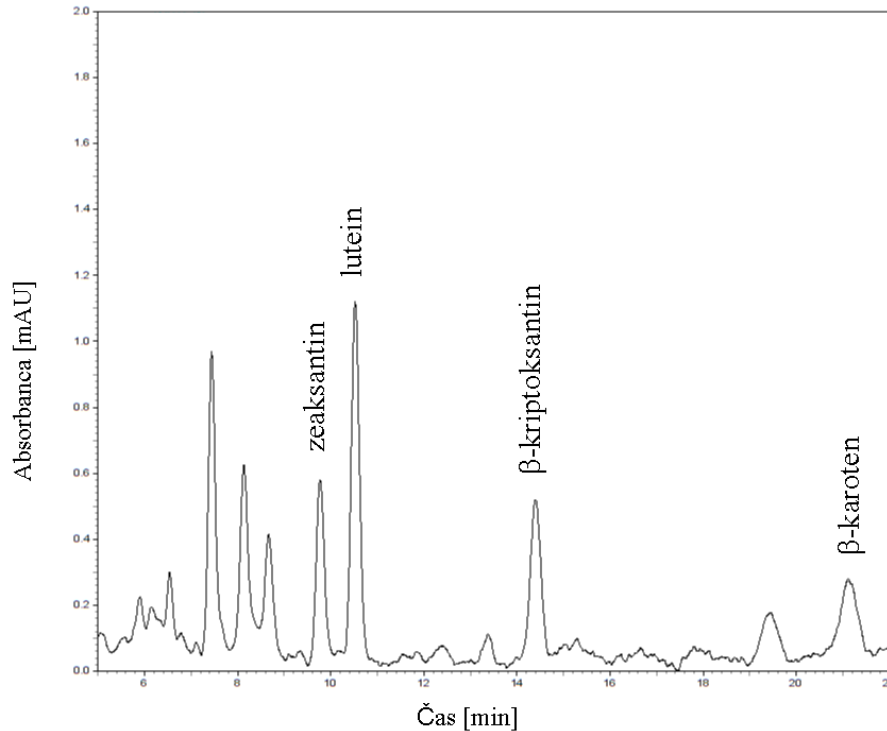
Iste vzorce smo uporabili za izdelavo umeritvenih krivulj. Uporabili smo jih tudi za identifikacijo s pomočjo retenzijskih časov in standardnega dodatka ter za meritve validacijskih parametrov metode.

Pri pripravi vzorca z internim standardom se je le-tega uporabilo za izračun izkoristka ekstrakcij.

Tipičen kromatogram za vzorec, pripravljen po prvi tehniki, je viden na sliki 26, za vzorec, pripravljen po drugi tehniki, pa na sliki 27.



Slika 26. HPLC-Vis kromatogram karotenoidov v pomarančnem soku po metodi s saponifikacijo
Figure 26. HPLC-Vis chromatogram of carotenoids in orange juice using a saponification method



Slika 27. HPLC-Vis kromatogram karotenoidov v pomarančnem soku po metodi brez saponifikacije

Figure 27. HPLC-Vis chromatogram of carotenoids in orange juice using a method without saponification

3.3.4 Določanje C-vitamina

Metoda za določanje C-vitamina je razmeroma uveljavljena in standardizirana. Mobilna faza je pufer kalijevega dihidrogen fosfata in meta-fosforne kisline pri 1,8, ki zagotavlja, da je vsa askorbinska kislina v obliki, ki zagotavlja maksimalno absorpcijo kromoforja pri 245 nm. Ker je optimum detekcije razmeroma nizek, je možnih precej motenj in prekrivanj kromatografskih vrhov. (Določanje L(+) ..., 2004).

Kemikalije:

- voda (deionizirana),
- KH_2PO_4 (Merck, Nemčija),
- H_2SO_4 (Merck, Nemčija),
- meta-fosforna kislina (Merck, Nemčija).

Standardi:

- askorbinska kislina (Merck, Nemčija).

Raztopine:

- raztopina KH_2PO_4 v vodi ($c = 17,5 \text{ mM}$),
- raztopina H_2SO_4 v vodi (0,85 %; (v/v)),
- raztopina meta-fosforne kisline v vodi (1,5 %; (w/v)),
- pufer; pH = 1,8: raztopina KH_2PO_4 uravnana na pH = 1,8 raztopino H_2SO_4 ,
- askorbinska kislina raztopljena v 1,5 % meta-fosforni kislini ($c = 10 - 40 \text{ mg/l}$)

Aparature:

- analitska tehnica (Sartorius A 2005),
- HPLC sistem TSP (Thermo separation products, ZDA):
 - gradientna črpalka: Constametric 4100,
 - detektor: Spectromonitor 3200,
 - avtomatski podajalnik vzorcev: AS 3000,
 - program za obdelavo podatkov: TSP, verzija 4,1;
- kolona Hypersil ODS, 5 μm , 150 mm \times 4,6 mm (Thermo, ZDA).

Pogoji kromatografske ločbe:

- valovna dolžina: 245 nm,
- analize so se izvajale pri kontrolirani sobni temperaturi (cca 22 °C),
- volumen injiciranja: 20 μl ,
- pretok mobilne faze: 1,50 ml/min,
- mobilna faza: pufer (pH 1,8) : metanol (Merck, Nemčija) = 70 : 30 (v/v).

Umeritvena krivulja je bila pripravljena v koncentracijskem območju med 10 in 40 mg/l. Raztapljanje standardov in redčenje vzorcev je bilo izvedeno z 1,5-odstotno (v/v) raztopino metafosforne kisline.

Identifikacija je bila narejena s primerjanjem z retenzijskimi časi in standardnim dodatkom. Kvantifikacija je bila izvedena s primerjanjem s površinami pod kromatogrami vzorcev in standardov (Določanje L(+) ..., 2005).

3.3.5 Določanje saharoze, glukoze in fruktoze z tankoplastno kromatografijo

Metoda meritve sladkorjev temelji na ločbi različnih sladkorjev na kromatografski plošči pod vplivom mobilne faze. Za obarvanje in posledično odčitavanje rezultatov je potrebno sladkorje primerno derivatizirati. Metoda je bila opisana v delu z naslovom Določanje sladkorjev s tenkoplastno kromatografijo (1994) in v magistrskem delu Lapornikove iz leta 2003.

Kemikalije:

- voda (deionizirana),
- difenilamin (Sigma, Nemčija),
- anilin (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- o-fosforna kislina (Merck, Nemčija),
- n-propanol (Merck, Nemčija),
- aceton (Merck, Nemčija),

Standardi:

- glukoza (Sigma, Nemčija),
- fruktoza (Sigma, Nemčija),
- saharoza (Sigma, Nemčija).

Raztopine:

- mobilna faza 1: n-propanol : aceton : voda = 45 : 30 : 25 (v/v/v),
- derivatizacijski reagent DAP: v erlenmajerici smo raztopili 4 g difenilamina in 4 g anilina v 160 ml metanola in 40 ml o-fosforne kisline,
- raztopina glukoze v vodi,
- raztopina fruktoze v vodi,
- raztopna saharoze v vodi.

Standardi so bili raztopljeni v koncentracijskem območju rezultatov.

Aparature:

- analitska tehtnica (Sartorius A 2005),
- linomat IV aplikator (Camag, Muttenz, Switzerland),
- denzitometer (Camag TLC skener 3),
- aparat za potapljanje plošč,
- sušilnik ,
- plošča: HPTLC, 20 × 10 cm, Silikagel, 0,5 µm.

Postopek

Pred nanašanjem vzorca smo 20 × 10 cm silikagelske plošče (60 HPTLC, Merck, Nemčija) aktivirali za 5 min na 105 °C v TLC sušilniku z možnostjo programiranja teperaturega režima.

Plošče so se v sušilniku ogrele in ohladile. Na plošče smo z uporabo Linomata IV nanegli vzorce in standarde. Plošče smo nato razvili. Trikrat so bile razvite z mobilno fazo 1. Po

vsakem razvijanju so bile plošče osušene z linearnim tokom vročega zraka. Sušile so se cca 5 min. Za vsa razvijanja je bila migracijska razdalja 7 cm, skupen razvijalni čas pa cca 150 min. Po tretjem razvijanju so bile plošče z uporabo potopne kopeli za 10 s potopljene v DAP reagent.

Plošče so bile nato v sušilniku segrete (10 min na 120 °C), pri tem so se sledovi sladkorjev primerno obarvali.

Kvantitativno določanje obarvanih trakov je bilo izvedeno na transmissijski način z denzidometrom.

3.3.6 Določanje skupnih polifenolov

Metoda bazira na oksidaciji fenolov s Folin-Ciocalteu reagentom (Fluka, Švica). Oksidacija vsebuje reakcijo s $H_3PW_{12}O_{40}$ in $H_3PMo_{12}O_{40}$ kislinami v alkalnem mediju, pri čemer nastane mešanica modrih oksidov (W_8O_{23} in Mo_8O_{23}). Modri pigment se določa z merjenjem absorbance pri 765 nm. Za kalibracijsko krivuljo je bila vzeta galna kislina (Sigma, Nemčija); vsi fenolni odzivi so bili tako prirejeni temu standardu.

Umeritvena krivulja je bila narejena v rangu med 0,01 mg/l in 1,5 mg/l. Za vrednotenje standardov in vzorcev je bil uporabljen spektrofotometer (Beckman DU 640, ZDA).

Vzorci so bili predhodno centrifugirani za 10 min pri 4000 rpm. Tako standardi kot tudi vzorci so bili pripravljene tako, da je bilo 2 ml vzorca ali standarda dodanega v 10 ml Folin-Ciocalteu reagenta. Raztopina je bila termostatirana 5–10 min. Po tem smo dodali 8 ml 7,5-odstotne raztopine Na_2CO_3 (Merck, Nemčija). Po dve urnem termostatiranju smo izmerili pripadajočo absorbanco in jo primerjali z absorbanco slepega vzorca. Metoda je bila predhodno opisana v delu Lapornika in sod. (2005) ter v delu z naslovom Določanje polifenolov (1995).

3.3.7 Spektrofotometrično določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH

Metoda temelji na lovljenju prostih radikalov, ki izvirajo iz 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH). Antioksidativne komponente imajo to možnost, da lovijo proste radikale. Ker imajo DPPH prosti radikali kromofor, se zaradi reakcije z antioksidanti absorbanca raztopine zmanjšuje. Absorpcijski maksimum je pri 515 nm.

Vzorci so bili centrifugirani za 10 min pri 4000 rpm. 50 μ l vzorca smo dodali 3 ml raztopine DPPH (Aldich, Nemčija) v metanolu (Merck, Nemčija) s koncentracijo 10 mg/100 ml. Absorbanca je bila merjena po točno 15 min in primerjana z absorbanco

slepega vzorca. Pred vsako serijo analiz je bila raztopina DPPH sveže pripravljena (Lapornik in sod., 2005).

Vrednotenje

Rezultat je podan kot učinek lovljenja prostih radikalov in izražen v odstotkih, oziroma kot odstotek antioksidativne učinkovitosti (% AU).

% AU = 1 - (absorbanca vzorca/absorbanca slepega vzorca (deionizirane vode))

3.3.8 Določanje barve

Meritve barve so bile opravljene v CIE, 1976 barvnem prostoru z napravo CR 300 (Minolta Co. Ltd., Japonska). Merjeni parametri so bili: L*, a* in b*.

L (parameter svetlosti): L = 0 opisuje črno barvo; L = 100 opisuje belo barvo.

Vrednost a opisuje barvno lestvico od negativnih vrednosti, ki pomenijo zeleno barvo do pozitivnih vrednosti, ki so pomenijo margenta barvo.

Vrednost b opisuje barvno skalo od negativnih vrednostih – modra barva – do pozitivnih vrednosti – rumena barva.

Iz parametrov L, a in b je mogoče izračunati skupno spremembo barve (ΔE).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

- Spremembe E med 0 in 0,5 niso zaznavne s prostim očesom.
- Spremembe E med 0,5 in 1,5 so delno zaznavne.
- Spremembe E med 1,5 in 3 so zaznavne spremembe.
- Spremembe E med 3 in 6 so že dobro zaznavne spremembe.
- Spremembe E med 6 in 12 pa so zelo zaznavne spremembe (Cserhalmi in sod., 2006).

3.3.9 Meritve kisika

Koncentracija raztopljenega kisika je bila izmerjena z napravo Orbisphere Micro O₂ logger 3650. Plastenke so se odprle in v proizvod je bila takoj vstavljena cevka. Proizvod se je cca 5 min pretakal preko kisikovega senzorja. (Castellari in sod., 2000).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

3.4.1 Statistični model 1

V poskusih zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL 2003. Standardne deviacije meritev so bile izračunane s programom Microsoft Excel 2003. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom Statgraphics Centurion ver. 15 (StatPoint, Inc., ZDA) z multivariantno analizo variance – procedurno GLM (General Linear Models). Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo LSD (Fisher's least significant difference) in bile primerjane s 5-odstotnim tveganjem. Vpliv paralelk je bil pri standardiziranih in validiranih metodah neznačilen.

$$y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + P_k + e_{ijk}$$

y_{ijk} = ijk – opazovana vrednost

μ = povprečna vrednost

T_i = vpliv časa vzorčenja

$i = 1 - 7$ (odvisno od izvedenega testa, vidno v rezultatih)

E_j = vpliv embalaže

$j = 2 - 4$ (odvisno od izvedenega testa, vidno v rezultatih)

P_k = vpliv paralelke

$k = 1 - 6$

e_{ijk} = ostanek

3.4.2 Statistični model 2

Za izračun degradacijskih krivulj, njihovih parametrov in statistično signifikantnih razlik med njimi, ki omogočajo kredibilno primerjavo, je bila uporabljena naslednja tehnika.

Standardne deviacije in izračun koncentracij je bil izveden s programom Microsoft Excel 2003. Enostavni regresijski testi so bili izvedeni s programom Statgraphics Centurion ver. 15 (StatPoint, Inc., ZDA). Enostavna regresija je ponudila eksponentno funkcijo kot statistično najbolj verjeten model za izračun enačb degradacijskih krivulj antocianov. Z njo smo izračunali tudi naklone premic, umeritvene krivulje in standardne napake. Podrobnejši potek je podan v rezultatih.

Za določanje statistično signifikantnih razlik med nakloni degradacijskih krivulj antocianov z istim aglikonskim delom je bilo narejenih šest testov. V vsakem testu so bili različni antocianini z istim glikozidiranim sladkorjem, polnjeni v isto embalažo, primerjani med sabo. Za primerjavo antocianov z istim aglikonskim delom in različnim glikozidiranim

sladkorjem je bilo narejenih deset statističnih testov, ki opisujejo signifikantne razlike med nakloni.

Primerjava regresijskih premic je bila narejena s programom Statgraphics Centurion ver. 15 (StatPoint, Inc., ZDA). Če je bila vrednost P posamezne primerjave večja ali enaka 0,05, ni bilo statistično signifikantne razlike med nakloni s 95-odstotnim ali višjim zaupanjem.

4. REZULTATI

4.1 NEKTAR IZ BOROVNIC IN ARONIJE, NAPOLNJEN V STEKLENO EMBALAŽO IN EMBALAŽO IZ VEČSLOJNEGA KARTONA

Nektar iz borovnic in aronije je bil napolnjen v industrijskem merilu po recepturi, opisani v poglavju 3.2 Materiali. Proizvoda sta bila napolnjena po različnih tehnoloških postopkih. Za polnjenje v stekleno embalažo se tradicionalno uporablja tehnologija vročega polnjenja, ki ne obsega hlajenja pred polnjenjem in običajno zahteva še dogrevanje in hlajenje po zapiranju. Vse to podaljšuje procesiranje pri višjih temperaturah in s tem tudi hitrost kemijskih reakcij, ki so termično pogojene.

Po drugi strani tehnologija aseptičnega polnjenja zagotavlja hitro ohladitev proizvoda po zahtevani termični obdelavi, hladen proizvod pa se v majhnem aseptičnem prostoru hitro napolni v sterilno embalažo iz večslojnega kartona. To zagotavlja krajši čas toplotne obdelave in s tem primerjalno boljše izhodišče kakovosti napolnjenega proizvoda.

Poleg razlike v termičnem procesiranju je bistvena razlika med obema tehnološkima postopkoma embalaža, v katero je proizvod napolnjen. Steklена embalaža je glede prepustnosti na kisik inertna, medtem ko večslojni karton v določeni meri prepušča pline. Razlika je tudi v transparentnosti na svetlobo, saj steklena embalaža največkrat prepušča svetlobo, ki je lahko iniciator radikalskih reakcij.

4.1.1 Analize antocianov v nektarju iz borovnic in aronije

Problem spreminjanja barve proizvodov, ki vsebujejo antocianska barvila, je poznan že precej časa, zato se take proizvode običajno meša s sadjem, ki vsebuje večje količine antocianov: rdečim grozdem, aronijo, rdečim korenjem. Ker so bile v tem času narejene raziskave o pozitivnem vplivu nekaterih komponent sadja, med katerimi so tudi antociani, na zdravje, se take mešanice pojmuje tudi kot funkcionalna živila. Iz kromatogramov, ki so predstavljeni v poglavju 3.3 Metode je najbolj razvidna razlika med profili antocianov ta, da je pri nektarju iz borovnic in aronije občutno povečana vsebnost cianidin 3-glukozida v primerjavi z borovničevim nektarjem.

Za antociane je znano, da zelo hitro razpadejo pod različnimi vplivi, kot so: pH, toplota, svetloba. Zaradi tega so dober pokazatelj kakovosti tehnološkega postopka, embalaže ter tudi nepravilne toplotne obdelave ali skladiščenja.

Preglednica 9 opisuje koncentracije posameznih antocianov tekom hranjenja v termostatu na 30 °C in pri 50 % vlažnosti. 30 °C je rahlo povišana sobna temperatura in se običajno uporablja za karakterizacijo pospešenega staranja. Hitrost staranja je glede na običajno skladiščenje. Proizvodi v preglednici 9 so bili napolnjeni v večslojni karton po aseptični tehnologiji polnjenja.

Preglednica 9. Tabela koncentracij posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v večslojni karton, v odvisnosti od časa termostatiranja

Table 9. Table of individual anthocyanin concentrations in blueberry-aronia nectar filled in carton in correlation with storage at a constant temperature

Koncentracija antocianov [mg/l]							
Vrsta antociana	Čas termostatiranja [dan]						
	0,1	16	30	44	58	99	183
Del 3-Gal ^a	26,3 ± 2,9	21,0 ± 0,3	19,0 ± 0,7	16,3 ± 0,6	12,9 ± 0,4	7,1 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Del 3-Glu ^a	37,9 ± 4,1	30,3 ± 0,5	27,4 ± 1,1	23,6 ± 0,7	18,9 ± 0,7	10,9 ± 0,1	2,8 ± 0,2
Cy 3-Gal ^b	165,5 ± 17,7	133 ± 1,3	121,4 ± 4,2	106,3 ± 2,1	87,4 ± 2,3	54,1 ± 0,8	16,8 ± 1,1
Del 3-Ara ^a	22,3 ± 2,4	17,4 ± 0,3	15,4 ± 0,7	12,6 ± 0,6	9,3 ± 0,4	4,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Cy 3-Glu ^b	43,9 ± 4,8	35,3 ± 0,4	32,2 ± 1,3	28,4 ± 0,7	23,6 ± 0,7	14,9 ± 0,2	4,9 ± 0,3
Pet 3-Gal ^c	9,4 ± 1,1	7,4 ± 0,1	6,6 ± 0,3	5,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2	2,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Cy 3-Ara ^b	80,2 ± 8,7	63,4 ± 0,7	56,8 ± 1,9	48,0 ± 1,3	37,7 ± 1,1	20,4 ± 0,4	4,9 ± 0,4
Pet 3-Glu ^c	23,0 ± 2,6	18,3 ± 0,3	16,6 ± 0,6	14,3 ± 0,4	11,5 ± 0,4	6,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Peo 3-Gal ^d	3,0 ± 0,3	2,4 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Pet 3-Ara ^c	5,6 ± 0,6	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,2	3,2 ± 0,1	2,4 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Peo 3-Glu ^d	11,7 ± 1,3	9,3 ± 0,2	8,4 ± 0,4	7,2 ± 0,1	5,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Mal 3-Gal ^e	9,3 ± 1,1	7,4 ± 0,1	6,7 ± 0,2	5,7 ± 0,2	4,3 ± 0,1	2,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Mal 3-Glu ^e	26,1 ± 2,9	20,6 ± 0,3	18,5 ± 0,7	15,9 ± 0,4	12,6 ± 0,4	7,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Mal 3-Ara ^c	5,6 ± 0,7	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
skupni ^f	480,3 ± 50,5	382,6 ± 5,7	345,6 ± 12,7	298,8 ± 10,3	238,3 ± 7,0	140,1 ± 2,2	39,9 ± 2,8

^a Koncentracija je preračunana na delphinidin 3-glukozid.

^b Koncentracija je preračunana na cianidin 3-glukozid.

^c Koncentracija je preračunana na petunidin 3-glukozid.

^d Koncentracija je preračunana na peonidin 3-glukozid.

^e Koncentracija je preračunana na malvidin 3-glukozid.

^f Skupna koncentracija antocianov je bila preračunana iz površine pod kromatogramom in primerjana z umeritveno krivuljo cianidin 3-glukozida.

Iz preglednice 9 je razvidno, da se koncentracije tako posameznih kot tudi skupnih antocianov nižajo razmeroma hitro, in da je koncentracija skupnih antocianov po 183 dnevih termostiranja samo še 8 % začetne koncentracije. Razvidno je tudi, da se deleži razpada razlikujejo glede na vrsto posameznega antociana in variirajo med 4 in 11 %.

Preglednica 10. Tabela koncentracij posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v stekleno embalažo, v odvisnosti od časa termostiranja

Table 10. Table of individual anthocyanin concentration in blueberry-aronia nectar filled in glass in correlation with thermostat storage time

Koncentracija antocianov [mg/l]							
Vrsta antociana	Čas termostiranja [dan]						
	2	23	38	54	68	123	207
Del 3-Gal ^a	29,2 ± 2,1	21,0 ± 0,1	17,3 ± 0,3	16,8 ± 0,2	13,6 ± 0,5	6,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Del 3-Glu ^a	43,7 ± 3,3	32,0 ± 0,1	27,0 ± 0,2	26,3 ± 0,7	21,2 ± 0,8	11,3 ± 0,1	4,2 ± 0,2
Cy 3-Gal ^b	148,5 ± 11,2	111,6 ± 0,4	95,1 ± 1,4	93,2 ± 2,3	77,5 ± 2,5	45,3 ± 0,5	19,6 ± 0,1
Del 3-Ara ^a	23,7 ± 2,0	16,1 ± 0,2	12,8 ± 0,3	12,4 ± 0,5	9,3 ± 0,5	3,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Cy 3-Glu ^b	49,9 ± 3,8	37,7 ± 0,2	32,2 ± 0,4	31,6 ± 0,8	26,5 ± 0,8	16,0 ± 0,1	7,3 ± 0,4
Pet 3-Gal ^c	10,5 ± 1,0	7,5 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,0 ± 0,2	4,7 ± 0,2	2,4 ± 0,0	0,9 ± 0,1
Cy 3-Ara ^b	67,9 ± 5,5	48,3 ± 0,5	39,6 ± 0,8	38,4 ± 1,1	30,4 ± 1,2	15,1 ± 0,3	5,3 ± 0,3
Pet 3-Glu ^c	26,5 ± 2,2	19,5 ± 0,1	16,3 ± 0,3	15,9 ± 0,4	13,0 ± 0,5	7,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Peo 3-Gal ^d	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Pet 3-Ara ^c	6,3 ± 0,6	4,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Peo 3-Glu ^d	14,0 ± 1,2	10,3 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,4 ± 0,3	6,8 ± 0,2	4,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Mal 3-Gal ^e	10,7 ± 0,9	7,7 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,2 ± 0,2	4,8 ± 0,2	2,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Mal 3-Glu ^e	31,7 ± 3,5	22,4 ± 0,2	18,5 ± 0,3	17,9 ± 0,5	14,4 ± 0,5	7,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Mal 3-Ara ^e	6,2 ± 0,6	4,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0
skupni ^f	481,3 ± 37,0	351,1 ± 2,4	293,6 ± 5,0	286,3 ± 8,1	231,8 ± 8,1	127 ± 1,5	51,2 ± 2,6

^a Koncentracija je preračunana na delphinidin 3-glukozid.

^b Koncentracija je preračunana na cianidin 3-glukozid.

^c Koncentracija je preračunana na petunidin 3-glukozid.

^d Koncentracija je preračunana na peonidin 3-glukozid.

^e Koncentracija je preračunana na malvidin 3-glukozid.

^f Skupna koncentracija antocianov je bila preračunana iz površine pod kromatogramom in primerjana z umeritveno krivuljo cianidin 3-glukozida.

V preglednici 10 so opredeljene koncentracije tako posameznih kot skupnih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, vendar je tu proizvod napolnjen v stekleno embalažo. Tudi tu je opazno, da se koncentracije s časom razmeroma hitro znižujejo. Ker vzorčenje ni potekalo istočasno, se čas termostatiranja pri vzorčenju rahlo razlikuje. Razvidno je tudi, da v stekleni embalaži ostaja po 207 dnevih termostatiranja več skupnih antocianov kot pri proizvodih, napolnjenih v večslojen karton. Po 204 dneh termostatiranja vzorci vsebujejo 10 % začetne koncentracije skupnih antocianov, razlike pri posameznih antocianih pa variirajo med 5 in 15 %.

Glede na daljšo toplotno obdelavo pri tehnologiji vročega polnjenja bi bilo pričakovati povišane vrednosti začetne skupne koncentracije antocianov pri proizvodih, napolnjenih v večslojni karton, vendar tega iz same tabele koncentracij ni zaslediti.

Ker se časovna os glede na meritve razlikuje, je iz samih tabel mogoče razbrati, da je kakovost proizvoda glede na vrednosti antocianov boljša v stekleni embalaži kot v večslojnem kartonu, količinsko pa te razlike ni mogoče opredeliti. Iz preglednic 9 in 10 tudi ni mogoče določiti, ali je bila začetna koncentracija antocianov pri različnih tehnoloških postopkih.

Ozirajoč se na rezultate testa enostavne regresije izvedenega in obdelanega s programom Statgraphics Centurion ver. 15 (ZDA), je bila glede na nabor vzorcev izbrana eksponentna krivulja kot funkcija z največjim statističnim ujemanjem.

Enačba funkcije je tako:

$$y = Ae^{-kx},$$

pri čemer je:

y – aktualna koncentracija antociana [mg/l],

A – začetna koncentracija [mg/l],

x – čas [dan],

k – konstanta k opisuje hitrost razpada posameznega antociana z časom [dan⁻¹].

Na konstanto k delujejo različni vplivi in tako določajo njeno vrednost. To so temperatura, svetloba, dostopnost kisika in kemijska struktura posameznega antociana.

Enačbo konstante k so že predhodno določevali. Glede na raziskavo, ki sta jo opravila Wang and Xu (2007) ustreza enačba konstante k Arrheniusovi enačbi, ki se glasi:

$$k = k_0 e^{-E_a/(RT)},$$

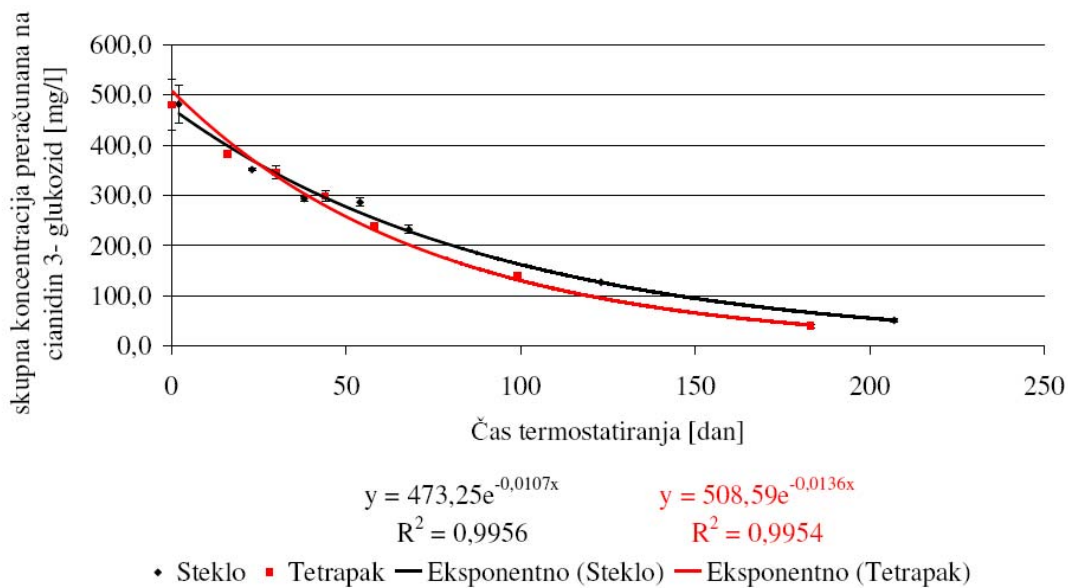
pri čemer je:

k_0 – frekvenčni faktor [dan^{-1}],

E_a – aktivacijska energija [kJ/mol],

R – plinska konstanta; 8.314 [J/(molK)] ,

T – absolutna temperatura [K].



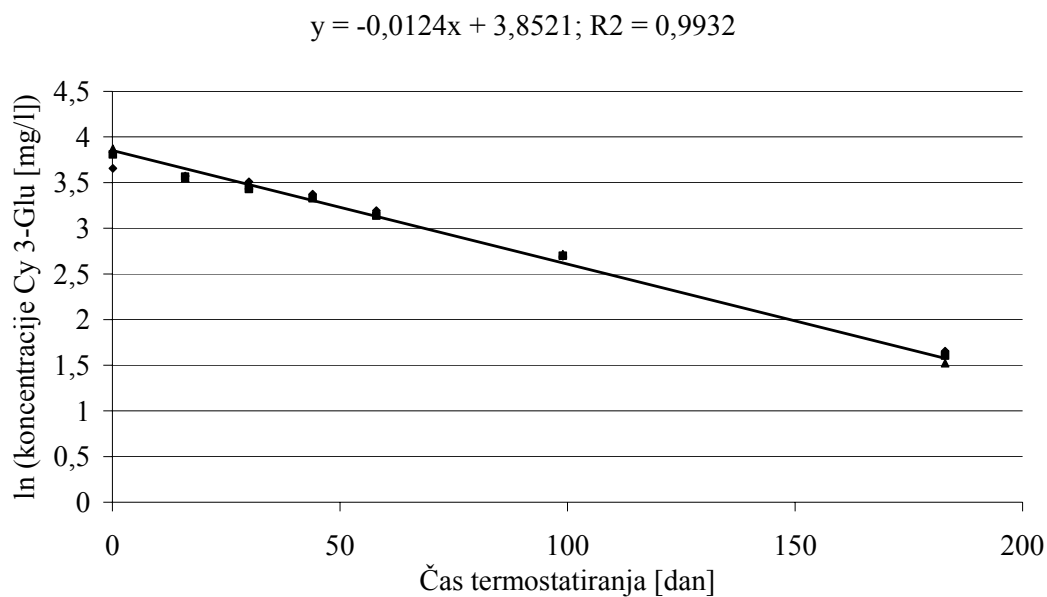
Slika 28. Eksponenti degradacijskih krivulj skupnih antocianov za nektar iz borovnic in aronije, napolnjen v stekleno embalažo in embalažo iz večslojnega kartona

Figure 28. Exponential degradation curves of total anthocyanins in blueberry-aronia nectar filled in glass and carton

Konstanti razpada sta $0,0107 \pm 0,0002$ za stekleno embalažo in $0,0136 \pm 0,0003$ za večslojni karton. Ker je parameter p manjši od $0,01$, je pri primerjanju medsebojnih naklonov 99-odstotna verjetnost, da sta naklona – in s tem tudi konstanti hitrosti razpada – različni.

Opazne so razlike pri začetni koncentraciji. Začetna koncentracija za skupne antociane v steklu je $473,25 \text{ mg/l}$, za skupne antociane v večslojnem kartonu pa $508,59 \text{ mg/l}$. Ker je presečišče p -ja z osjo y manjše od $0,01$, obstaja 99-odstotna verjetnost, da sta konstanti različni.

Za lažjo interpretacijo in statistično primerjavo so je bila y os grafične predstavitev prirejena na ln skalo. Tako smo dobili premice, katerim smo lahko določili linearno enačbo, napako, in ki so bile primerne za binarno primerjavo naklonov regresijskih premic. Tipičen graf je viden na sliki 29, vsi ostali grafi so bili narejeni na isti način.



Slika 29. Graf ln koncentracij Cy 3-Glu v odvisnosti od časa

Figure 29. Ln of Cy 3-Glu concentration in correlation with time

Tako izračunane konstante hitrosti razpada za posamezne antociane glede na vrsto pakiranja skupaj s standardno napako so vidne v preglednici 11.

Preglednica 11. Koeficienti degradacijskih hitrosti v odvisnosti od vrste antociana in embalaže
Table 11. Degradation rates in correlation with individual anthocyanins and packaging types

Konstante hitrosti razpada [dan^{-1}]		
Vrsta antociana	Embalaža	
	Nektar v steklu	Nektar v večslojnem kartonu
Cy 3-Glu	$0,0091 \pm 0,0002$	$0,0114 \pm 0,0003$
Peo 3-Glu	$0,0102 \pm 0,0002$	$0,0123 \pm 0,0003$
Pet 3-Glu	$0,0108 \pm 0,0002$	$0,013 \pm 0,0003$
Del 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$	$0,0136 \pm 0,0003$
Mal 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$	$0,0133 \pm 0,0003$
Cy 3-Gal	$0,0096 \pm 0,0002$	$0,0120 \pm 0,0003$
Peo 3-Gal	$0,0110 \pm 0,0002$	$0,0130 \pm 0,0002$
Pet 3-Gal	$0,0118 \pm 0,0002$	$0,0134 \pm 0,0002$
Del 3-Gal	$0,0119 \pm 0,0002$	$0,0142 \pm 0,0004$
Mal 3-Gal	$0,0124 \pm 0,0002$	$0,0154 \pm 0,0003$
Cy 3-Ara	$0,0122 \pm 0,0002$	$0,0147 \pm 0,0003$
Pet 3-Ara	$0,0144 \pm 0,0003$	$0,0166 \pm 0,0004$
Del 3-Ara	$0,0149 \pm 0,0003$	$0,0178 \pm 0,0005$
Mal 3-Ara	$0,0143 \pm 0,0003$	$0,0175 \pm 0,0004$

Hitrosti razpada se razlikujejo tako glede na vrsto embalaže, v katero je bil proizvod napolnjen, kot tudi glede na posamezen antocian. Za najbolj stabilnega se je izkazal cianidin 3-glukozid, za najmanj stabilnega pa delfinidin 3-arabinozid. Delfinidin 3-arabinozid razpada za 64 % hitreje od cianidin 3-glukozida v stekleni embalaži in za 56 % hitreje v večslojnem kartonu. Razlike so se pokazale tudi pri istih antocianih v drugi vrsti embalaže. Hitrosti razpada v večslojnem kartonu so za 14–25 % večje od hitrosti razpada v stekleni embalaži.

Ker so bili vsi pogoji razen vrste embalaže za oba proizvoda enaki, je parameter, ki lahko opiše nastale razlike, kemijska struktura posameznega antociana. Analizirani antociani se po kemijski strukturi med seboj ločijo glede na aglikonski del – tega lahko sestavljajo cianidin, delfinidin, petunidin, peonidin in malvidin – in glede na glikozidirane sladkorje, ki so v našem primeru glukoza, galaktoza in arabinoza.

Za opredelitev vpliva kemijske strukture na hitrost razpada je bilo narejenih 16 statističnih testov: 6 za opredelitev vpliva aglikonskega dela in 10 za opredelitev vpliva glikozidirane sladkorja. Testi so temeljili na medsebojnem primerjanju hitrosti razpada posameznih antocianov. Izračunane so bile vrednosti p , ki opredeljujejo statistično razliko med posameznima naklonoma degradacijskih krivulj.

Če je bila vrednost p posameznega horizontalno-vertikalnega para naklonov večja ali enaka 0,05, potem statistično ni bilo signifikantne razlike med naklonoma s 95 % zaupanja. Rezultati testov vpliva aglikonskega dela kemijske strukture so vidni v preglednicah od 12 do 17, rezultati testov vpliva glikozidirane sladkorja pa v preglednicah od 18 do 27.

4.1.1.1 Statistični testi za opredelitev signifikantnih razlik med različnimi nakloni degradacijskih krivulj

Preglednica 12. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano glukozo v proizvodih, napolnjenih v steklo

Table 12. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated glucose in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]					
Vrsta antociana	Cy 3-Glu	Peo 3-Glu	Pet 3-Glu	Del 3-Glu	Mal 3-Glu
Cy 3-Glu	/	0,0005	0	0	0
Peo 3-Glu	/	/	0,0358	0,0014	0,0012
Pet 3-Glu	/	/	/	0,1824	0,1593
Del 3-Glu	/	/	/	/	0,919
Mal 3-Glu	/	/	/	/	/

Preglednica 13. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano galaktozo v proizvodih, napolnjenih v steklo

Table 13. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated galactose in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]					
Vrsta antociana	Cy 3-Gal	Peo 3-Gal	Pet 3-Gal	Del 3-Gal	Mal 3-Gal
Cy 3-Gal	/	0,0001	0	0	0
Peo 3-Gal	/	/	0,0185	0,0107	0,0002
Pet 3-Gal	/	/	/	0,8416	0,0751
Del 3-Gal	/	/	/	/	0,1056
Mal 3-Gal	/	/	/	/	/

Preglednica 14. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano arabinozo v proizvodih, napolnjenih v steklo

Table 14. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated arabinose in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]				
Vrsta antociana	Cy 3-Ara	Pet 3-Ara	Del 3-Ara	Mal 3-Ara
Cy 3-Ara	/	0	0	0
Pet 3-Ara	/	/	0,231	0,7473
Del 3-Ara	/	/	/	0,1308
Mal 3-Ara	/	/	/	/

Preglednica 15. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano glukozo v proizvodih, napolnjenih v večslojni karton

Table 15. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated glucose in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]					
Vrsta antociana	Cy 3-Glu	Peo 3-Glu	Pet 3-Glu	Del 3-Glu	Mal 3-Glu
Cy 3-Glu	/	0,0118	0,0001	0	0
Peo 3-Glu	/	/	0,0882	0,0026	0,022
Pet 3-Glu	/	/	/	0,1227	0,5826
Del 3-Glu	/	/	/	/	0,2704
Mal 3-Glu	/	/	/	/	/

Preglednica 16. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano galaktozo v proizvodih, napolnjenih v večslojni karton

Table 16. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated galactose in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]					
Vrsta antociana	Cy 3-Gal	Peo 3-Gal	Pet 3-Gal	Del 3-Gal	Mal 3-Gal
Cy 3-Gal	/	0,0004	0,0006	0	0
Peo 3-Gal	/	/	0,7906	0,0079	0,0001
Pet 3-Gal	/	/	/	0,0041	0
Del 3-Gal	/	/	/	/	0,3339
Mal 3-Gal	/	/	/	/	/

Preglednica 17. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za antociane z glikozidirano arabinozo v produktih, napolnjenih v večslojni karton

Table 17. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of anthocyanins with glycosylated arabinose in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]				
Vrsta antociana	Cy 3-Ara	Pet 3-Ara	Del 3-Ara	Mal 3-Ara
Cy 3-Ara	/	0	0	0
Pet 3-Ara	/	/	0,231	0,7473
Del 3-Ara	/	/	/	0,1308
Mal 3-Ara	/	/	/	/

Preglednica 18. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za cianidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo

Table 18. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of cyanidin with different glycosylated sugars in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Cy 3-Glu	Cy 3-Gal	Cy 3-Ara
Cy 3-Glu	/	0,0648	0
Cy 3-Gal	/	/	0
Cy 3-Ara	/	/	/

Preglednica 19. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za peonidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v steklo

Table 19. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of peonidin with different glycosylated sugars in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]		
Vrsta antociana	Peo 3-Glu	Peo 3-Gal
Peo 3-Glu	/	0,0147
Peo 3-Gal	/	/

Preglednica 20. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za petunidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v steklo

Table 20. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of petunidin with different glycosylated sugars in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Pet 3-Glu	Pet 3-Gal	Pet 3-Ara
Pet 3-Glu	/	0,0017	0
Pet 3-Gal	/	/	0
Pet 3-Ara	/	/	/

Preglednica 21. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za delfinidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v steklo

Table 21. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of delphinidin with different glycosylated sugars in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Del 3-Glu	Del 3-Gal	Del 3-Ara
Del 3-Glu	/	0,0302	0
Del 3-Gal	/	/	0
Del 3-Ara	/	/	/

Preglednica 22. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za malvidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v steklo

Table 22. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of malvidin with different glycosylated sugars in products filled in glass

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Mal 3-Glu	Mal 3-Gal	Mal 3-Ara
Mal 3-Glu	/	0,0007	0
Mal 3-Gal	/	/	0
Mal 3-Ara	/	/	/

Preglednica 23. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za cianidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton

Table 23. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of cyanidin with different glycosylated sugars in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Cy 3-Glu	Cy 3-Gal	Cy 3-Ara
Cy 3-Glu	/	0,1319	0
Cy 3-Gal	/	/	0
Cy 3-Ara	/	/	/

Preglednica 24. Vrednosti p za določitev signifikantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za peonidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napolnjenih v večslojni karton

Table 24. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of peonidin with different glycosylated sugars in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]		
Vrsta antociana	Peo 3-Glu	Peo 3-Gal
Peo 3-Glu	/	0,0079
Peo 3-Gal	/	/

Preglednica 25. Vrednosti p za določitev significantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za petunidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v večslojni karton

Table 25. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of petunidin with various glycosylated sugars in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Pet 3-Glu	Pet 3-Gal	Pet 3-Ara
Pet 3-Glu	/	0,4927	0
Pet 3-Gal	/	/	0
Pet 3-Ara	/	/	/

Preglednica 26. Vrednosti p za določitev significantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za delfinidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v večslojni karton

Table 26. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of delphinidin different glycosylated sugars in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Del 3-Glu	Del 3-Gal	Del 3-Ara
Del 3-Glu	/	0,0633	0
Del 3-Gal	/	/	0
Del 3-Ara	/	/	/

Preglednica 27. Vrednosti p za določitev significantne razlike koeficientov razpadnih krivulj za malvidine z različnimi glikozidiranimi sladkorji v produktih, napoljenih v večslojni karton

Table 27. Values p for significant statistical difference determination for degradation rates of malvidin with different glycosylated sugars in products filled in carton

Vrednosti p za naklone degradacijskih krivulj med vertikalno in horizontalno postavljenimi antociani [/]			
Vrsta antociana	Mal 3-Glu	Mal 3-Gal	Mal 3-Ara
Mal 3-Glu	/	0	0
Mal 3-Gal	/	/	0
Mal 3-Ara	/	/	/

Rezultati posameznih testov so se uredili v skupine, saj so opredeljene statistične razlike med hitrostmi razpada posameznih antocianov za različne aglikone (preglednica 28) in za različne glikozidirane sladkorje (preglednica 30).

Glede na rezultate testa smo pripravili preglednice, ki nam omogočajo opredelitev razlik za celoten sistem glede na antociane z različnim aglikonom in glede na antociane z različnim glikozidiranim sladkorjem (tabeli 29 in 31).

Preglednica 28. Signifikantne razlike med nakloni degradacijskih krivulj glede na posamezen aglikon
Table 28. Significant statistical differences in degradation coefficients for different aglycones

Konstante hitrosti razpada [dan^{-1}]						
Identifikacija	Konstante degradacijskih krivulj za stekleno embalažo			Konstante degradacijskih krivulj za embalažo iz večslojnega kartona		
		*			*	
Cy 3-Glu	$0,0091 \pm 0,0002$	*		$0,0114 \pm 0,0003$	*	
Peo 3-Glu	$0,0102 \pm 0,0002$		*	$0,0123 \pm 0,0003$		*
Pet 3-Glu	$0,0108 \pm 0,0002$			$0,0130 \pm 0,0003$		*
Del 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$			$0,0136 \pm 0,0003$		*
Mal 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$			$0,0133 \pm 0,0003$		*
Cy 3-Gal	$0,0096 \pm 0,0002$	*		$0,0120 \pm 0,0003$	*	
Peo 3-Gal	$0,0110 \pm 0,0002$		*	$0,0130 \pm 0,0002$		*
Pet 3-Gal	$0,0118 \pm 0,0002$			$0,0134 \pm 0,0002$		*
Del 3-Gal	$0,0119 \pm 0,0002$			$0,0142 \pm 0,0004$		*
Mal 3-Gal	$0,0124 \pm 0,0002$			$0,0154 \pm 0,0003$		*
Cy 3-Ara	$0,0122 \pm 0,0002$	*		$0,0147 \pm 0,0003$	*	
Pet 3-Ara	$0,0144 \pm 0,0003$		*	$0,0166 \pm 0,0004$		*
Del 3-Ara	$0,0149 \pm 0,0003$		*	$0,0178 \pm 0,0005$		*
Mal 3-Ara	$0,0143 \pm 0,0003$		*	$0,0175 \pm 0,0004$		*

Preglednica 29. Povzetek statističnih testov za posamezen aglikon (N/M/O/P)**Table 29.** Summary of statistical tests for different aglycones (N/M/O/P)

Vrsta aglikona	Cy	Peo	Pet	Del	Mal
Cy	/	6/6/0/0	6/6/0/0	6/6/0/0	6/6/0/0
Peo	/	/	4/2/2/0	4/4/0/0	4/4/0/0
Pet	/	/	/	6/1/5/0	6/1/5/0
Del	/	/	/	/	6/0/6/0
Mal	/	/	/	/	/

N = skupno število vseh testov

M = število testov, pri katerih je vertikalno postavljen aglikon izkazoval statistično višjo vrednost kot horizontalno predstavljen aglikon

O = število testov, pri katerih ni bilo statistično signifikantne razlike med vertikalno in horizontalno predstavljenim aglikonom

P = število testov, pri katerih je vertikalno postavljen aglikon izkazoval statistično manjšo vrednost kot horizontalno predstavljen aglikon

Za primerjavo hitrosti razpada posameznih antocianov glede na njihov antocianidinski del je bilo narejenih šest testov (X označuje katerikoli sladkor). Rezultati so pokazali, da je bila hitrost razpada Cy 3-X šestkrat statistično signifikantno nižja od Peo 3-X, Pet 3-X, Del 3-X in Mal 3-X. Konstante hitrosti razpada Peo 3-X so bile statistično signifikantno nižje v dveh od štirih testov, dvakrat statistične razlike ni bilo mogoče določiti. Konstanta hitrosti razpada za Peo 3-X je bila v štirih narejenih testih štirikrat statistično signifikantno nižja od konstant za Del 3-X in Mal 3-X. Konstante hitrosti razpada Pet 3-X so bile v enem od šestih testov statistično signifikantno nižje od Del 3-X in Mal 3-X. V ostalih petih primerih med njimi ni bilo statistično signifikantnih razlik. Med Del 3-X in Mal 3-X v nobenem od šestih narejenih testov ni bilo statistično signifikantnih razlik.

Glede na narejeno analizo je mogoče razporediti aglikone po hitrosti razpada od najnižjega do najvišjega po zaporedju: cianidinski antociani < peonidinski antociani < petunidinski antociani < delfinidinski antociani in malvidinski antociani.

Preglednica 30. Tabela statističnih razlik med nakloni degradacijskih krivulj glede na posamezen glikozidiran sladkor

Table 30. Significant statistical differences in degradation coefficients for different glycosylated sugar

Konstante hitrosti razpada [dan^{-1}]									
Identifikacija	Konstante degradacijskih krivulj za stekleno embalažo				Konstante degradacijskih krivulj za embalažo iz večslojnega kartona				
	Cy 3-Glu	$0,0091 \pm 0,0002$	*			$0,0114 \pm 0,0003$	*		
Cy 3-Gal	$0,0096 \pm 0,0002$	*			$0,0120 \pm 0,0003$	*			
Cy 3-Ara	$0,0122 \pm 0,0002$		*		$0,0147 \pm 0,0003$			*	
Peo 3-Glu	$0,0102 \pm 0,0002$	*			$0,0123 \pm 0,0003$	*			
Peo 3-Gal	$0,0110 \pm 0,0002$		*		$0,0130 \pm 0,0002$			*	
Pet 3-Glu	$0,0108 \pm 0,0002$	*			$0,0130 \pm 0,0003$	*			
Pet 3-Gal	$0,0118 \pm 0,0002$		*		$0,0134 \pm 0,0002$	*			
Pet 3-Ara	$0,0144 \pm 0,0003$			*	$0,0166 \pm 0,0004$			*	
Del 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$	*			$0,0136 \pm 0,0003$	*			
Del 3-Gal	$0,0119 \pm 0,0002$		*		$0,0142 \pm 0,0004$	*			
Del 3-Ara	$0,0149 \pm 0,0003$			*	$0,0178 \pm 0,0005$			*	
Mal 3-Glu	$0,0112 \pm 0,0002$	*			$0,0133 \pm 0,0003$	*			
Mal 3-Gal	$0,0124 \pm 0,0002$		*		$0,0154 \pm 0,0003$			*	
Mal 3-Ara	$0,0143 \pm 0,0003$			*	$0,0175 \pm 0,0004$				*

Preglednica 31. Povzetek statističnih testov za posamezen glikozidiran sladkor (A/B/C/D)

Table 31. Summary of statistical tests for different glycosylated sugars (A/B/C/D)

Vrsta glikozidiranega sladkorja	Glu	Gal	Ara
Glu	/	10/6/4/0	8/8/0/0
Gal	/	/	8/8/0/0
Ara	/	/	/

A = skupno število vseh testov

B = število testov, pri katerih je vertikalno postavljen sladkor izkazoval statistično višjo vrednost kot horizontalno predstavljen sladkor

- C = število testov, pri katerih ni bilo statistično signifikantne razlike med vertikalno in horizontalno predstavljenim sladkorjem
- D = število testov, pri katerih je vertikalno postavljen sladkor izkazoval statistično manjšo vrednost kot horizontalno predstavljen sladkor

Glede na statistično analizo je mogoče razporediti stabilnost različnost posameznih antocianov tudi glede na to, kateri sladkor imajo glikozidiran. Pri tem se je preverjalo tri sladkorje, ki so prisotni kot glikozidi v antocianih in sicer: glukozo, galaktozo in arabinozo. V šestih primerih od desetih testov se je izkazalo, da so antociani z glikozidirano glukozo bolj stabilni od tistih z glikozidirano galaktozo. V štirih primerih statistične razlike ni bilo mogoče določiti. V osmih primerih od narejenih osmih testov, pa so bili antociani z glikozidirano glukozo tudi bolj stabilni od antocianov z glikozidirano arabinozo. Prav tako so bili v osmih primerih od osmih narejenih testov antociani z glikozidirano galaktozo bolj stabilni od antocianov z glikozidirano arabinozo.

Glede na opravljene teste je mogoče razporediti antociane po konstantah hitrosti razpada glede na vrsto glikozidiranega sladkorja od najmanjšega do največjega po sledečem vrstem redu: antocianidin 3-glukozid < antocianidin 3-galaktozid < antocianidin 3-arabinozid.

4.2 NEKTAR IZ BOROVNIC, NAPOLNJEN V PET EMBALAŽO

Kot pri polnjenju v večslojni karton se tudi pri polnjenju v embalažo iz polietilen tereftalata uporablja aseptično tehnologijo, ki bazira na polnjenju pasteriziranega ohlajenega proizvoda v embalažo, ki je predhodno sterilizirana s kemijskimi sredstvi, običajno s peroksiocetno kislino.

Do pred kratkim je bila glavna ovira za polnjenje sokov in nektarjev v tako embalažo prepustnost samega polietilen tereftalata na kisik, ki je povzročil zelo hitro staranje proizvoda, spremembo barve in uničenje potencialno koristnih spojin.

Za doseganje manjše prepustnosti polietilen tereftalata so bile zato razvite različne zaščite in tehnologije, ki bazirajo na oksidabilnih, senzorično inertnih in živilsko primernih polimerih. Najpogostejša uveljavljena tehnologija je mešanje oksidabilnega polimera v osnovni PET material, kar ima za posledico to, da je lovilec kisika razporejen po celotnem telesu plastenke. Druga tehnologija, ki se je tudi uveljavila, je tehnologija koekstrudiranja, ki omogoča, da je aktivni lovilec razporejen samo v sredinskem delu plastenke, ampak tam v večjih koncentracijah.

Kot referenčni proizvod pri tej seriji analiz je bil uporabljen borovničev nektar brez dodatka aronije. Kljub temu pa ta še vedno vsebuje karakteristični profil antocianov v razmeroma velikih koncentracijah in je že sam po sebi lahko tretiran kot funkcionalno živilo. Poleg analiz antocianov, opredelitve razpada ter primerjave v stabilnosti so tu narejene tudi analize skupnih polifenolov, ki karakterizirajo to skupino, in meritve antioksidativne učinkovitosti proizvoda, ki opisuje sposobnost proizvoda za lovljenje prostih radikalov, po drugi strani pa tudi direktno kakovost proizvoda.

Za razliko od termostatiranja so bili pri tej seriji analiz vzorci skladiščeni v skladiščnem prostoru, v katerem sta temperatura in vlažnost nihala bolj kot v termostatu, in zato ni bilo mogoče opredeliti točnih funkcij razpada antocianov. Proizvod je bil napolnjen 10. 9. 2004 in nato skladiščen v običajnih pogojih približno eno leto. Posledično tudi rezultati ustrezajo realnemu stanju, kateremu je bil podvržen proizvod.

4.2.1 Analize antocianov v borovničevem nektarju

Po opisani metodi smo naredili analize prisotnih antocianov. Pri tej metodi smo kvantificirali dvanajst antocianov ter izračunali njihovo skupno vrednost. Ker so bili pogoji skladiščenja milejši, se je pokazal manjši razpad antocianov.

V tabelah je najprej opisana celotna vrednost skupnih antocianov, ki najbolj karakterizira posamezno embalažo in opisuje razpad antocianov. Nato so opisane koncentracije posameznega antociana tekom staranja proizvoda.

Za opredelitev karakterističnih razlik je bila uporabljena tehnika »multiple range test« iz analize »general linear models«. Kjer so oznake v različnih stolpcih – vertikalno – ali vrsticah – horizontalno –, obstaja signifikantna statistična razlika po LSD metodi s 95 % verjetnosti.

Preglednica 32. Koncentracije seštevka antocianov v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 32. Sum of anthocyanin concentrations in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija seštevka antocianov ^f [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	364,7	398,7	384,0	395,4	*		
12. 02. 2005	358,7	390,0	388,2	392,0	*		
01. 06. 2005	191,1	262,8	246,6	247,5		*	
15. 09. 2005	60,5	79,7	85,7	79,2			*
		*	*	*			
	*						

^f Skupna koncentracija antocianov je bila preračunana iz seštevka koncentracij posameznih antocianov.

V preglednici 32 so predstavljeni rezultati seštevka posameznih antocianov v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja. Viden je trend razpada antocianov s časom, saj po letu dni skladiščenja ostaja v proizvodu samo še 17–22 % začetne vrednosti antocianov. Referenčna embalaža brez lovilca kisika ima najnižjo vrednost koncentracije, medtem ko pri ostalih treh embalažah ni bilo zaznani statistično signifikantnih razlik. Glede na čas antociani med prvima dvema meritvama skoraj ne razpadajo, opazen padec pa je viden pri naslednjih meritvah.

Opisani trend je viden bolj ali manj pri vseh individualnih antocianih. Vrednosti končnih razpadov nihajo v odvisnosti od posameznega antociana.

Preglednica 33. Koncentracija Del 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 33. Del 3-Gal concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Del 3-Gal ^a [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	49,7	54,9	52,5	54,1	*		
12. 02. 2005	49,5	54,3	54,0	54,6	*		
01. 06. 2005	25,7	37,1	34,0	34,1		*	
15. 09. 2005	7,8	10,5	11,4	10,5			*
		*	*	*			
	*						

^a Koncentracija je preračunana na delfinidin 3-glukozid.

Preglednica 34. Koncentracija Del 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 34. Del 3-Glu concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Del 3-Glu ^a [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	62,3	68,7	65,9	67,9	*		
12. 02. 2005	62,2	68,2	67,7	68,5	*		
01. 06. 2005	33,2	47,3	44,0	44,2		*	
15. 09. 2005	10,6	14,7	15,7	14,5			*
		*	*	*			
	*						

^a Koncentracija je preračunana na delfinidin 3-glukozid.

Preglednica 35. Koncentracija Cy 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 35. Cy 3-Gal concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Cy 3-Gal ^b [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	30,9	33,4	32,3	33,1	*		
12. 02. 2005	30,1	32,3	32,2	32,5	*		
01. 06. 2005	17,6	22,7	21,4	21,4		*	
15. 09. 2005	6,1	7,8	8,3	7,7			*
		*	*	*			
	*						

^b Koncentracija je preračunana na cianidin 3-glukozid.

Preglednica 36. Koncentracija Del 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 36. Del 3-Ara concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Del 3-Ara ^a [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	43,4	48,7	46,3	48,1	*		
12. 02. 2005	43,3	48,2	47,8	48,4	*		
01. 06. 2005	20,3	30,8	28,6	28,7		*	
15. 09. 2005	5,2	7,3	7,9	7,2			*
		*	*	*			
	*						

^a Koncentracija je preračunana na delfinidin 3-glukozid.

Preglednica 37. Koncentracija Cy 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 37. Cy 3-Glu concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Cy 3-Glu ^b [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	48,3	52,0	50,5	51,7	*		
12. 02. 2005	47,1	50,5	50,2	50,7	*		
01. 06. 2005	26,4	34,1	33,4	33,4		*	
15. 09. 2005	9,2	11,9	12,7	11,9			*
		*	*	*			
	*						

^b Koncentracija je preračunana na cianidin 3-glukozid.

Preglednica 38. Koncentracija Pet 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 38. Pet 3-Gal concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Pet 3-Gal ^c [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	13,6	14,9	14,4	14,9	*		
12. 02. 2005	13,4	14,7	14,6	14,7	*		
01. 06. 2005	7,1	10,0	9,4	9,4		*	
15. 09. 2005	2,3	3,1	3,1	2,8			*
		*	*	*			
	*						

^c Koncentracija je preračunana na petunidin 3-glukozid.

Preglednica 39. Koncentracija Cy 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 39. Cy 3-Ara concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Cy 3-Ara ^b [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	30,0	32,6	31,5	32,4	*		
12. 02. 2005	29,2	31,5	31,3	31,7	*		
01. 06. 2005	15,3	20,3	19,0	19,0		*	
15. 09. 2005	4,5	5,5	6,1	5,6			*
		*	*	*			
	*						

^b Koncentracija je preračunana na cianidin 3-glukozid.

Preglednica 40. Koncentracija Pet 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 40. Pet 3-Glu concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Pet 3-Glu ^c [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	33,0	36,2	34,9	35,9	*		
12. 02. 2005	32,6	35,5	35,5	35,9	*		
01. 06. 2005	17,8	24,7	23,0	23,2		*	
15. 09. 2005	6,0	7,6	8,3	7,7			*
		*	*	*			
	*						

^c Koncentracija je preračunana na petunidin 3-glukozid.

Preglednica 41. Koncentracija Peo 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 41. Peo 3-Glu concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Peo 3-Glu [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	11,6	12,5	12,1	12,5	*		
12. 02. 2005	11,3	12,1	12,0	11,8	*		
01. 06. 2005	6,3	8,1	7,6	7,6		*	
15. 09. 2005	2,1	2,7	2,8	2,6			*
		*	*	*			
	*						

^d Koncentracija je preračunana na peonidin 3-glukozid.

Preglednica 42. Koncentracija Mal 3-Gal v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 42. Mal 3-Gal concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Mal 3-Gal ° [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	12,2	13,2	12,8	13,1	*		
12. 02. 2005	11,9	12,7	12,7	12,8	*		
01. 06. 2005	6,4	8,5	7,9	8,0		*	
15. 09. 2005	2,1	2,7	2,8	2,6			*
		*	*	*			
	*						

° Koncentracija je preračunana na malvidin 3-glukozid

Preglednica 43. Koncentracija Mal 3-Glu v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 43. Mal 3-Glu concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Mal 3-Glu ° [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	33,9	36,8	35,6	36,6	*		
12. 02. 2005	33,0	35,6	35,5	35,9	*		
01. 06. 2005	17,7	23,6	22,1	22,3		*	
15. 09. 2005	5,5	7,2	7,8	7,2			*
		*	*	*			
	*						

° Koncentracija je preračunana na malvidin 3-glukozid

Preglednica 44. Koncentracija Mal 3-Ara v odvisnosti od vrste embalaže in datuma vzorčenja z GLM statistično obdelavo

Table 44. Mal 3-Ara concentration in correlation with packaging type and sampling date with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija Mal 3-Ara ° [mg/l]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	7,2	8,0	7,7	8,0	*		
12. 02. 2005	7,1	7,7	7,7	7,8	*		
01. 06. 2005	3,0	4,5	4,1	4,2		*	
15. 09. 2005	0,6	0,9	1,1	1,0			*
		*	*	*			
	*						

° Koncentracija je preračunana na malvidin 3-glukozid.

Antocian, ki glede na predstavljene tabele najhitreje razpada, je malvidin 3-arabinozid, ki pri referenčni PET 1 embalaži predstavlja na koncu samo 8 % izmerjene vrednosti. Pri antocianu, katerega razpad je najpočasnejši – prav tako za referenčno PET 1 embalažo –, predstavlja končna vrednost, merjena 15. 9. 2005, 16 % izmerjene vrednosti. Pri embalažah z lovilci kisika je končna vrednost malvidin 3-glukozida do 14 %, cianidin 3-galaktozida pa do 22 %.

4.2.1.1 Normalizirana razlika procentualnih deležev pri različnih antocianih

Ker je iz samih tabel težko rangirati stabilnost antocianov, je bil za ta namen najbolj primeren kvocient relativnih deležev antociana v proizvodu, analiziranim s prvo in zadnjo analizo. Kot rezultat smo tako dobili procentualno spremembo posameznega antociana. Pri tem nastala razporeditev opisuje tudi spreminjanje barve, saj imajo posamezni antociani karakteristični absorpcijski maksimum, in s tem tudi karakteristično barvo, ki se tekom staranja spreminja.

$$x [\%] = ((c_x / \sum_{ij} c_{ij}) / (c_0 / \sum_{kl} c_{kl})) * 100 - 100$$

c_x – koncentracija antociana x na datum 01. 09. 2005

$\sum_{ij} c_{ij}$ – seštevek koncentracij individualnih antocianov na datum 01. 09. 2005

c_0 – koncentracija antociana x na datum 22. 12. 2004

$\sum_{kl} c_{kl}$ – seštevek koncentracij individualnih antocianov na datum 22. 12. 2004

Preglednica 45. Normalizirane razlike med procentualnimi koncentracijami antocianov med datumi vzorčenja 22. 12. 2004 in 01. 09. 2005 z GLM statistično obdelavo

Table 45. Normalized differences between relative anthocyanin concentrations sampled on 22. 12. 2004 and 01. 09. 2005 with GLM statistical evaluation

Antocian	Normalizirana relativna sprememba x [%]									
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4						
Mal 3-Ara	-52,3	-44,4	-33,9	-35,8	*					
Del 3-Ara	-27,6	-24,6	-23,4	-25,3		*				
Cy 3-Ara	-9,0	-15,0	-13,0	-13,2			*			
Del 3-Gal	-6,0	-3,8	-2,4	-3,3				*		
Mal 3-Glu	-2,2	-2,7	-2,0	-1,4				*		
Pet 3-Gal	3,1	4,7	-2,8	-4,5				*		
Mal 3-Gal	1,9	2,4	-1,4	-0,2				*		
Del 3-Glu	2,8	6,7	6,8	6,6					*	
Peo 3-Glu	8,4	6,4	4,5	4,5					*	
Pet 3-Glu	9,9	5,5	7,2	7,6					*	
Cy 3-Glu	14,9	14,4	12,7	14,6						*
Cy 3-Gal	18,7	17,4	14,7	16,0						*

Iz tabele je vidno, da se relativni deleži posameznega antociana tekom staranja spremenijo. Tako se delež cianidin 3-galaktozida glede na skupno koncentracijo antocianov na določen datum skladiščenja poveča tudi za 19 %, delež malvidin 3-arabinozida pa zmanjša tudi za 52 %. Takim spremembam botruje različna stabilnost posameznih antocianov, ki jih opisuje statistična analiza signifikantnih razlik.

Antociane lahko po stabilnosti razporedimo v več skupin. Najbolj stabilna sta cianidin 3-glukozid in cianidin 3-galaktozid. Sledijo jima peonidin 3-glukozid, petunidin 3-glukozid in delfinidin 3-glukozid. Naslednjo skupino predstavljajo petunidin 3-galaktozid, delfinidin 3-galaktozid, malvidin 3-galaktozid in malvidin 3-glukozid. Sledijo pa jim trije arabinozidi: cianidin 3-arabinozid, delfinidin 3-arabinozid in malvidin 3-arabinozid.

4.2.2 Analize antioksidativne učinkovitosti po metodi DPPH v borovničevem nektarju

Antioksidativno aktivnost ekstraktov smo določali z uporabo DPPH reagenta tako, da smo primerjalno spremljali razbarvanje (stopnjo bledenja) stabilnega prostega radikala 2,2-difenil-1-kiprilhidrazila (DPPH). Radikal DPPH, ki absorbira pri valovni dolžini 515 nm, se v reakciji z antioksidativnimi učinkovinami vzorcev reducira in absorbcija se manjša.

Metoda je zelo primerna za karakterizacijo oksidacije in sistema, saj so radikali DPPH direktna konkurenca kisiku v pregledovanem sistemu in, ker je bil napolnjen proizvod v vseh vrtsah embalaže enak, lahko karakterizirajo funkcijo embalaže.

Preglednica 46. Antioksidativna učinkovitost merjena po DPPH metodi v borovničevem nektarju pri različnih vzorčenjih in z GLM statistično obdelavo

Table 46. Antioxidant activity measured by DPPH method in blueberry nectar in correlation with different samplings with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Skupna antioksidativna učinkovitost [%]				*			
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4				
22. 12. 2004	36,36 ± 0,00	36,24 ± 0,05	36,63 ± 0,06	36,98 ± 0,03	*			
12. 02. 2005	35,51 ± 0,07	36,29 ± 0,03	36,43 ± 0,04	36,46 ± 0,05		*		
01. 06. 2005	30,65 ± 0,04	32,45 ± 0,10	32,16 ± 0,07	32,92 ± 0,04			*	
15. 09. 2005	27,65 ± 0,08	28,60 ± 0,04	28,99 ± 0,05	29,10 ± 0,03				*
	*							
		*	*					
				*				

Iz preglednice 46 je razvidna antioksidativna učinkovitost sistema. Ta se tekom skladiščenja zmanjšuje, saj se dostopni antioksidanti že porabijo. V referenčnem pakiranju se kapaciteta lovljenja prostih radikalov oz. antioksidativna učinkovitost zmanjša za 8,7 %, v najbolje rangirani PET 4 embalaži pa za 7,9 %. Ker ima metoda razmeroma zelo majhno standardno deviacijo, je izredno občutljiva na vsako spremembo kakovosti. Tako nakazuje statistično razliko med referenčno PET 1 embalažo, embalažama PET 2 in PET 3 ter med embalažo PET 4, ki je po sistemu antioksidativne zaščite rangirana najboljše. Metoda tudi natančno opisuje statistične spremembe med različnimi termini vzorčenja, pri čemer je razvidno, da s staranjem proizvod izgublja na sposobnosti lovljenja radikalov, s tem pa tudi svojo funkcionalno vrednost glede na žive sisteme. Iz tabele je mogoče razbrati, da so razlike tekom staranja precej večje kot razlike med posameznimi vrstami embalaže.

4.2.3 Analize skupnih fenolov kot ekvivalenta galne kisline v borovničevem nektarju

Metoda določanja skupnih fenolov temelji na oksidaciji fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Ker so v rastlinskih sistemih fenoli pogosti in zelo različni, se je za primerjanje vsebnosti skupnih fenolov uveljavilo primerjanjem z galno kislino – ekvivalentom skupnih fenolov.

Preglednica 47. Meritve skupnih polifenolov v borovničevem nektarju pri različnih vzorčenjih in z GLM statistično obdelavo

Table 47. Concentration of total polyphenols in blueberry nectar in correlation with different samplings with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija skupnih polifenolov [mg/l] izražena kot ekvivalent galne kisline						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	650	669	681	657	*		
12. 02. 2005	656	664	649	653	*	*	
01. 06. 2005	626	668	628	621		*	*
15. 09. 2005	592	623	625	623			*
	*		*	*			
		*	*	*			

Iz tabele 47 je razvidno, da se koncentracija skupnih fenolov tekom staranja proizvoda zniža za 34–58 mg/l. Razvidne so razlike med PET 1 in PET 2, glede na vrsto embalaže ter med datum vzorčenja. Korelacija v tem primeru zaradi majhnih koncentracijskih razlik ni najbolj primerna za karakterizacijo kakovosti proizvoda, saj je 300 mg/l antocianov, ki so razpadli, tu kvantificiranih s 60 mg/l ekvivalenta galne kisline. To nam nakazuje, da so razpadni produkti antocianov še vedno fenoli, ki jih zajema predpisana metoda.

4.3 POMARANČNI SOK, NAPOLNJEN V PET EMBALAŽO

Tudi pomarančni sok je bil po pilotnem aseptičnem tehnološkem postopku napolnjen v embalažo iz polietilen tereftalata. Za pomarančni sok, z izjemo soka rdeče pomaranče, je znano, da ne vsebuje večje količine antocianov, ampak mu dajejo barvo karotenoidi, ki sicer niso fenoli, kljub temu pa so antioksidanti, ki imajo vpliv na žive organizme. Poleg tega so nekateri karotenoidi tudi provitamini A, ki so esencialni za delovanje človeškega organizma. Poleg karotenoidov vsebuje pomarančni sok tudi različne fenole, kot so flavonoidi in fenolne kisline, ter druge antioksidante, med katerimi je zelo dobro zastopana askorbinska kislina.

4.3.1 Analize karotenoidov v pomarančnem soku, napolnjenem po aseptični tehnologiji

V pomarančnem soku je mogoče po razviti metodi uspešno kvantificirati provitamin A: β -karoten in β -kriptoksantin ter dva ksantofila: lutein in zeaksantin. Priprava vzorcev za določitev spodnjih rezultatov je potekala s saponifikacijo in internim standardom, ki omogoča kvantifikacijo višjih izkoristkov ekstrakcij, kot jih omogoča metoda brez saponifikacije.

Po 5,5 mesecih skladiščenja je bila izdelana primerjava koncentracij izbranih karotenoidov.

Preglednica 48. Koncentracija posameznega karotenoida v odvisnosti od vrste embalaže, vzorčena 22. 02. 2005, v pomarančnem soku z GLM statistično analizo

Table 48. Individual carotenoid concentration in orange juice in different packaging sampled on 22.02.2005 with GLM statistical evaluation

Identifikacija karotenoida	Koncentracija posameznega karotenoida na datum 22. 02. 2005 [mg/l]			
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4
zeaksantin	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01
lutein	0,38 ± 0,02	0,43 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,65 ± 0,01
β -kriptoksantin	0,20 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,00	0,30 ± 0,01
β -karoten	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,02
	*			
		*	*	
			*	*

Iz preglednice 48 je mogoče videti, da se koncentracije različnih karotenoidov pri embalažah z različnimi prepustnostmi kisika in antioksidativno razliko razlikujejo. To potrjuje dejstvo, da so karotenoidi tudi antioksidanti, saj različne količine dostopnega kisika vplivajo na različen obseg razpada karotenoidov. Najmanjše vsebnosti karotenoidov po določenem času ima tako proizvod, napolnjen v referenčni PET 1, največje pa proizvod, napolnjen v PET 3 in PET 4.

4.3.2 Analize antioksidativne učinkovitosti v pomarančnem soku, napolnjenem po aseptični tehnologiji

Tako kot pri borovničevem nektarju tudi pri pomarančnem soku antioksidativna učinkovitost opisuje sposobnost sistema za lovljenje prostih radikalov. Glavna razlika med borovničevim nektarjem in pomarančnim sokom je sestava proizvoda, saj ima pomarančni sok 100-odstotni sadni delež, medtem ko ima borovničev nektar 30-odstotni sadni delež.

Preglednica 49. Antioksidativna učinkovitost, merjena po DPPH metodi, v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo

Table 49. Antioxidant activity measured by DPPH method in orange juice in correlation with different samplings and packaging materials with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Skupna antioksidativna učinkovitost [%]						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	35,11 ± 0,18	36,17 ± 0,12	36,39 ± 0,08	34,30 ± 0,05	*		
12. 02. 2005	29,66 ± 0,20	32,67 ± 0,04	34,16 ± 0,04	33,10 ± 0,04		*	
01. 06. 2005	23,45 ± 0,14	32,00 ± 0,06	30,14 ± 0,10	30,06 ± 0,16			*
15. 09. 2005	18,80 ± 0,06	25,13 ± 0,05	26,43 ± 0,10	26,43 ± 0,12			*
	*						
		*	*	*			

Iz preglednice je razvidno, da se podobno kot pri borovničevem nektarju kapacitete lovljenja prostih radikalov s časom spreminjajo. Iz tega je mogoče sklepati, da se koncentracija antioksidantov manjša. S primerjavo med različnimi vrstami embalaže je mogoče določiti razliko samo pri referenčni embalaži; embalaže z dodatno zaščito pred kisikom izkazuje iste vrednosti.

V primerjavi z borovničevem nektarjem so vrednosti antioksidativne učinkovitosti razmeroma podobne, kar postavlja borovničev nektar, kljub samo 40 % sadnega deleža, na isti rang vpliva na žive organizme kot pomarančni sok.

4.3.3 Analize skupnih fenolov kot ekvivalenta galne kisline v pomarančnem soku

Ker v pomarančnem soku ni antocianov, prevzemajo vlogo fenolnih snovi druge komponente, kot so flavonoidi in fenolne kisline, zato je primerjava z galno kislino mogoče primernejši faktor. Med flavonoidi je v večjih koncentracijah prisoten hesperidin, ki je vsaj delno podvržen razpadu, medtem ko koncentracije kislin s časom naraščajo.

Preglednica 50. Meritve skupnih polifenolov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo

Table 50. Concentration of total polyphenols in orange juice in correlation with different samplings with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija skupnih polifenolov [mg/l], izražena kot ekvivalent galne kisline						
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4			
22. 12. 2004	677	701	687	713	*		
12. 02. 2005	678	697	715	729	*		
01. 06. 2005	635	685	677	678		*	
15. 09. 2005	608	637	651	666			*
	*						
		*	*				
			*	*			

V tabeli 50 so vidni razpadi fenolov, ki variirajo v 13 mesecih skladiščenja do 69 mg/l. Razlike pri staranju so najbolj vidne pri zadnjih dveh meritvah. Glede na občutljivost na kisik so fenoli najboljše zaščiteni v večslojnih embalažah PET 3 in PET 4, kljub temu, da med PET 2 in PET 3 ni bilo zaslediti statistične razlike. Referenčna platenka nudi fenolnim spojinam najslabšo zaščito.

4.3.4 Analize askorbinske kisline v pomarančnem soku

Ena najbolj standardnih in največkrat uporabljenih analiz kakovosti sokov in nektarjev ter vplivov staranja je meritev askorbinske kisline, ki se v živilski industriji masovno uporablja kot antioksidant in pomeni zaščito pred staranjem proizvoda. Po drugi strani lahko askorbinska kislina tudi sama pri prevelikem doziranju povzroči temnenje proizvoda, saj se po mehanizmih neencimskega temnenja pretvarja v rjave melanoidne produkte, katerim je intermediat HMF.

Kljub temu pa je razpad askorbinske kisline eden od koristnih parametrov vrednotenja spreminjanja kakovosti proizvoda.

Preglednica 51. Meritve askorbinske kisline v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih z GLM statistično obdelavo

Table 51. Concentration of ascorbic acid in orange juice measured in samples in different packaging materials frozen at different time periods with GLM statistical evaluation

Datum vzorčenja	Koncentracija askorbinske kisline [mg/l]				
	PET 1	PET 2	PET 3	PET 4	
22. 12. 2004	464	464	528	481	*
12. 02. 2005	460	460	502	472	*
01. 06. 2005	340	460	410	417	*
15. 09. 2005	166	305	244	281	*
	*				
		*	*	*	

Koncentracija askorbinske kisline se s staranjem v večji meri izniči, v primeru referenčne plastenke je razlika med prvo in zadnjo meritvijo 299 mg/l. Referenčna plastenka se med različnimi analiziranimi plastenkami edina razlikuje od ostalih, med katerimi se razlike niso pokazale. Po porazdelitvi rezultatov se analize askorbinske kisline ujemajo z rezultati, prikazanimi v tabeli antioksidativne učinkovitosti, zato je verjetno, da večji del antioksidativne učinkovitosti predstavlja askorbinska kislina.

Po drugi strani je nerazlikovanje plastenk glede na različno prepustnost kisika tudi indikator, da askorbinska kislina ne razpada samo pod vplivom oksidacije s kisikom, pač pa njenemu razpadu botrujejo tudi drugi vplivi.

4.4 POMARANČNI SOK, NAPOLNJEN V STEKLENO EMBALAŽO IN EMBALAŽO IZ VEČSLOJNEGA KARTONA

Pomarančni sok je bil napolnjen v stekleno embalažo po tehnologiji vročega polnjenja ter v embalažo iz večslojnega kartona po tehnologiji aseptičnega polnjenja. Tehnologija vročega polnjenja je opisana v poglavju Pregled objav, od primerjane aseptične tehnologije se razlikuje predvsem v tem, da je proizvod izpostavljen višjim temperaturam več časa kot pri aseptičnem polnjenju. Po drugi strani velja steklena embalaža za kakovostnejšo, saj skozi svoje stene ne prepušča kisika, kot ga – posebno na spojih – prepušča embalaža iz večslojnega kartona.

V tako napolnjenih vzorcih so se preverjali različni parametri, kot so HMF, fenolne kisline, flavonoidi in karotenoidi. Ti parametri so bili izbrani z namenom ovrednotenja zdravilnih fenolnih in karotenoidnih substanc ter kakovosti in staranja samega. Običajni parametri za preverjanje starosti proizvoda so produkti Maillardove reakcije, kot je HMF.

4.4.1 Meritve HMF

HMF je intermediat Maillardove reakcije, ki lahko ima več izhodnih substanc, kot so sladkorji, proteini, pa tudi fenoli ali askorbinska kislina. Razpad teh substanc je povezan z nastankom rjavih melanoidnih pigmentov, ki v proizvodu niso zaželeni, saj spreminjajo rumenooranžno karotenoidno barvo v rjavkaste odtenke.

Količina HMF-ja, ki se uporablja za ovrednotenje sprejemljivosti proizvoda, je običajno 10 mg/l.

Preglednica 52. Meritve HMF v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 52. Concentration of HMF in orange juice measured in glass and frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija [mg/l]	Čas termostatiranja [dan]						
	0	22	55	69	84	113	147
HMF	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,3	2,5 ± 0,4
	*	*	*	*			
			*	*	*		
				*	*	*	
					*	*	*
							*

Meritve HMF-ja v pomarančnem soku, napolnjenem v steklo, nam nakazujejo močno povezanost koncentracije s časom termostatiranja, saj koncentracija tekom staranja naraste od 0,2 do 2,5 mg/l. Največje spremembe so vidne pri zadnjih analizah, kar nam kaže na to, da funkcija ni linearna.

Preglednica 53. Meritve HMF v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 53. Concentration of HMF in orange juice measured in carton and frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija [mg/l]							
	Čas termostatiranja [dan]						
	0	14	29	58	92	134	184
HMF	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,7 ± 0,1
	*	*					
		*	*	*			
					*		
						*	
							*

Iz preglednice 53 je vidno podobno kot pri rezultatih meritev za stekleno embalažo. Koncentracija s časom narašča od izredno nizkih vrednosti, ki so bile prisotne ob polnjenju, do vrednosti 2,7 mg/l po 184 dnevih termostatiranja.

Preglednica 54. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za HMF v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 54. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for HMF in products measured in different packaging

	HMF					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	-0,014 ± 0,001	*		-0,024 ± 0,002	*	
steklo	-0,015 ± 0,001	*		-0,016 ± 0,001		*
p	0,6606			0,0028		

4.4.2 Meritve fenolnih kislin

V pomarančnem soku se je določilo in kvantificiralo p-kumarno in ferulno kislino; obe sta hidroksicimetni kislini. V primerjavi z ostalimi flavonoidi imata ti dve kislini manjšo molsko maso.

V preglednicah 55 in 56 so predstavljene koncentracije omenjenih fenolnih kislin v produktih, napolnjenih v stekleno embalažo in embalažo iz večslojnega kartona.

Preglednica 55. Meritve fenolnih kislin v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 55. Concentrations of phenolic acids in orange juice measured in glass frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija fenolnih kislin [mg/l]							
Vrsta fenolne kisline	Čas termostatiranja [dan]						
	0	22	55	69	84	113	147
p-kumarna kislina	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,0 ± 0,2	7,4 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,9 ± 0,0
	*	*		*			
			*				
					*	*	
							*
ferulna kislina	5,7 ± 0,2	5,5 ± 0,5	8,4 ± 0,1	8,6 ± 0,5	9,6 ± 0,1	9,6 ± 0,3	9,5 ± 0,5
	*	*					
			*				
				*			
					*	*	*

V pomarančnem soku, napolnjenem v stekleno embalažo, se koncentracija p-kumarne kisline poveča za 1 mg/l, koncentracija ferulne kisline pa za približno 3,8 mg/l.

Preglednica 56. Meritve fenolnih kislin v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 56. Concentrations of phenolic acids in orange juice measured in carton frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija fenolnih kislin [mg/l]							
Vrsta fenolne kisline	Čas termostatiranja [dan]						
	0	14	29	58	92	134	184
p-kumarna kislina	5,6 ± 0,0	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,0
	*	*					
	*		*				
			*	*			
				*	*		
						*	
							*
ferulna kislina	4,1 ± 0,0	4,6 ± 0,1	5,7 ± 0,2	6,4 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,5 ± 0,2	9,0 ± 0,3
	*						
		*					
			*				
				*			
					*		
						*	
							*

Podobno kot v stekleni embalaži se tudi v embalaži iz večslojnega kartona koncentracija fenolnih kislin poveča. Koncentracija p-kumarne kisline se v produktu, napolnjenem v večslojni karton, poveča za 1 mg/l, medtem ko se koncentracija ferulne kisline poveča za 4,9 mg/l.

Preglednica 57. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za p-kumarno kislino v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 57. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for p-coumaric acid in products measured in different packaging

	p-kumarna kislina					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	-0,0055 ± 0,0004	*		-0,0009 ± 0,0001	*	
steklo	-0,0071 ± 0,0008	*		-0,0010 ± 0,0001	*	
p	0,0614			0,6477		

Preglednica 58. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za ferulno kislino v produktih, napoljenih v različno vrsto embalaže

Table 58. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for ferulic acid in products measured in different packaging

	ferulna kislina					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$-0,025 \pm 0,001$	*		$-0,0039 \pm 0,0003$	*	
steklo	$-0,032 \pm 0,004$	*		$-0,0043 \pm 0,0006$	*	
p	0.0594			0,5073		

Če primerjamo koncentracije glede na polnjenje v stekleno in tetrapak embalažo, je pri obeh kislinah vidna razlika v njunih začetnih koncentracijah. V večslojnem kartonu je koncentracija p-kumarne kisline nižja za 1,3 mg/l, ferulna pa 1,6 mg/l. Glede na uporabo regresijskih premic tako pri aplikaciji linearne kot eksponentne funkcije ni prišlo do statistično signifikantnih razlik s 95 % verjetnostjo.

4.4.3 Meritve flavonoidov

Flavonoli v sadju so sekundarni rastlinski metaboliti in so znani po svoji antioksidativni učinkovitosti. Lahko so glukozidirani ali pa v aglikonski obliki. V pomarančnem soku je bilo po omenjeni metodi mogoče kvantificirati tri flavonoide: hesperidin, narirutin in eriocitrin. V pomarančnem soku formirajo razmeroma trpek ali grenak okus, značilen za pomarančo, še posebej njen olupek. Prav tako kot fenolne kisline se je preverjalo vpliv staranja in vrste embalaže na vsebnost flavonoidov. Rezultati so opisani v preglednicah 59 in 60.

Preglednica 59. Meritve flavonoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v stekleni embalaži z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 59. Concentrations of flavonoids in orange juice measured in glass frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija flavonoidov [mg/l]							
Vrsta flavonoida	Čas termostatiranja [dan]						
	0	22	55	69	84	113	147
eriocitrin	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,4	6,1 ± 0,2	6,1 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,4 ± 0,4
	*	*	*	*		*	
			*	*	*	*	*
narirutin	62,8 ± 1,3	60,7 ± 1,2	59,9 ± 1,2	59,6 ± 1,8	63,0 ± 0,8	62,5 ± 0,3	63,2 ± 0,3
		*	*	*			
		*				*	
	*				*	*	*
hesperidin	110,7 ± 2,1	75,0 ± 1,6	74,5 ± 0,8	72,9 ± 2,3	66,6 ± 3,3	69,7 ± 0,6	73,3 ± 0,4
					*	*	
		*	*	*			*
	*						

Preglednica 60. Meritve flavonoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 60. Concentrations of flavonoids in orange juice measured in carton frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija flavonoidov [mg/l]							
Vrsta flavonoida	Čas termostatiranja [dan]						
	0	14	29	58	92	134	184
eriocitrin	4,8 ± 0,2	5,1 ± 0,5	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,5 ± 0,0	5,4 ± 0,2	5,8 ± 0,2
	*	*					
		*	*	*	*	*	
				*	*	*	*
narirutin	45,4 ± 0,3	44,2 ± 0,5	43,0 ± 1,3	44,7 ± 0,1	44,6 ± 0,4	44,6 ± 1,0	45,0 ± 0,1
			*				
		*		*	*	*	*
	*			*	*	*	*
hesperidin	116,3 ± 1,5	85,7 ± 1,6	82,7 ± 2,3	77,6 ± 2,1	74,4 ± 0,3	70,8 ± 2,6	73,0 ± 1,9
	*						
		*	*				
				*	*		
					*	*	
						*	*

Meritve koncentracij v odvisnosti od časa kažejo le majhne in včasih celo nestatistične spremembe koncentracij za eriocitrin in narirutin. Zanju bi se lahko reklo, da njuna koncentracija s staranjem ostaja razmeroma enaka. Iz meritev tudi ni mogoče povzeti matematičnih funkcij trendov, ki bi narekovali vplive spreminjanja njihovih koncentracij. Razvidna je samo začetna razlika v koncentracijah, ki je lahko pogojena z različno toplotno obdelavo ali z variacijami surovinskih sestav. Tako je začetna koncentracija eriocitrina v pomarančnem soku, napolnjenem v steklo, 5,9 mg/l ter večslojni karton, 4,8 mg/l. Koncentracija narirutina pa je 62,8 mg/l pri polnjenju proizvoda v steklo ter 45,4 mg/l pri polnjenju v večslojni karton.

Po drugi strani je začetna koncentracija hesperidina pri obeh embalažah razmeroma podobna, se pa takoj po polnjenju zelo hitro zniža, kar pomeni, da je hesperidin razpadel ali se pretvoril v druge vrste – najverjetneje fenolnih – substanc.

Regresijska analiza naklonov premic za eksponentno funkcijo in linearno funkcijo ne kaže nikakršnih razlik med večslojnim kartonom in stekleno embalažo. Kaže pa majhno naraščanje koncentracije v primeru eriocitrina, stabilno koncentracijo v primeru narirutina in padanje koncentracije v primeru hesperidina.

Vrednosti p za posamezne pare naklonov so razmeroma visoke, zato je statistično zelo malo verjetno, da bi imela vrsta embalaže vpliv na spreminjanje koncentracije opisanih flavonoidov.

Preglednica 61. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za eriocitrin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 61. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for eriocitrin in products measured in different packaging

	eriocitrin					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$-0,0038 \pm 0,0008$	*		$-0,0007 \pm 0,0001$	*	
steklo	$-0,0038 \pm 0,0011$	*		$-0,0006 \pm 0,0002$	*	
p	0,9756			0,6746		

Preglednica 62. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za narirutin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 62. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for narirutin in products filled into different packaging

	narirutin					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$-0,003 \pm 0,003$	*		$-0,0001 \pm 0,0001$	*	
steklo	$-0,011 \pm 0,008$	*		$-0,0002 \pm 0,0001$	*	
p	0,2864			0,4028		

Preglednica 63. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za hesperidin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 63. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for hesperidin in products filled into different packaging

	hesperidin					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$0,16 \pm 0,04$	*		$0,0019 \pm 0,0004$	*	
steklo	$0,19 \pm 0,05$	*		$0,0022 \pm 0,0006$	*	
p	0,6492			0,6340		

4.4.4 Meritve karotenoidov

Karotenoidi so izoprenski pigmenti rumenooranžne barve, ki so znani tudi kot antioksidanti in imajo fitofarmaceutski vpliv na človeški organizem. Poleg tega sta β -karoten in β -kriptoksantin provitamina vitamina A, ki je esencialen za delovanje človeškega organizma. Njuno uničenje pomeni spreminjanje barve in osiromašenje proizvoda. Kvantificirana sta bila dva karotena: β -karoten in β -kriptoksantin in dva ksantofila: lutein in zeaksantin.

Spreminjanje koncentracij karotenoidov tekom termostatiranja glede na vrsto embalaže je vidno v preglednicah 64 in 65.

Preglednica 65. Meritve karotenoidov v pomarančnem soku pri različnih vzorčenjih v večslojnem kartonu z ANOVA in MRT statistično obdelavo

Table 65. Concentrations of carotenoids in orange juice measured in carton frozen at different time periods with ANOVA and MRT statistical evaluation

Koncentracija karotenoidov [mg/l]						
Vrsta karotenoida	Čas termostatiranja [dan]					
	0	14	29	92	134	184
zeaksantin	0,11 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00
	*					
		*				
			*			
				*	*	
						*
lutein	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01
	*	*	*	*	*	
			*	*	*	*
β-kriptoksantin	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	*	*				
		*	*	*		
				*	*	*
β-karoten	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	*	*	*			
				*	*	
				*		*

Pri vseh štirih karotenoidih je viden njihov razpad s staranjem. Ker je metoda temeljila na zelo nizkih koncentracijah, je njihova standardna deviacija razmeroma visoka in nekatere spremembe niso statistično značilne.

Glede na začetne in končne koncentracije so razvidni razmeroma različni razpadi posameznega antociana, iz česar lahko sklepamo, da so nekateri karotenoidi bolj stabilni od drugih. Tako je največje razpade mogoče opaziti pri zeaksantinu – tudi do 60 % –, manjše pa pri obeh karotenihi – do 45 %. Najmanj razpada lutein – do 10 %. Grafi relativnih sprememb razpadov glede na antocian so v prilogah.

Če z regresijsko primerjavo naklonov primerjamo posamezne razpade posameznih antocianov v obeh testiranih embalažah, ne najdemo statistično signifikantnih razlik med

obema vrstama embalaže. Razlike v začetnih koncentracijah je mogoče pripisati tako različni toplotni obdelavi kot tudi nihanju sadnega deleža med različnimi sestavami. Primerjave naklonov so vidne v preglednicah 66, 67, 68 in 69.

Preglednica 66. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za zeaxantin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 66. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for zeaxanthin in products filled into different packaging

	zeaxantin					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$0,00037 \pm 0,00005$	*		$0,0051 \pm 0,0004$	*	
steklo	$0,00033 \pm 0,00004$	*		$0,0054 \pm 0,0005$	*	
p	0,4942			0,7575		

Preglednica 67. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za lutein v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 67. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for lutein in products filled into different packaging

	lutein					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$0,00011 \pm 0,00003$	*		$0,0005 \pm 0,0001$	*	
steklo	$0,00014 \pm 0,00003$	*		$0,0006 \pm 0,0001$	*	
p	0,4961			0,5214		

Preglednica 68. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za β -kriptoksantin v produktih, napolnjenih v različno vrsto embalaže

Table 68. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for β -cryptoxanthin in products filled into different packaging

	β -kriptoksantin					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$0,00028 \pm 0,00005$	*		$0,0020 \pm 0,0004$	*	
steklo	$0,00022 \pm 0,00004$	*		$0,0017 \pm 0,0003$	*	
p	0,4345			0,4921		

Preglednica 69. Statistična primerjava regresijskih naklonov premic linearne in eksponentne funkcije za β -karoten v produktih, napoljenih v različno vrsto embalaže

Table 69. Comparison of regression lines of linear and exponential functions for β -carotene in products filled into different packaging

	β -karoten					
	k_{lin}			k_{exp}		
tetrapak	$0,00029 \pm 0,00004$	*		$0,0031 \pm 0,004$	*	
steklo	$0,00022 \pm 0,00004$	*		$0,0022 \pm 0,0004$	*	
p	0,2421			0,1141		

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V prvem delu smo karakterizirali dva glavna tehnološka postopka, ki se uporabljata za polnjenje sokov in nektarjev. Polnjenje sokov v večslojni karton je zaradi svoje priročnosti in ekonomskih razlogov postalo domena trgovin, medtem ko je steklena embalaža, običajno manjših volumnov, prevzela mesto v gostinskih lokalih. Najvidnejša razlika v teh dveh tehnoloških postopkih je njuna cena. Ta je delno tudi odraz cene steklene embalaže, ki je v primerjavi z kartonsko embalažo dražja.

Nektar iz aronije in borovnice vsebuje višje vrednosti antocianov. To še posebej velja za aronijo. Za izboljšanje barve in povečanje koncentracije antocianov se običajno uporabljajo nekateri drugi zgoščeni sokovi ali ekstrakti. Največkrat so uporabljeni zgoščeni sokovi rdečega grozdja, črnega korenja, ačaija ter ekstrakt črnega ribeza (Lapornik in sod., 2005). Pri mešanju je obstojnost antocianov odvisna tudi od osnovnega soka – predvsem njegovega pH –, v katerega mešamo antocianinski dodatek (Kirca in sod., 2006). Med naštetimi borovničev nektar vsebuje najbolj obširen spekter skoraj enakovredno zastopanih antocianov, ki so sestavljeni iz petih antocianidinov (cianidin, peonidin, petunidin, delfinidin in malvidin) in imajo glikozidirane tri sladkorje (glukozo, galaktozo in arabinozo). Dodatek aronije v največji meri spremeni profil borovnice s povečanjem cianidin 3-galaktozida (Trošt in sod., 2008).

Na razpad antocianov ima lahko vpliv več različnih faktorjev. V tem delu so bili opredeljeni trije: vrsta embalaže, vključno z tehnološkim postopkom, ki je bil uporabljen, vrsta aglikona in vrsta glikozidiranega sladkorja, pri posameznem antocianu.

Vsi trije parametri imajo vpliv na živilsko tehnologijo in na funkcionalno in zdravstveno vrednost hrane. Izbira primerne embalaže in tehnološkega postopka ohranja kakovost proizvoda in omogoča uporabniku kar največ tako prehranskih kot tudi zdravstvenih koristi, ki jih določeno sadje ponuja.

Lestvica stabilnosti posameznih antocianov omogoča živilskim tehnologom, da izberejo najbolj stabilno naravno barvilo. To je pomembno zato, ker se zaradi razpada antocianov, znižuje ekonomska vrednost proizvoda. Poleg izbire najbolj obstojnega naravnega barvila je mogoče tudi z mešanjem sokov barvi in kakovosti proizvoda podaljšati obstojnost.

Poleg omenjenih vplivov obstajajo še drugi, ki so bili zajeti v prejšnjih delih, kot so temperatura, sončna svetloba in pH. Z eksponentno funkcijo je bil izločen vpliv koncentracije. Razlike med vrstami embalaže je tako mogoče pripisati oksidaciji in prepustnosti embalaže. Izredno hitro padanje koncentracije antocianov s časom je pogojeno tudi z občutljivostjo antocianov na kislinsko hidrosilacijo.

Glede na kromatogram predstavljen v poglavju Materiali in metode, je v primerjavi z ostalimi antociani delež cianidin 3-glukozida največji, sledita mu cianidin 3-arabinozid ter cianidin 3-glukozid. Ta razdelitev največjih deležev antocianov je glede na njihovo stabilnost razmeroma ugodna, saj so cianidinski antociani najbolj obstojni med analiziranimi. Iz tega zornega kota je zelo primeren za mešanje koncentrat rdečega grozdja, ki vsebuje samo antociane z glkozidirano glukozo (Trošt in Golc Wondra, 2008), vendar je potrebno biti pazljiv na vrsto grozdja, iz katere je koncentrat narejen, saj nekatere vsebujejo večje vsebnosti malvidin 3-glukozida, ki pa za obarvanje ni primeren. Potrebno je upoštevati da so med sekundarnimi rastlinskimi metaboliti prisotni tudi drugi antociani, ki niso zajeti v tej raziskavi, za katere avtorji navajajo, da so še bolj obstojni od cianidin 3-glukozida (Rubinskiene in sod., 2005).

Razpad antocianov v proizvodih iz rdečega sadja je bil opisan že v mnogih prejšnjih delih. največkrat so bili opisani razpadi skupnih antocianov v črnem ribezu (Lapornik, 2005; Kirca in sod., 2007), v jagodi (Lapornik, 2005), granatnem jabolku (Alighourchi in Barzegar, 2009), rdeči pomaranči (Kirca in Cemeroğlu, 2003), rdečem korenju (Alasalvar in sod., 2005) in drugih. Narejenih je precej stabilnostnih študij, ki opisujejo razpade pod vplivom temperature, spremenjene atmosfere ali različnih pasterizacijskih ali koncentracijskih postopkov. Le malo študij pa se ukvarja z vplivom embalaže, ki je za realen proizvod poleg temperature eden pomembnejših faktorjev.

Kot pri ostalem sadju je razpad antocianov tudi v nektarju iz borovnic in aronije hiter. Po približno 200 dneh termostatanja na 30 °C je prisotnih le še 10 % začetne koncentracije antocianov. Vsi navedeni avtorji opisujejo temperaturno odvisnost razpada. Rubinskiene in sod. (2005) navajajo stabilizacijo antocianov z večjimi koncentracijami sladkorja, ki so običajno v koncentratih. Wang in sod. (2008) so dokazali, da imajo nekatera eterična olja pozitiven vpliv na stabilnost.

Prva razlika, ki jo je bilo mogoče zaslediti iz samih analiz je ta, ostaja v proizvodu v večslojnem kartonu po krajšem časovnem obdobju manjša koncentracija antocianov, kot po daljšem časovnem obdobju v stekleni embalaži. Po drugi strani pa je začetna koncentracija v kartonski embalaži višja, saj so antociani pri sami pasterizaciji podvrženi manjši toplotni obdelavi, kot pri tehnologiji vročega polnjenja v stekleno embalažo. Iz tega lahko

zaključimo, da je za kvaliteto borovničevega nektarja boljši aseptični tehnološki postopek kot tehnologija vročega polnjenja, čeprav steklena embalaža proizvodu med skladiščenjem ponuja boljšo zaščito, kot embalaža iz večslojnega kartona. Vpliva embalaže oz. prepustnosti kisika na kakovost borovničevega nektarja v literaturi ni zaslediti.

Konstanta hitrosti razpada je za antociane v embalaži iz večslojnega kartona za 22 % višja od konstante za atociane v stekleni embalaži. Tako ima lahko borovničev nektar v steklu za četrtno daljši rok trajanja kot v večslojnem kartonu. Potrebno pa je upoštevati, da so začetne koncentracije antocianov višje v večslojnem kartonu.

Kljub povedanemu pa razlike med posameznima vrstama embalaže pomenijo le manjši delež v primerjavi z razlikami s spremljanjem proizvoda med termostatiranjem..

Ker je bila za analizo antocianov uporabljena modificirana kromatografska metoda pri izredno nizkem pH in z izredno dobro ponovljivostjo – ponovljivost je bila posledica popolnoma ločenih kromatografskih vrhov –, je bilo mogoče zelo natančno določiti hitrosti razpada posameznega antociana, kar do sedaj še ni bilo narejeno. Hitrosti je bilo mogoče primerjati med seboj in tako določiti najbolj stabilen antocian, za kar je bil borovničev nektar primeren proizvod, saj vsebuje 15 antocianov, ki jih je v istem sistemu mogoče primerjati med seboj. Za natančno kvantifikacijo je bila nujna identifikacija, saj razporeditve posameznih antocianov ni bilo mogoče določiti samo z standardnim dodatkom. Poleg tega, da smo izmed 15 antocianov dobili najstabilnejšega, je bilo mogoče postaviti pravila razpada za antocianidine in sladkorje, ki se pojavljajo tudi pri drugem sadju.

Tako smo ugotovili, da so cianidinski antociani obstojnejši od peonidinskih, ti obstojnejši od petunidinskih in ti obstojnejši od delfinidinskih in malvidinskih, kar je izredno koristen pripomoček za izbiro ustreznega naravnega barvila, ki mora vsebovati najvišje vrednosti najobstojnejšega antociana. Po drugi strani je na podlagi teh ugotovitev mogoče z eno samo opravljeno analizo teoretsko določiti najprimernejše sadne sokove za mešanje in nadaljnje stabilnostne študije, ki trajajo daljše obdobje niso več potrebne.

Če upoštevamo samo kemijsko strukturo antocianov, je mogoče določiti nekatere povezave glede na tabelo stabilnosti antocianov. Edina razlika med petimi analiziranimi aglikoni je v substituiranih hidroksi (OH) in metoksi (OCH₃) skupinah na mestih 3' in 5' v B obroču. Iz stabilnostne lestvice je mogoče sklepati, da hidroksi skupina na poziciji 3' stabilizira molekulo bolj kot metoksi skupina na istem mestu. Po drugi strani substituirane skupine na mestu 5' zmanjšajo obstojnost molekule. Edina izjema v tem modelu je petunidin 3-glukozid, ki ima na mestu 3' substituirano metoksi skupino in je bolj stabilen kot delfinidin

3-glukozid. Lestvica razpada se do določene mere sklada z nekaterimi prejšnjimi raziskavami (Keppler in sod., 2005) vendar pa je v nasprotju z nekaterimi ostalimi deli (Wang in sod., 1997; Känhkönen in sod., 2003), ki opisujejo antioksidativno učinkovitost posameznih antocianov. Ker razporeditve omenjenih avtorjev ne postavljajo enakih lestvic, je mogoče sklepati, da oksidacija ni edina pot razpada, zato je potrebno v realnih sistemih upoštevati še druge mehanizme.

Hitrosti razpadov posameznih antocianov so v veliki meri odvisne tudi od sladkorja ki je glikozidiran na posamezen antocianin. Najstabilnejši so antociani, ki imajo glikozidirano glukozo, sledijo jim antociani z glikozidirano galaktozo, najmanj stabilni pa so tisti, ki imajo glikozidirano arabinozo. Tudi tu je potrebno poudariti, da je lestvica izdelana na podlagi analiziranih vzorcev, zato je mogoče, da obstajajo sladkorji, ki posamezne antocianine bolj stabilizirajo od navedenih.

Glukoza in galaktoza imata isto molekulska formulo, zato je težko utemeljiti razliko v stabilnosti samo na elementarno sestavo posameznega sladkorja. Posledično je mnogo bolj verjetno, da igra vlogo pri stabilizaciji tudi orientiranost v prostoru, ki do določene mere omogoča ali pa preprečuje dostop reaktivnih spojin, ki bi začele reakcijo do aktivnih mest v molekuli. To razloži manjšo stabilnost antocianov z glikozidirano arabinozo, katera je sestavljena samo iz petih ogljikovih atomov. ta predstavlja manjše sterično oviranje od šestčlenskih obročev. Na to teorijo je mogoče navezati raziskave prejšnjih avtorjev (Rubinskiene in sod., 2005), kjer je navedeno, da so antociani, ki imajo dve glikozidirani molekuli sladkorja, bolj stabilni od tistih, ki imajo glikozidirano samo eno molekulo. Omenjena lestvica je bila opisana že v prejšnjih delih (Ichiyanagi in sod., 2000), ki so se ukvarjali z razpadom po mehanizmih hidrolize.

Iz tega sledi, da sta za zmanjševanje koncentracije antocianov odgovorna vsaj dva mehanizma, zato samo z protioksidativno zaščito ni mogoče popolnoma ustaviti njihovega razpada; mogoče ga je le omiliti (Trošt in sod., 2008).

Drugi del analiz je bil prav tako narejen na borovničevem nektarju, vendar je bil ta tokrat brez dodatka aronije, zato so njegove karakteristike drugačne. Napolnjen je bil po aseptičnem postopku v embalažo iz polietilen tereftalata. Aseptični postopek po pasterizaciji ne zajema dodatnega gretja, sama pasterizacija pa je optimizirana na najkrajši čas in najnižjo temperaturo. Plastenke, v katere se je proizvod polnil, so na trgu široko uporabljene (Baude, 2008).

Preučevane so bile štiri vrste plastenke. Prva je referenčna plastenka, ki se običajno uporablja za polnjenje pijač, ki vsebujejo do 30 % sadnega deleža. Njena uporaba je

mogoča tudi pri pijačah z višjimi sadnimi deleži, vendar so tem pijačam običajno dodana barvila in arome. Ostale tri verzije plastenek so plastenke z različnimi dodatki zaščite pred kisikom. PET 2 je narejena po običajnem postopku, pri katerem je lovilec kisika enakomerno porazdeljen čez celotno plastenko. Take plastenke so cenejše od večslojnih plastenek, ki potrebujejo za izdelavo tehnologijo koekstruzije, ki ni tako razširjena in je zaradi manjše proizvodnje strojev, ki omogočajo koekstruzijo dražja. PET 3 in PET 4 sta večslojni plastenki višjih cenovnih razredov, pri katerih je aktivni lovilec nameščen v srednji del, kar preprečuje občasno motnost plastenek, omogoča pa tudi bolj usmerjeno delovanje aktivnega lovilca na mestih, kjer je najbolj potreben. Troslojna plastenka PET 4 je bila razvita na evropskem trgu, petslojna PET 3 pa na ameriškem (Baude, 2008).

Podobne izvedbe plastenek se uporabljajo tudi na drugih področjih živilske industrije, kot je pivovarska industrija. Te plastenke se razlikujejo od do sedaj obravnavanih po tem, da je pri njih potrebna tudi pasivna bariera in potencialni nanosi silicijevega oksida na stene plastenek za zmanjšanje prepustnosti CO₂, ki je nepogrešljiv del piva (Guillet, 2008). V zadnjem času se PET plastenke uporabljajo tudi za polnjenje vina (Baude, 2008). Pri izdelavi takih plastenek zaščita pred kisikom, saj izdelovalci aktivnih lovilcev že zagotavljajo 12-mesečni rok trajanja z dodanimi 3 meseci skladiščenja plastenek (ColorMatrix, 2007). V tem primeru je bolj problematična percepcija potrošnikov, ki imajo za vinsko steklenico ustaljeno predstavo, kar onemogoča aplikacijo stabilnostno potrebnih ojačitev na plastenko. Zaradi tega ostaja problematičen transport in sama stabilnost plastenek brez ojačitev. (Sauermann, 2008).

Ker je bila izdelava aseptično pilotno napolnjenih vzorcev namenjena direktno aplikaciji v industrijskem merilu, je bila tudi količina vzorcev (4 X 300 plastenek) temu pogojena. Proizvodi so bili skladiščeni v skladišču; zaščiteni so bili pred svetlobo vendar delno izpostavljeni temperaturnim razlikam. Temperatura je nihala med 5 in 17 °C. Zaradi tega iz analiz ni bilo mogoče določiti funkcij razpada odvisnih od temperature.

Na vzorcih so bile narejene analize posameznih in skupnih antocianov med skladiščenjem. Razpad antocianov je bil opisan v številnih delih, največkrat v povezavi s postopki ekstrakcije ali koncentracije. Razpada antocianov, pa tudi fenolov ali ostalih antioksidantov, v embalaži iz polietilen tereftalata v pregledani literaturi ni bilo mogoče zaslediti. Zaslediti je bilo mogoče vpliv modificirane atmosfere na kakovost borovnic (Zheng, 2003), kar je do neke mere mogoče povezati s prepustnostjo kisika skozi stene plastenek. Ker so prisotni tudi drugi mehanizmi razpada, primerjava ni popolna.

Poleg analiz antocianov so bile narejene tudi druge analize skupnih polifenolov, ki zajemajo širši spekter fenolov od antocianov (Tomas-Barberan in sod., 2000). Analize

polifenolov zaradi standardizirane primerjave z galno kislino, ni mogoče direktno povezati z antociani. Pri tako velikih vsebnostih antocianov bi bila boljša primerjava z cianidin 3-glukozidom.

Ena izmed standardnih metod, ki se uporablja za opredelitev zdravstvene učinkovitosti nekega živilskega proizvoda, je merjenje antioksidativne učinkovitosti po metodi DPPH (Stratil in sod., 2006). Metoda temelji na sposobnosti sistema za lovljenje radikalov, kar je osnovna funkcija antioksidantov. Slaba lastnost metode pa je ta da DPPH producira samo radikal ene vrste, medtem ko jih je v organizmu lahko prisotnih več – različnih velikosti z različnimi afinitetami. Nič tudi ne pove o obstojnosti antioksidanta na poti do aktivnega mesta v organizmu. Kljub naštetim pomanjkljivostim je metoda široko uporabljena. Zelo je primerna za karekterizacijo PET embalaž, saj so antioksidanti v embalaži direktna kompeticija antioksidantom v proizvodu. S tem, ko se porabljajo antioksidanti v embalaži, so antioksidanti v proizvodu zaščiteni.

Za opredelitev vpliva antioksidantov na človeški organizem je bilo narejenih precej raziskav. Te njihovo preventivno vlogo in blagodejen vpliv. Antioksidanti zmanjšujejo verjetnost za nastanek rakavih obolenj (Ames in sod., 1993; Djuric in sod., 1998). Fenolni antioksidanti preprečujejo nastanek srčnih bolezni (Hertog in sod., 1993). Sadje splošno zmanjšuje verjetnost za nastanek kapi (Gillman in sod., 1995; Joshipura in sod., 1999). Že dolgo je znana povezava med antioksidanti, krvnim pritiskom (Ascherio in sod., 1991) in arteriosklerozo (Steinberg in sod., 1989).

Informativno so bile narejene tudi analize raztopljenega kisika, ki je povezan z razpadom merjenih komponent (Solomon in sod., 1995). Analize glukoze, fruktoze in saharoze zaradi njihove narave delujejo po mehanizmu hidrolize in ne pa po mehanizmu oksidacije. Te analize niso prikazale razlik med različnimi embalažami. Narejene so bile tudi analize barve, ki je v času skladiščenja ostala razmeroma stabilna.

Analize antocianov kažejo relativno hiter razpad s časom. Po letu dni skladiščenja je v proizvodih prisotnih le še približno 20 % koncentracije prve meritve. Primerjave meritev koncentracije posameznih antocianov nam v vseh primerih kažejo na razliko med polnjenjem produkta v referenčno PET plastenko in plastenkame z dodanim lovilcem kisika, kar nam kaže na to da oksidacija vpliva na razpad antocianov. Referenčna PET plastenka je sicer najcenejša, vendar se razlika v ceni kompenzira s krajšimi roki trajanja proizvoda. Vidne so tudi obsežne razlike pri koncentraciji antocianov v odvisnosti od časa. Razlike so manjše ali pa jih ni med prvima dvema meritvama in zelo velike med ostalimi meritvami.

Ker pri tej seriji analiz v odvisnosti od časa ni bilo mogoče izrisati matematične funkcije, se je primerjava med posameznimi antociani naredila glede na relativno spremembo posameznega antociana. Tako so se vzpostavile skupine antocianov, ki imajo razmeroma podobno stabilnost. V primerjavi z ostalimi sta bila najbolj stabilna cianidin 3-glukozid in cianidin 3-galaktozid, med katerima ni bilo zaznati razlik. Sledijo jima petunidin 3-glukozid, peonidin 3-glukozid in delfinidin 3-glukozid. Naslednjo skupino sestavljajo petunidin 3-galaktozid, delfinidin 3-galaktozid, malvidin 3-glukozid in malvidin 3-galaktozid. Najmanj stabilni so cianidin 3-arabinozid, delfinidin 3-arabinozid in malvidin 3-arabinozid.

Lestvica se v večji meri ujema z rezultati prve serije analiz pri nektarju iz borovnic in aronije (Trošt in sod., 2008), kljub temu, da tu ni bilo mogoče določiti konkretnega aglikonskega vpliva ali vpliva glikozidirane sladkorja.

Ker analiza skupnih polifenolov v večji meri karakterizira antociane (Zheng, 2003), so rezultati posameznih primerjav bodisi glede na čas bodisi glede na vrsto embalaže razmeroma podobni. Ker so zaradi upoštevanja ostalih fenolov razlike procentualno manjše, korelacije statističnih razlik niso toliko razvidne.

Analiza antioksidativne učinkovitosti nam je v primeru borovničevega nektarja dala najbolj pregledne rezultate, glede sposobnosti embalaže za preprečevanje oksidacije proizvoda. Tudi tu se je pokazala tudi razlika med prvima dvema meritvama glede na čas skladiščenja. Med različnimi embalažami se je največja razlika pokazala pri zadnji PET 4 embalaži, ki najbolje ohranja antioksidativno kapaciteto proizvoda (Trošt in sod., 2007).

Drug proizvod, kateremu smo preverjali kakovost in vpliv tehnoloških postopkov ter embalaže na vsebnost fenolov in antioksidantov, je bil pomarančni sok z 100-odstotnim sadnim deležem narejen iz zgoščenega soka. Pomarančni sok je bil procesiran po treh tehnoloških postopkih in napolnjen v tri vrste embalaže. Prav tako kot pri borovničevem nektarju so bile v prvem delu uporabljene iste vrste PET plastenk. V drugem delu je bila narejena primerjava aseptične tehnologije polnjenja polnjenja v večslojen karton in tehnologije vročega polnjenja v stekleno embalažo.

Raziskav, ki bi omenjale spreminjanje kakovosti glede na vrsto pakiranja, je razmeroma malo. V zadnjem času je najbolj primerljiva raziskava, ki so jo opravili Ros-Chumillas in sod. (2007). Ta raziskava zaključuje, da se askorbinska kislina in barva spreminjata s časom glede na vrsto embalaže, pri čemer je padec kakovosti je hitrejši pri polnjenju v običajno PET embalažo kot v steklo ali večslojno PET embalažo. Kot primerno alternativo ponuja plastenke z dodanim aktivnim lovilcem kisika, dušikom nad proizvodom in

aluminijasto folijo pod pokrovčkom. Zerdin in sod. (2003) primerjajo razpad askorbinske kisline ter spreminjanje barve proizvoda in koncentracije raztopljenega kisika v njem v običajen večslojen karton in v večslojen karton z dodanim aktivnim lovilcem kisika. Ta ima pozitiven vpliv na kakovost proizvoda, saj upočasnjuje staranje. Ayhan in sod. (2001) so preverjali kakovost pomarančnega soka, pakiranega v različne polimerne materiale, in zaključujejo, da je najboljši PET – ta se edini lahko primerja s stekleno embalažo –, najslabši pa LDPE. Conrad in sod. (2005) pa so preverjali vpliv dodatka PEN-a v PET ter vpliv UV-svetlobe na staranje. Ugotovili so, da dodatek PEN-a pozitivno vpliva na zaščito pred UV-žarki.

Pri karakterizaciji pomarančnega soka se je preverjalo več parametrov, nekateri med njimi so se preverjali tudi pri borovničevem nektarju in tudi primerjalno opisujejo občutljivost obeh proizvodov. Namesto analize antocianov je bila pri pomarančen soku narejena analiza karotenoidov. Ti so antioksidanti, so pa tudi dominantno naravno barvilo v pomarančnem soku. Za karotenoide je znano, da razpadajo s časom in temperaturo; kot antioksidanti, so občutljivi na koncentracijo kisika. Zaradi tega so primeren parameter za karakterizacijo omenjenih pakiranj (Corts in sod., 2006). Narejene so bile primerjalne analize skupnih polifenolov in DPPH antioksidativne učinkovitosti (Klimczak in sod., 2007). Najbolj uveljavljena metoda za preverjanje kakovosti pomarančnega soka je analiza askorbinske kisline (Polydera in sod., 2004; Esteve in sod., 2006; Tiwari in sod., 2008; Lee in Chen, 1998). Informativno so bile še narejene analize spreminjanja barve, koncentracije raztopljenega kisika ter spreminjanja koncentracij sladkorjev.

Iz analiz karotenoidov so vidne razlike med posameznimi vrstami plastenk saj PET 4 in PET 3 najboljše ohranjata vsebnost karotenoidov, medtem ko je bilo v referenčni embalaži zaznati najmanjše vsebnosti. Primerjalno samo še analiza skupne vsebnosti polifenolov nakazuje takšne razlike, medtem ko jih ostale analize ne kažejo. Iz tega je mogoče zaključiti, da so karotenoidi precej dovzetni za oksidacijo. Če primerjamo naše rezultate z rezultati Cortsa in sod. (2006), pri karotenoideih pri različnih temperaturah – posebno pri ksantofilih – ni bilo mogoče opaziti različnega razpada.

Podoben profil razlik je opaziti tudi pri spreminjanju koncentracij skupnih polifenolov. Razpad polifenolov s staranjem so preučevali Klimczak in sod. (2006). Tudi v njihovem primeru je bilo razlike težko razložiti samo z spreminjanjem koncentracij fenolnih kislin in identificiranih flavonoidov. Najverjetnejša razlaga je, da z fenolnimi kislinami in flavonoidi še niso zaobseženi vsi fenoli, ki jih obsega vrednost skupnih polifenolov.

Zanimiva je primerjava borovničevega nektarja in pomarančnega soka, saj kljub temu, da je v borovničevem nektarju samo predstavlja samo 30 % sadnega deleža, v pomarančnem soku pa 100 %, so v obeh približno enake koncentracije polifenolov, ki lahko ugodno vplivajo na človeški organizem.

Naslednji dve seriji analiz – analize antioksidativne učinkovitosti in analize askorbinske kisline – sta si, kar se tiče rezultatov, razmeroma podobni. Obe analizi kažeta zmanjševanje vrednosti med skladiščenjem. Za oba parametra je bilo narejenih že precej raziskav. Tiwari in sod. (2008), Polydera in sod. (2004), Zerdin in sod. (2003), Ros-Chumillas in sod. (2007) in še mnogi drugi so vzeli askorbinsko kislino kot enega glavnih parametrov preverjanja kakovosti proizvoda.

Prav tako kot pri razpadu askorbinske kisline se tudi pri skupni antioksidativni učinkovitosti kažejo s časom nastale spremembe. Pri primerjavi različnih embalaž pa se tu pokaže samo razlika med referenčno embalažo in ostalimi, kljub temu da so razpadi askorbinske kisline in zmanjševanje antioksidativne vrednosti razmeroma veliki.

Askorbinska kislina je znana kot antioksidant, zato je zmanjševanje antioksidativne učinkovitosti vezano nanjo. Ker pa so razlike med posameznimi vrednostmi askorbinske kisline v različnih vrstah embalaže razmeroma podobne, je mogoče predvidevati, da razpad askorbinske kisline ni pogojen samo z oksidacijo kot njeno živilsko funkcijo, pač pa razpada tudi po drugih kemijskih mehanizmih.

Razlike zelo lepo opišejo tudi analize barve in raztopljenega kisika, ki so v prilogah. Začetna koncentracija kisika je najvišja v referenčni plastenki, pri ostalih je enkoliko nižja. To pomeni, da se je kisik, ki je prišel v proizvod, v različnih plastenkah različno porabil, kar se odraža v skupni spremembi barve.

Zadnja del raziskav je prav tako narejen na pomarančnem soku narejenem iz zgoščenega sadnega soka in napolnjenem na industrijskih polnilnih linijah v stekleno embalažo in embalažo iz večslojnega kartona. Tako napolnjen pomarančni sok je eden najbolj prodajanih sokov na svetu. Primerjalno so bile na njemu narejene analize HMF-ja, ki je eden izmed intermediatov neencimskega temnenja. Med polifenoli, ki so v pomaranči, se je določilo fenolne kisline in flavonone. Ker je za percepcijo potrošnika pomembna barva se je merilo tudi spreminjanje koncentracije karotenoidov.

Meritve HMF-ja so standarden postopek za preverjanje starosti ali potvarjanja izhodnih surovin. Koncentracija HMF-ja z časom relativno hitro narašča. S preučevanjem raznih vplivov na koncentracijo HMF-ja v pomarančnem soku se je ukvarjalo že precej raziskovalcev. Med drugimi so Dolores del Castillo in sod. (1999) preučevali nastanek

Amadori spojin iz aminokislin in sladkorjev. Cortes in sod. (2008) so HMF uporabili za parameter različnih postopkov pasterizacije. Solomon in sod. (1995) so ga uporabili za karakterizacijo razlik med stekleno embalažo in polietilensko embalažo.

Kljub temu, da so koncentracije HMF ja v analiziranih proizvodih razmeroma nizke je iz rezultatov mogoče razbrati, da se izredno hitro spreminjajo, saj koncentracija iz nič naraste na 3 mg/l. Ena izmed opaznih razlik je tudi ta, da je v začetku rast razmeroma nizka ali je skoraj ni, po določenem času pa hitro narašča. Zaradi velikih razlik in skoraj zveznega naraščanja je HMF-ju mogoče pripisati vsaj v tem časovnem terminu staranja eksponentno funkcijo kar kaže tudi regresijska tabela. Iz meritev koncentracije HMF-ja za posamezno vrsto embalaže je razvidno, da koncentracija HMF-ja narašča hitreje v embalaži iz večslojnega kartona kot v stekleni embalaži. Steklена embalaža tako ščiti proizvod bolje kot embalaža iz večslojnega kartona.

S spreminjanem koncentracij fenolnih kislin v pomarančnem soku so se predhodno ukvarjali Klimczak in sod. (2006). Vplive staranja in različnih temperatur so preučevali na dveh komercialno dostopnih pomarančnih sokovih napolnjenih v embalažo iz večslojnega kartona. Ker je vsaj ena od analiznih metod razmeroma podobna je mogoče raziskavo uporabiti za direktno primerjavo. Tako pri naših analizah kot pri navedenem viru je opazno naraščanje fenolnih kislin s staranjem. Odločujoč parameter za razlikovanje naraščanja je temperatura, kar razloži tudi višje vrednosti začetnih koncentracij fenolnih kislin v soku napolnjenem v stekleni embalaži, saj se tako kaže vpliv dodatnega segrevanja proizvoda med procesiranjem.

Z regresijsko analizo tako linearne kot eksponentne funkcije ni bilo mogoče določiti razlik med posameznima embalažama s 95 % verjetnostjo.

Klimczak in sod. (2006) so preučevali spremembe flavanonov med skladiščenjem v pomarančnem soku. Pri tem so določili rahel padec hesperidina in narirutina, medtem ko eriocitrina niso uspeli identificirati. Vidne so bile razlike v začetni koncentraciji pri posameznem analiziranem soku. Iz naših analiz so koncentracije posameznih flavanonov med skladiščenjem razmeroma stabilne. Izjema je hesperidin, katerega koncentracija pade takoj po polnitvi, pozneje pa ostaja razmeroma stabilna. Iz primerjave tabel koncentracij je mogoče zaznati razlike v začetnih koncentracijah eriocitrina in narirutina. Te so višje pri polnjenju v stekleno embalažo, kar je pogojeno z različnimi termičnimi obdelavami.

Iz navedene raziskave je mogoče tudi razbrati, da so flavanoni neodvisno od embalaže temperaturno izredno obstojni, saj med omenjenima pakiranjema ni bilo mogoče določiti razlik v spreminjanju koncentracij. Razpad omenjenih fenolov je najverjetneje pogojen z encimsko aktivnostjo.

Vplive na razpad karotenoidov so predhodno preučevali Corts in sod. (2006). Njihova raziskava ni temeljila na primerjanju embalaže, pač pa na primerjanju različnih postopkov pasterizacije in različnih temperatur. Vsi proizvodi so bili vsi napolnjeni v večslojni karton. Kljub temu, da izhodni karotenoidni profil med pomarančnima sokoma ni bil enak, je mogoče ugotoviti nekatere podobnosti. S staranjem je opazen razpad karotenoidov. Z različnimi temperaturami tudi tu ni bilo mogoče zaznati večjih odstopanj v koncentracijah posameznih karotenoidov, vpliv embalaže je glede na naše rezultate tudi zanemarljiv.

Opravljene analize in navedena raziskava se ujemata pri rezultatih opazovanj. Lutein tko pod vplivom temperature kot embalaže skoraj ne razpada in je tako primeren kot naravno barvilo. Manj primerna sta oba provitamina A, najmanj primeren pa je zeaksantin, ki razpade relativno hitro. Občutljivost na temperaturo se kaže tudi v različnih začetnih koncentracijah, saj pri luteinu in β -karotenu skoraj ni razlik, medtem ko so koncentracije zeaksantina in β -kriptoksantina višje pri proizvodih, napolnjenih z aseptično tehnologijo. Iz tega je mogoče zaključiti, da je izmed navedenih karotenoidov kot naravno barvilo najbolj primeren. Toplotna obdelava igra vlogo samo pri nekaterih karotenoidih, medtem ko obe omenjeni embalaži ščitita proizvod enako dobro (Trošt in Golc Wondra, 2008).

5.2 SKLEPI

Na razpad antocianov v različnih proizvodih vplivajo različni dejavniki. Iz preučevanja vsebnosti antocianov med skladiščenjem pri različnih tehnologijah polnjenja in embalažah so bili preučevani štirje: vrsta embalaže, tehnologija pasterizacije, vpliv vrste aglikona in vpliv glikozidiranega sladkorja. Vsi ti faktorji imajo neposreden vpliv na razumevanje tehnoloških procesov v živilski tehnologiji in pomagajo pri različnih odločitvah ter ohranjanju čim višje kakovosti proizvoda. Razumevanje obnašanja različnih komponent koristnih za zdravje, pomaga tako potrošniku kot tudi zdravstvenim ustanovam, ki se ukvarjajo z zdravo prehrano, da pridobijo dodatne informacije o hrani.

Iz rezultatov je mogoče zaključiti, da steklena embalaža ohranja višjo koncentracijo antocianov v primerjavi z večslojnim kartonom. Pri tem je potrebno upoštevati, da se razlika izniči po približno 20 dneh termostatanja, kar je mogoče primerjati z dvema mesecema normalnega skladiščenja.

Kljub temu je v obeh primerih razpad antocianov razmeroma hiter in na njihovo vsebnost odločilno vpliva starost proizvoda. To med drugim tudi pomeni, da je deklariranje povečanih vsebnosti antocianov v večji meri sporno.

Ker je razpad antocianov razmeroma hiter, je opredelitev najbolj stabilnega antociana nujna, saj so antociani tudi naravna barvila, ki se lahko dodajajo pijačam. Po drugi strani pa se za doseganje ustrezne barve uporablja mešanje sokov, ki imajo večje vsebnosti antocianov. V tem primeru je najbolj smiselna ali uporaba najbolj stabilnega antociana ali uporaba sokov iz sadja, ki ima največjo koncentracijo najbolj stabilnih antocianov.

V našem primeru so bili najbolj stabilni cianidinski antociani, medtem ko so bili najmanj stabilni malvidinski in delfinidinski antociani. Kar se tiče glikozidiranih sladkorjev, v nektarju iz borovnic in aronije antociane najbolj stabilizira glukoza, najmanj pa arabinoza. Tako je v našem primeru najbolj smiselna uporaba cianidin 3-glukozida, ki je izmed analiziranih antocianov najbolj stabilen. Po drugi strani imata delfinidin 3-arabinozid in malvidin 3-arabinozid zaradi najhitrejšega razpada potencialno največjo zmožnost lovljenja prostih radikalov, vendar je pri tem vprašljiv njihov razpad pri prenosu na zelena aktivna mesta.

Drugi del karakterizacije borovničevega nektarja je zajemal spreminjanje parametrov kakovosti, ki se navezujejo na fenolne komponente. Borovničev nektar je bil napolnjen na pilotni aseptični liniji v embalaže iz polietilen tereftalata, ki so nudile različne zaščite pred kisikom. Določilo se je spreminjanje parametrov kakovosti s časom skladiščenja.

S časom skladiščenja se spreminjajo praktično vsi opazovani parametri, med katerimi je najbolj zaznaven razpad antocianov, saj jih po izteku roka trajanja v proizvodu ostane samo cca. 20 % prve izmerjene vrednosti.

Iz razpada antocianov je bilo mogoče določiti lestvico stabilnosti antocianov, ki pa ne zajema toliko podatkov kot opredelitev s konstantami razpada iz prve serije analiz. Kljub temu se lestvici razmeroma lepo pokrivata in potrjujeta že navedene zaključke.

Poleg razlik nastalih med skladiščenjem se pojavljajo še razlike med razpadom antocianov v običajni PET embalaži in med embalažami z različnimi zaščitami pred kisikom. To pomeni, da je pri odločitvi za polnjenje proizvodov z višjimi sadnimi deleži nujno upoštevati krajše roke trajnosti, če želimo ohraniti isto kakovost.

Največje razlike med plastenkami z vsebovano zaščito pred kisikom nam je pokazala analize antioksidativne učinkovitosti. Najboljšo zaščito proizvoda smo dosegli z uporabo troslojne PET plastenke. Nekoliko slabše rezultate so dosegli z petslojno PET plastenko in težjo plastenko z vmešanim aktivnim lovilcem. Vse tri se razlikujejo od referenčne plastenke. Analize tudi dokazujejo, da je mogoče s plastenko, ki ni narejena po tehnologiji koekstrudiranja, doseči iste rezultate, vendar je pri tem plastenka težja, kar ponovno osvetljuje ekonomski vidik med obema plastenkama.

Za primerjavo je bil v enako embalažo iz polietilen tereftalata po isti aseptični tehnologiji napolnjen tudi 100-odstotni pomarančni sok. Kljub temu, da je fenolni profil pri pomaranči različen, oksidacija prav tako vpliva na njihovo vsebnost. Kot pri borovničevem nektarju tudi pri pomarančnem soku, vse narejene analize kažejo na znižanje kakovosti med skladiščenjem in opredeljujejo razliko med plastenko, ki ni imela dodatne zaščite pred kisikom, in plastenkami, ki so to zaščito imele.

Ker pomarančni sok ne vsebuje antocianov, so bili tu kot vodilni pigment analizirani karotenoidi, ki imajo prav tako antioksidativne lastnosti, in lahko opredelijo razliko v kakovosti posameznih embalaž. Tako sta analizi karotenoidov in skupnih polifenolov nakazali najboljšo zaščito pri obeh večslojnih plastenkah. Pri tem med petslojno plastenko in plastenko z vmešanim lovilcem ni bilo sprememb. Ostale analize – med njimi tudi analiza C-vitamina – niso pokazale občutnih razlik. Iz tega je mogoče zaključiti, da največkrat uporabljena analiza za kontrolo kakovosti pomarančnega soka ne daje vedno najbolj reprezentativnih rezultatov, in so za karakterizacijo kakovosti bolj primerne analize ostalih antioksidantov.

Glede na analize je tudi tu mogoče zaključiti, da so se fenoli, in s tem kakovost pomarančnega soka, najbolje ohranili v troslojni plastenki, čeprav je pri nekaterih parametrih kakovosti zadovoljiva tudi cenejša plastenka z vmešanim aktivnim lovilcem.

Na pomarančnem soku in borovničevem nektarju so bile narejene nekatere enake analize, zato je mogoče med seboj primerjati oba proizvoda. Glede na to da ima pomarančni sok 100-odstotni sadni delež, borovničev nektar pa le 30-odstotnega je nižanje kakovosti precej manjše pri pomarančnem soku kot pri borovničevem nektarju, kar je lepo vidno iz analize polifenolov. Oba imata skoraj isto koncentracijo polifenolov kljub temu, da imata izrazito različna sadna deleža.

Razlika je vidna tudi pri analizah raztopljenega kisika, saj se kisik hitreje porabi za oksidacijo borovničevega nektarja, iz česar je mogoče zaključiti da naravne komponente v pomarančnem soku niso tako občutljive na oksidacijo.

To je tudi razlog, da večina opazovanih parametrov pri pomarančnem soku ni pokazala občutnih razlik med stekleno embalažo in v embalažo iz večslojnega kartona. Analiza, ki edina nakazuje, da razlike obstajajo je analiza HMF-ja. Ta hitreje narašča v pomarančnem soku, napolnjenem v kartonsko embalažo, kot v enakem soku napolnjenem v stekleno embalažo.

Med staranjem se koncentracija fenolnih kislin z časom povečuje, koncentracija karotenoidov pa pada. Pri flavonoidih je bil najbolj razviden padec hesperidina. Ostala dva flavonoida sta bila tekom staranja razmeroma stabilna.

Za razliko od analiz vpliva embalaže je lepo vidna razlika v začetnih koncentracijah fenolnih kislin in flavonoidov. V proizvodu napolnjenem po aseptični tehnologiji so bile povzročene manjše spremembe kot pri tehnologiji vročega polnjenja.

Primerjava stabilnosti posameznih karotenoidov izkazuje najvišjo obstojnost luteina. Sledita mu oba provitamina A. Najmanj obstojen pa je zeaksantin, ki med skladiščenjem občutno razpade. Ta podatek je predvsem koristen zato, ker se vsi omenjeni karotenoidi uporabljajo kot funkcionalni dodatki ali naravna barvila.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

S promoviranjem funkcionalnih živil se povečuje tudi zavest potrošnikov do koristi, ki jih hrana lahko ima na zdravje. Zdravilne učinkovine so mnogokrat povezane z antioksidanti kot so antociani in karotenoidi. Te učinkovine imajo vpliv na razvoj srčnih bolezni, sladkorne bolezni, raka ter drugih predvsem s starostjo povezanih bolezni. Ker je sveže sadje sezonsko pogojeno so nujni postopki predelave, ki v največji meri ohranijo prehransko in hranilno vrednost. Najbolj razširjen postopek predelave je predelava sadja v sadne sokove in nektarje. Težava pri predelavi samega sadja in polnjenja je ta, da se fenoli in antioksidanti med predelavo in skladiščenjem porabijo v različnih procesih. S tem se znižuje koristnost za uporabnika.

Najstarejša tehnologija termične obdelave in polnjenja je tehnologija vročega polnjenja v stekleno embalažo. Ta daje proizvodu relativno dobro zaščito, saj je nepropustna za kisik, ki je mnogokrat vzrok razpada fenolnih substanc. Pri tem pa ne smemo zanemariti negativnih vplivov toplotne obdelave. Ta namreč pri vseh termodinamsko pogojenih reakcijah povečuje hitrost njihovega razpada in tako zmanjšuje koncentracije substratov. Steklena embalaža je zaradi doseganja stabilnosti in preprečevanja loma stekla razmeroma težka in posledično draga.

Pred časom se je zaradi pomanjkljivosti zgoraj opisane tehnologije polnjenja v steklo razvila tehnologija polnjenja v večslojen karton, ki ga je mogoče sterilizirati. Razvila se je tudi tehnologija aseptičnega polnjenja, ki je optimizirala čas in temperaturo gretja. Tak postopek omogoča najmanjši možni obseg uničenja aktivnih komponent. Polnjenje hladnega proizvoda v sterilizirano folijo se izvaja v zaprtem sterilnem prostoru. Folija se še v tem prostoru zavari. V primerjavi z stekleno embalažo ima folija to prednost, da je lažja in cenejša, omogoča tudi manipulacijo na manjšem polnilnem prostoru. Ima pa tudi svoje pomanjkljivosti; kljub vgrajeni aluminijasti foliji je delno prepustna. Njena slabost je tudi mehkost odprtega proizvoda, ki potrebuje pozornejšo manipulacijo, posebej pri večjih volumnih.

Naslednja stopnja v razvoju je bila tehnologija polnjenja v polimerne plastenke. Danes daleč najbolj uporabljen polimer za ta namen je polietilen tereftalat (PET), ki z razmeroma majhno maso omogoča tako fleksibilnost kot trdnost plastenk. Najprej so se po tej tehnologiji polnile mikrobiološko neobčutljive pijače ali pijače z dodanimi konzervansi, nato je bila razvita aseptična tehnologija. Ta tehnologija v primerjavi s prej predstavljeno potrebuje mnogo večji manipulacijski prostor in je zato bolj občutljiva na sterilnost. Ker je tudi polietilen tereftalat predvidenih debelin prepusten za kisik, so se vanj najprej polnile

oksidacijsko neobčutljive pijače in pijače z nizkimi sadnimi deleži. V zadnjem času pa so bili razviti novi barierni materiali, ki omogočajo daljše roke trajanja tudi proizvodom, ki so bolj občutljivi na kisik. To so sokovi, nektarji, pivo in vino.

Za namen določitve vpliva različnih vrst PET embalaže na vsebnosti fenolnih snovi in ostalih antioksidantov, se je v štiri karakteristične vrste embalaže, prirejene za ta namen po aseptični tehnologiji napolnilo pomarančni sok in borovničev nektar. Embalaže, ki smo jih testirali, so največkrat uporabljene na evropskem in ameriškem trgu. Prva je plastenka iz referenčnega PET materiala, brez dodatka aktivnega lovilca kisika. Ta plastenka se uporablja običajno za pijače z nižjimi sadnimi deleži. Druga plastenka ima vmešan aktivni lovilec. Ker za izdelavo takih plastenik ni potrebna tehnologija koekstruzije, so cenejše od večslojnih plastenik. Za pakiranje sokov in nektarjev pa se največ uporablja trislojne in petslojne plastenke.

V drugem delu raziskav se je – prav tako na pomarančnem soku in na nektarju iz borovnic in aronije – preverjalo kakovost med skladiščenjem in vpliv aseptičnega polnjenja in vročega polnjenja nanjo. Preverjalo se je tudi zaščitne lastnosti steklene embalaže in embalaže iz večslojnega kartona.

Za namen določanja različnih fenolov in antioksidantov so bile popolnoma ali delno razvite različne metode določevanja. Za določevanje koncentracij posameznih antocianov sta bili razviti dve kromatografski metodi. Prva je zaradi potreb po natančni identifikaciji kromatografskih vrhov vključevala identifikacijo z masno detekcijo. Druga je z detekcijo v vidnem delu omogočala izredno ponovljivost meritev, saj so bili kromatografski vrhovi popolnoma ločeni med seboj. Zaradi razvoja teh dveh metod je bilo mogoče določiti hitrosti razpada velikega števila antocianov in izbrati najbolj obstojno naravno barvilo. Po podobnem postopku je bila razvita metoda za določanje karotenoidov, le da je bilo pri tej identificiranih vrhov relativno manj. Prirejena je bila tudi metoda za določanje fenolnih kislin in flavonoidov, ki omogoča sočasno detekcijo in kvantifikacijo HMF.

Analize individualnih in skupnih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v stekleno embalažo in embalažo iz večslojnega kartona nam kažejo, da imajo antociani v proizvodu napolnjenem v embalažo iz večslojnega kartona za 22 % višjo konstanto razpada kot jo imajo tisti v stekleni embalaži. Za antociane je bilo mogoče določiti, da razpadajo po kinetičnih reakcijah prvega reda, ki jih je mogoče opisati z eksponentno funkcijo. Zaradi tega je razpad hiter; po 183 dneh termostatisiranja na 30 °C ostane v proizvodu, napolnjenem v večslojen karton, samo 8 % začetne vrednosti antocianov. V stekleni embalaži ostane po 204 dneh termostatisiranja na 30 °C 10 % začetne vrednosti. Potrebno je upoštevati, da so

zaradi daljše toplotne obdelave začetne vrednosti pri tehnologiji vročega polnjenja nižje za 7 %.

Iz različnih hitrosti razpada posameznih antocianov smo določili vpliv aglikonskega dela in glikozidirane sladkorja na stabilnost. Primerjalno so cianidinski antociani najstabilnejši, sledijo jim peonidinski in petunidinski. Med delfinidinskimi in malvidinskimi antociani ni bilo opazne razlike. Če antociane primerjamo glede na glikozidirani sladkor, potem so najbolj stabilni tisti, ki imajo glikozidirano glukozo, sledijo jim tisti z galaktozo, najmanj stabilni pa so tisti, ki imajo glikozidirano arabinozo. Izmed analiziranih antocianov je bil tako najbolj stabilen cianidin 3-glukozid.

V pomarančnem soku, napolnjenem po aseptični tehnologiji v kartonsko in po tehnologiji vročega polnjenja v stekleno embalažo, so bili določeni karotenoidi, fenolne kisline, flavonoidi ter HMF. Razen za HMF, ki narašča hitreje v kartonski embalaži kot v stekleni embalaži, ni bilo mogoče opaziti razlik. Bilo pa je opaziti razlike v spreminjanju posameznih analiziranih spojin. Koncentracija fenolnih kislin se je povešala, koncentracija hesperidina znižala. Koncentraciji eriocitrina in narirutina sta ostali razmeroma stabilni.

Pri pomarančnem soku je bilo občutneje opaziti razlike, nastale v odvisnosti od režima pasterizacije, saj je bila vrednost fenolnih kislin ter eriocitrina in narirutina višja v pomarančnem soku, ki je bil napolnjen v stekleno embalažo. Izjema je bil hesperidin, pri katerem je bila pri polnjenju v stekleno embalažo koncentracija nižja.

Razviden je bil tudi razpad karotenoidov. Najhitreje je razpadal zeaksantin, sledila sta mu β -kriptoksantin in β -karoten. Za najstabilnejšega se je izkazal lutein.

Za borovničev nektar, napolnjen po aseptični tehnologiji v različne PET plastenke so se izvedle analize posameznih in skupnih antocianov, skupnih polifenolov in antioksidativne učinkovitosti po metodi DPPH. Vse določitve so pokazale razmeroma hitro upadanje vsebnosti. Najhitrejši razpad je bilo zaslediti pri antocianih.

Vse določitve so nakazale razlike med PET embalažami, ki vsebujejo aktivni lovilec, in embalažo, ki lovilca ne vsebuje. iz analize antioksidativne učinkovitosti je mogoče zaključiti da troslojna PET platenka nudi najboljšo zaščito. Platenka z vmešanim aktivnim lovilec in petslojna platenka nudita približno isto zaščito, najslabšo zaščito pa nudi platenka brez zaščite proti kisiku.

V pomarančnem soku so bile narejene analize skupnih polifenolov, antioksidativne učinkovitosti, askorbinske kisline in karotenoidov. Kljub temu, da so bili nekateri parametri

kakovosti različni, so dali razmeroma podobne rezultate kot analize borovničevega nektarja. Vse analize so nakazale razliko med referenčno plastenko in plastenkami z lovilci kisika. Analiza skupnih polifenolov in individualnih karotenoidov je pokazala, da troslojna plastenka nudi boljšo zaščito od plastenke, ki ima vmešan aktivni lovilec.

6.2 SUMMARY

Functional foods promotion is increasing consumers' awareness about the influence selected foods can have on their health. The beneficial influence on health is often connected to natural food colors such as anthocyanins and other antioxidants. These components have an influence on the development of heart disease, diabetes, cancer and other, mostly age related diseases. The consumption of fresh fruit is seasonal in its nature. Therefore, technological procedures for food conservation are essential. These procedures keep products microbiologically intact and should be conducted in such a way that the beneficial compounds and nutritional value are preserved. The most common procedure is processing fruits into juices and nectars. The problem which occurs in fruit processing is that heat applied for this kind of processing promotes the destruction of phenols and other antioxidants. Heat increases thermodynamically influenced chemical reactions and so phenols and other antioxidants are used up in various processes during packaging and storing, before the consumers can benefit from them. With this, any useful effect they might have is decreased.

The oldest technology of dealing with heat processing and filling is hot fill technology into glass packaging. This kind of packaging provides relatively good protection to the product as it is not permeable for oxygen. Oxygen is an important factor responsible for the destruction of phenolics. On the other hand, extensive heat used for pasteurization has a negative influence on product quality. Another negative property of a more practical nature is packaging weight. In comparison with other types of packaging, a relatively large weight is needed to achieve a bottle which would not break under forces created during processing and logistics. Because of this, glass packaging is the most expensive.

In order to overcome these problems, the technology of filling product in carton was developed. The carton is laminated with LDPE and aluminum foil and can be chemically sterilized. Heat processing has been optimized to the optimum values needed for product protection. After heat processing, the product is cooled down. The technology is called aseptic, as filling is carried out in a space free of micro organisms into sterilized packaging. With this kind of procedure, it is possible to guarantee minimum destruction of health promoting substances and minimum effect on product taste. However, this is true only in the case of heat pasteurization and during last few years other sorts of pasteurizations are being developed as well. During the former, the foil is welded on while the product is still in the aseptic space and so it remains free of micro organisms. Nevertheless, there are also some negative properties of this kind of packaging. Although it contains aluminum foil, it is still to some extension permeable for oxygen, mostly on joints. Once opened, this kind of

packaging is also relatively soft, especially in larger volumes. It therefore requires more careful handling as other types of packaging.

The next step in the development of packaging combines aseptic filling and packaging stability - the aseptic filling of product into polymer packaging. The material which is used most often today is polyethylene terephthalate, which can also be used for carbonated beverages. Packaging material of this kind gives sufficient flexibility and strength to the product despite its relatively small weight. At first, microbiologically undemanding drinks and drinks with added preservatives were filled into PET bottles. Aseptic technology was developed later on, as first PET bottles could not endure hot fill conditions. Aseptic technology for this purpose requires a much bigger aseptic space for manipulation, and is therefore also more sensitive in terms of maintaining a sterile environment. The problem, which still persists with using this type of packaging, is substantial permeability for gasses. Normally only drinks without fruit or drinks with lower fruit content were filled into this kind of packaging. Because of its convenience, however, new materials and packaging production technologies were developed. This new kind of packaging has a decreased permeability for gasses and it also has a protective role as it absorbs oxygen from the product. Juices, nectars, beer and wine can now be filled into these kinds of materials.

In order to determine the influence of different PET packaging materials on phenolics compounds and other antioxidants, orange juice and blueberry nectar were filled by aseptic technology into four different PET bottles. Materials and technologies used are sold on the European and USA markets. One series of samples was filled in monolayer virgin PET used usually for drinks with lower fruit content. The second series also made use of monolayer technology with the exception that an oxygen scavenger was blended with the virgin PET material in the process of extrusion. Because of the addition of the oxygen scavenger it was more expensive than the virgin PET bottles, but cheaper than multilayer bottles. The third and fourth series were filled using co- extrusion technology, which keeps the oxygen scavenger material in the middle of bottle wall. Because of this, the oxygen scavenging effect is more focused on product protection. Bottles from the third series were made of three layers. This kind of bottle is mostly used on the European market. Bottles from the fourth series were five- layer multilayer bottles sold on the USA market.

In order to determine individual phenol and antioxidant content, different identification and quantification analytical methods were either fully or partially developed. For individual anthocyanin determination two methods were developed. The first method included identification with mass spectroscopy. This kind of detection was needed for detailed identification of a vast amount of similar anthocyanins. Another method had identification in visible part of the spectrum and low pH of mobile phases. Those two conditions helped

in establishing good repeatability of sample analysis (RSD was approximately 2 %). Because of the development of those two methods, 15 anthocyanins were identified and 14 quantified. By comparison of degradation coefficients the most suitable anthocyanin color was determined. A similar method was developed for most stable carotenoid determination; with the exception that the amount of separate identified and quantified carotenoids was smaller. A method for phenolics acid and flavonoid determination was also partially developed. This method also quantifies HMF content in the same run.

Individual and total anthocyanin analyses in blueberry-aronia nectar filled in glass and carton show that anthocyanins in product filled in carton have a 22 % higher constant of degradation than anthocyanins in product filled in glass. It is also possible to determine that anthocyanins degrade by the first order kinetics. It is possible to describe their degradation by exponential function. Degradation occurs relatively fast and after 183 days of storage on 30 °C, there are only 8 % of total anthocyanins still present in product filled in carton. After 204 days of storage under the same conditions, there are only 10 % of initial anthocyanins still present in blueberry-aronia nectar filled in glass. Initial anthocyanin concentrations are 7 % higher in product filled by aseptic technology as by hot fill technology because of longer thermal processing.

Individual anthocyanins degrade by different speeds and the influence of aglycon part and glycosylated sugar on stability could be determined. Anthocyanins containing cyanidin are the most stable, followed by peonidin and petunidin anthocyanins. The least stable are delphinidin and malvidin anthocyanins, where difference could not be determined. While observing different glycosylated sugars, it was determined that anthocyanins which have glycosylated glucose are the most stable, followed by galactose and arabinose. Among anthocyanins analyzed, cyanidin 3-glycoside was the most stable and so the most appropriate as food colorant.

Orange juice filled by aseptic and hot fill technology in glass and carton packaging was used for individual carotenoid, phenolic acid, flavonoid and HMF content determination. With the exception of HMF, no differences were observed in between samples in different packaging. It was established that HMF concentration increases faster in orange juice filled in carton than in juice filled in glass. However, differences in samples with different storage time could be determined. Phenolic acid content increased, while hesperidin concentration decreased most at the beginning of storage. Eriocitrin and narirutin concentrations remained stable during shelf life.

Differences were also observed between samples pasteurized by two different thermal processing technologies. Phenolic acid, eriocitrin and narirutin concentrations were higher

in glass, while initial concentration of hesperidin was lower. In the same product, carotenoid degradation occurred. Zeaxanthin concentration decreased with the highest speed, followed by β -criptoxantin in β -carotene. Lutein was the most stable.

Blueberry nectar filled by aseptic technology in different PET bottles was used for individual and total anthocyanin analyses, total polyphenols analyses and antioxidant activity by DPPH method. All analyses showed quick changing of concentrations during storage. Degradation was by relative scale most evolved while observing anthocyanins.

All analyses showed differences between PET bottles containing oxygen scavenger and bottles made from virgin PET. Antioxidant activity analyses showed that three - layer multilayer bottles give the best protection to the product. Blend PET bottles and five- layer multilayer bottles are in the same range. Bottles made from virgin PET give the lowest level of protection against product oxidation.

Orange juice filled by the same technology in the same packaging was used for total polyphenols analyses and antioxidant activity analyses. In the same product, the stability of ascorbic acid and carotenoids was also inspected. Although some stability parameters are different than in blueberry nectar, the results are similar. All analysis showed a difference between the reference bottle and oxygen scavenging PET bottles. Individual carotenoid and total polyphenols analyses showed that three- layer multilayer bottle preserves orange juice better than blend PET bottles.

7 VIRI

Abrams J.M., White K., Fessler L., Steller H. 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 117, 1: 29–44.

Alasalvar C., Al-Farsi M., Quantick P.C., Shahidi F., Wiktorowicz R. 2005. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, 89, 1: 69–76.

Alighourchi H., Barzegar M. 2009. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90, 2:179–185.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 17: 7915–7922.

Arima H.K., Rodriguez-Amaya D.B. 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from Northeastern Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 40, 2: 284–292.

Ascherio A., Stamper M.J., Colditz G.A., Willett W.C., McKinlay J. 1991. Nutrient intakes and blood pressure in normotensive males. *International Journal of Epidemiology*, 20, 4: 886–891.

Ashie I.N.A., Simpson B.K. 1996. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International*, 29, 5–6: 569–575.

Ashurst P.R. 1998. *The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Sheffield, Sheffield Academic Press: 258 str.

Ayhan Z., Yeom H.W., Zhang Q.H., Min D.B. 2001. Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2: 669–674.

Ayton F. 1999. *Plastics as barrier materials in beverage packaging*. V: *Handbook of beverage packaging*. Giles G.A. (ed.). 1999. Sheffield, Sheffield Academic Press: 120–137.

Baiano A., Marchitelli V., Tamagnone P., Del Nobile M.A. 2004. Use of active packaging for increasing ascorbic acid retention in food beverages. *Journal of Food Science*, 69, 9: 502–508.

Baude C.K. 2008. A preliminary analysis of PET barrier technologies and mechanical performance related to a 3l PET wine bottle. Master of science thesis. New York, College of Applied Science and Technology, Department of Packaging Science: 49 str.

Beckman J.S. 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxy-nitrite. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 5: 836–844.

Bohm B. 1998. Introduction of flavonoids. London, Taylor & Francis Group: 496 str.

Brody A.L., Marsh K.S. 1997. The Wiley encyclopedia of packaging technology. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons: 1048 str.

Cadet J., Ravanat J.-L., Buchko G.W., Yeo H., Ames B.N. 1994. Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods in Enzymology*, 234, 79–88.

Castellari M., Matricardi L., Arfelli G., Galassi S., Amati A. 2000. Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. *Food Chemistry*, 69, 1: 61–67.

Cavalcante M.L., Rodriguez-Amaya D.B. 1992. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. V: Food science and human nutrition. Charalambous G. (ed.). Amsterdam, Elsevier Science Publish Publishers: 643–650.

ColorMatrix. 2008. Amosorb® Active Oxygen Scavenger. Merseyside, ColorMatrix Europe Ltd.
<http://colormatrix-site.dev.rippleffect.com/en/> (december 2008):1 str

Cheyrier V., Moutounet M. 1992. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2038–2044.

Christen Y. 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, Suppl. 71, 2: 621S–629S.

Chow C.K. 1993. Vitamin E and cigarette smoking-induced oxidative damage. V: *Vitamin E in health and disease*. Packer L., Fuchs J. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 683–699.

Conard K.R., Davidson V.J., Mulholland D.L., Britt I.J., Yada S. 2005. Influence of PET and PET/PEN blend packaging on ascorbic acid and color in juices exposed to fluorescent and UV light. *Journal of Food Science*, 70, 1: 19–25.

Cortes C., Esteve M.J., Frigola A. 2008. Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Control*, 19, 2: 151–158.

Corts C., Torregrosa F., Esteve M.J., Frigola A. 2006. Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice and orange juice treated with high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 17: 6247–6254.

Cserhalmi Z., Sass-Kiss Á., Tóth-Markus M., Lechner N. 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7, 1–2: 49–54.

De Groot H., Rauen U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 12, 3: 249–255.

DeMan J.M. 1999. *Principles of food chemistry*. 3rd ed. Maryland, Aspen Publishers: 520 str.

Djuric Z., Depper J.B., Uhley V., Smith D., Lababidi S., Martino S., Heilbrun L.K. 1998. Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. *Journal of the American Dietetic Association*, 98, 5: 52–528.

Določanje L(+) askorbinske kisline (vitamina C). HPLC metoda. M 06-2212. 2004. Ljubljana, Kemijski inštitut: 2 str.

Določanje polifenolov: celokupni, taninski, netaninski. Spektrofotometrična metoda. M 06-5206. 1995. Ljubljana, Kemijski inštitut: 3 str.

Določanje sladkorjev s tankoplastno kromatografijo. Kromatografska metoda. M 06-1208. 1994. Ljubljana, Kemijski inštitut: 4 str.

Dolores del Castillo M., Corzo N., Olano A. 1999. Early stages of Maillard reaction in dehydrated orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10: 4388–4390.

Douziech N., Seres I., Larbi A., Szikszay E., Roy P.M., Arcand M., Dupuis G., Fulop J.T. 2002. Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Experimental Gerontology*, 37, 2: 369–387.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 13, 4: 341–390.

Esteve M.J., Frigola A., Rodrigo C., Rodrigo D. 2005. Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 9: 1413–1422.

Fredsted L.B. 1995. Processing systems for fruit juice and related products. V: *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages*. 2nd ed. Ashurst P.R. (ed.). London, Blackie academic & Professional: 274–289.

Giles G.A. 2005. Packaging materials. V: *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. 2nd ed. Ashurst P.R. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 200–235.

Gillman M.W., Cupples L.A., Gagnon D., Posner B.M., Ellison R.C., Castelli W.P., Wolf P.A. 1995. Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. *Journal of the American Medical Association*, 273, 14: 1113–1117.

Girling P.J. 1999. Packaging of beverages in glass bottles. V: *Handbook of beverage packaging*. Giles G.A. (ed.). Sheffield, Sheffield Academic Press: 53–70.

Guillet B. 2008. Focus: beer the PET alternative. Sidelonline, Sidel Corporate SAS: www.sidel.com (december 2008) 52 str.

Gunning P. 1999. Packaging of beverages in polyethethelene terephthalate (PET) bottles. V: Handbook of beverage packaging. Giles G.A. (ed.). Sheffield, Sheffield Academic Press: 7–92.

Halliwell B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research*, 25, 1: 57–74.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.

Heredia F.J., Francia-Aricha E.M., Rivas-Gonzalo J.C., Vicario I.M., Santos-Buelga C. 1998. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. *Food Chemistry*, 63, 4: 491–498.

Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 8878: 1007–1011.

Hernandez R.J. 1997. Food packaging materials, barrier properties and selection. V: Handbook of food engineering practice. Valentas K.J., Rotstein E., Singh R.P. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 291–361.

Hosahalli S.R. 2005. Thermal processing of fruits. V: Processing fruits, science and technology. 2nd ed. Barrett D.M., Somogyi L., Ramaswamy H. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 173–200.

Hui Y.H., Nip W., Nollet L.M.L. Paliyath G., Simpson B.K. 2006. Food biochemistry and food processing. Oxford, Blackwell Publishing: 769 str.

Hunt M.D., Eannetta N.T., Yu H., Newman S.M., Steffens J.C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 21, 1: 59–68.

Ichiyangi T., Oikawa K., Tateyama C., Konishi T. 2000. Acid mediated hydrolysis of blueberry anthocyanins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1: 114–117.

ILSI. 2000. Report on packaging materials: Polyethylene terephthalate (PET) for food packaging applications. Brussels, ILSI - International Life Science Institute Europe: 20 str. <http://www.ilsil.org> (november 2008): 20 str.

Inze D., Montagu M.V. 2002. Oxidative stress in plants. London, Taylor & Francis Group: 336 str.

Iversen C.K. 1999. Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science*: 64, 1: 37–41.

Jacob R.A., Burri B.J. 1996. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition, Suppl.* 63, 6: 985S–990S.

Jejčič L. 1996. Možnost uporabe netreska (*Sempervivum spp.*) pri proizvodnji sadnih sokov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.

Joseph M.A., Lloyd W.R. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65, 9: 1199–221.

Joshi K.J., Ascherio A., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E., Hennekens C.H., Spiegelman D., Willett W.C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *Journal of the American Medical Association*, 282, 13: 1233–1239.

Kalt W., Forney C.F., Martin A., Prior R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 11: 4638–4644.

Kalt W., McDoncald J.E., Donner H. 2000. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *Journal of Food Science*, 65, 3: 390–393.

Känhkönen M.P., Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3: 628–633.

Kennedy T.A., Liebler D.C. 1992. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 7: 4658–4663.

Keppler K., Humpf H.U. 2005. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 17: 5195–5205.

Kirca A., Cemeroğlu B. 2003. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry*, 81, 4: 583–587.

Kirca A., Özkan M., Cemeroğlu B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various juices and nectars. *Food Chemistry*, 97, 4: 598–605.

Kirca A., Özkan M., Cemeroğlu B. 2007. Effect of temperature, solid content and pH on the stability of black currant anthocyanins. *Food Chemistry*, 101, 1: 212–218.

Kirwan M.J., Strawbridge J.W. 2003. *Plastics in food packaging*. V: *Food packaging technology*. Coles R., McDowell D., Kirwan M.J. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd, Boca Raton, CRC Press LLC: 174–240.

Klimczak I., Małeck M., Szlachta M., Gliszczyńska-Świgło A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 3–4: 313–322.

Lapornik B. 2003. *Priprava ekstraktov iz odpadnih rastlinskih materialov za povečanje antioksidativne vrednosti izbranih napitkov*. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 114 str.

Lapornik B. 2005. *Stabilnost polifenolov med staranjem v polizdelkih iz črnega ribeza*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 122 str.

Lapornik B., Prošek M., Golc Wondra A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 2: 214–222.

Lee H.S., Chen C.S. 1998. Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperatures of 4–24 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 11: 4723–4727.

Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*, 67, 5: 1660–1667.

Levander O.A., Burk R.F. 1996. Selenium. V: Present knowledge in nutrition. Ziegler E.E., Filer L.J. (eds.). Washington, DC, ILSI Press: 320–328.

Levine M., Conry-Cantilena C., Wang Y., Welch R.W., Washko P.W., Dhariwal K.R., Park J.B., Lazarev A., Graumlich J.F., King J., Cantilena L.R. 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 93, 8: 3704–3709.

Loft S., Poulsen H.E. 1996. Cancer risk and oxidative damage in man. *Journal of Molecular Medicine*, 14, 1: 297–312.

Marshall M.R., Kim J., Wei C. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. Rome, Chief Publishing and Multimedia Service FAO. <http://www.fao.org> (november 2008) : 39 str.

Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press: 392 str.

Mercadante A.Z., Rodriguez-Amaya D.B. 1998. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1: 128–130.

Mezzetti A., Cipollone F., Cucurullo F. 2000. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovascular Research*, 47, 3: 475–488.

Milivojević L. 2007. Vpliv pektolitičnih encimov na fenolne spojine soka črnega ribeza. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerzitetni študijski program kemija: 51 str.

Nagy S., Chen C.S., Shaw P.E. 1993. Fruit juice processing technology. Auburndale, AGS, Inc: 713 str.

Nermark C. 1999. Packaging of beverages in drink cartons. V: Handbook of beverage packaging. Giles G.A. (ed.). Sheffield, Sheffield Academic Press Ltd: 139–160.

Niki E. 1997. Free radicals in chemistry and biochemistry. V: Food and free radicals. Hiramatsu M., Yoshikawa T., Inoue M. New York, Plenum Press: 1–11.

Newman S.M., Eannetta N.T., Yu H., Prince J.P., Carmen de Vicente M., Tanksley S.D., Steffens J.C. 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Molecular Biology*, 21, 6: 1035–1051.

Plestenjak A., Požrl T. 2000. Pakiranje in materiali za preprečevanje oksidacije živil. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.–27. okt. 2000. Žlender B., Gašperin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 159–165.

Polydera A.C., Stoforos N.G., Taoukis P.S. 2005. Effect of high hydrostatic pressure treatment on postprocessing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91, 3: 495–503.

Pratico D., Reilly M., Lawson J.A., Fitzgerald G.A. 1997. Novel indices of oxidant stress in cardiovascular disease: specific analysis of F₂-isoprostanes. *Agents and Actions Supplements*, 48: 25–41.

Punchard. N.A., Kelly F. 1997. Free radicals: A practical approach. New York, Oxford University Press: 310 str.

Raghavan G.S.V., Vigneault C., Gariepy Y., Markarian N.R., Alvo P. 2005. Refrigerated and controlled/modified atmosphere storage. V: Processing fruits: science and technology. 2nd ed. Barrett D.M., Somogyi L., Ramaswamy H.S. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 23–53.

Rassis D., Saguy I. 1995. Oxygen effect on nonenzymatic browning and vitamin C in commercial citrus juices and concentrate. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 3: 285–290.

Reaven P.D., Khouw A., Beltz W.F., Parthasarathy S., Witzum J.L. 1993. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by β -Carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13: 590–600.

Rice-Evans C., Miller N.J., Bolwell P.G, Bramley P.M., Pridham J.B. 1995. The relative antioxidant activity of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 4: 375–383.

Rice-Evans C., Miller N.J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24: 790–795.

Roberts L. J., Morrow J.D. 2000. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 4: 505–513.

Rodriguez-Amaya D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, OMNI Research, ILSI Human Nutrition Institute: 71 str.
<http://www.ilsis.org> (november 2008)

Roig M.G., Bello J.F., Rivera Z.S., Kennedy J.F. 1999. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Research International*, 32, 8: 609–619.

Ros-Chumillas M., Belissario Y., Iguaz A., López A. 2007. Quality and shelf life of orange juice aseptically packaged in PET bottles. *Journal of Food Engineering*, 79, 1: 234–242.

Ross R. 1992. The pathogenesis of atherosclerosis. V: Heart disease. Braunwald E. (ed.). Philadelphia, W. B. Saunders: 1106–1124.

Rubinskiene M., Viskelis P., Jasutiene I., Viskeliene R., Bobinas C. 2005. Impact on various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International* 38, 8–9: 867–871.

Sauermann N. 2008. On the advance. *VR Beverage Packaging*. Frankfurt, P. Keppeler Verlag GmbH & Co. KG.
www.verpackungsrundschau.de (december 2008): 43 str.

Sautue-Gracia M.T., Heinonen M., Frankel F.N. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 9: 3362–3367.

Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, Suppl. 130, 8: 2073S–2085S.

Schieber A., Keller P., Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910: 265–273.

Schröter W., Lautenschläger K.H., Bibrack H., Schnabel A. 1993. *Kemija: splošni priročnik*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 712 str.

Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., Hiller R., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Gragoudas E.S., Haller J., Miller D.T., Yannuzzi L.A., Willett W.C. 1994a. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, advanced age-related macular degeneration. *Journal of the American Medical Association*, 272, 18: 1413–1420.

Seddon J.M., Christen W.G., Manson J.E., LaMotte. F.S., Glynn R.J., Buring J.E., Hennekens C.H. 1994b. The use of vitamin supplements and the risk of cataract among US male physicians. *American Journal of Public Health*, 84, 5: 788–792.

Selke S.E.M., Culter J.D., Hernandez R.J. 2004. *Plastics packaging: Properties, processing, applications, and regulations*. 2nd ed. Munich, Carl Hansen Verlag: 448 str.

Siegmund B., Derler K., Pfannhauser W. 2004. Chemical and sensory effects of glass and laminated carton packages on fruit juice products—Still a controversial topic. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37, 4: 481–488.

Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, Suppl. 91, 3C: 31S–39S.

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2008. *Food composition and nutrition tables*. 7th ed. Souci S.W. (ed.). Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, Boca Raton, Taylor & Francis: 1364 str.

Solomon O., Svanberg U., Sahlström, A. 1995. Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *Food Chemistry*, 53, 4: 363–368.

Srivastava A., Akoh C.C., Yi W., Fischer J., Krewer G. 2007. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7: 2705–2713.

Stafford H. 1991. Flavonoid evolution: An enzymatic approach. *Plant Physiology*, 96: 680–685.

Steinberg D., Parathasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L. 1989. Beyond cholesterol; modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 320, 14: 915–924.

Stratil, P., Klejdus B., Kubáň V. 2007. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 4: 610-621.

Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: *Plant biochemistry*. Dey P.M., Harbourne J.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 387–416.

Taoukis P.S., Labuza T.P., Saguj I.S. 1997. Kinetics of food deterioration and shelf life prediction. V: *Handbook of food engineering practice*. Valentas K.J., Rotstein E., Singh R.P. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 361–405.

Taylor B. 2005. Fruit and juice processing. V: *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. 2nd ed. Ashurst P.R. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 35–66.

Teramura A.H., Sullivan J.H. 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research*, 39, 3: 463–473.

Thompson H.J. Heimendinger J., Haegele A., Sedlacek S.M., Gillette C., O'Neill C., Wolfe P.C. 1999. Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidation. *Carcinogenesis*, 20, 12: 2261–2266.

Tiwari B.K., O' Donnell C.P., Muthukumarappan K., Cullen P.J. 2009. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and omparison with thermally pasteurised juice. *Food Science and Technology*, 42, 3: 700–704.

Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., Gil M.I. 2000. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. V: (zbirka; vol. 23). *Bioactive natural products*. Atta-ur-Raman. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 739–795.

Torskangerpoll K., Andersen Ø.M. 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89, 3: 427–440.

Traber M.G., Sies H. 1996. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Reviews of Nutrition*, 16: 321–347.

Trošt K., Golc-Wondra A. 2008. Anthocyanin profiling of Slovenian and foreign wines by gradient HPLC-VIS. V: *Food production, nutrition, healthy consumers: First European Food Congress*, Ljubljana, Slovenija, 4-9 nov. 2008. Ljubljana, European Food Congress: p046.

Trošt K., Golc-Wondra A. 2008. Effect of storage and packaging on polyphenols, carotenoid and HMF content of commercially filled orange juice. V: *Food production, nutrition, healthy consumers: First European Food Congress*, Ljubljana, Slovenija, 4-9 nov. 2008. Ljubljana, European Food Congress: p045.

Trošt K., Golc Wondra A., Prošek M., Milivojević L. 2008. Anthocyanin degradation of blueberry-aronia nectar in glass compared with carton during storage. *Journal of Food Science*, suppl. 73, 8: S405–S411.

Trošt K., Golc-Wondra A., Prošek M., Milivojević L. 2008. Quick quantification of blueberry-aronia nectar anthocyanins by HPLC-VIS and identification by HPLC-ESI-MS. V: *32nd ISCC and 5th GCXGC symposium: Riva del Garda, Italy, 26.–30. maj 2008*. Sandra T., Sandra P. (eds.). Kortrijk, Belgija: I.O.P.M.S.

Trošt K., Golc Wondra A., Prošek M. 2007. Degradation of antioxidants in blueberry nectar aseptically filled in PET. V: *Food – new options for the industry: practical application of research results: EFFOST/EHEDG joint Conference 2007*, Lisbon, Portugal, 14.–16. nov. 2007. Wageningen: Elsevier.

Truscott T.G. 1990. The photophysics and photochemistry of the carotenoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 6: 359–371.

Turker N., Aksay S., Ekiz H.I. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota var. L.*) beverage: Shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 12: 3807–3813.

von Bockelmann B., von Bockelmann I. 1998. Long-life products: Heat-treated, aseptically packed: A guide to quality. SarSkarp, Tetrapak: 246 str.

Walton M. 2008. Principles of cleaning-in-place (CIP). V: *Cleaning-in-Place: dairy, food and beverage operations*. 3rd ed. Tamime A.Y. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 1–10.

Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2: 304–309.

Wang C.Y., Wang S.Y., Chen C. 2008. Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10: 3587–3592.

Wang W.D., Xu S.Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, 3: 271–275.

Watkinson W.J. 2008. Chemistry of Detergents and Disinfectants. V: *Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations*. 3rd ed. Tamime A.Y. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 56–80.

Weber P., Bendich A., Schalch W. 1996. Vitamin C and human health – a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 66, 1: 19–30.

Westhuysen J. 1997. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 27, 1: 1–10.

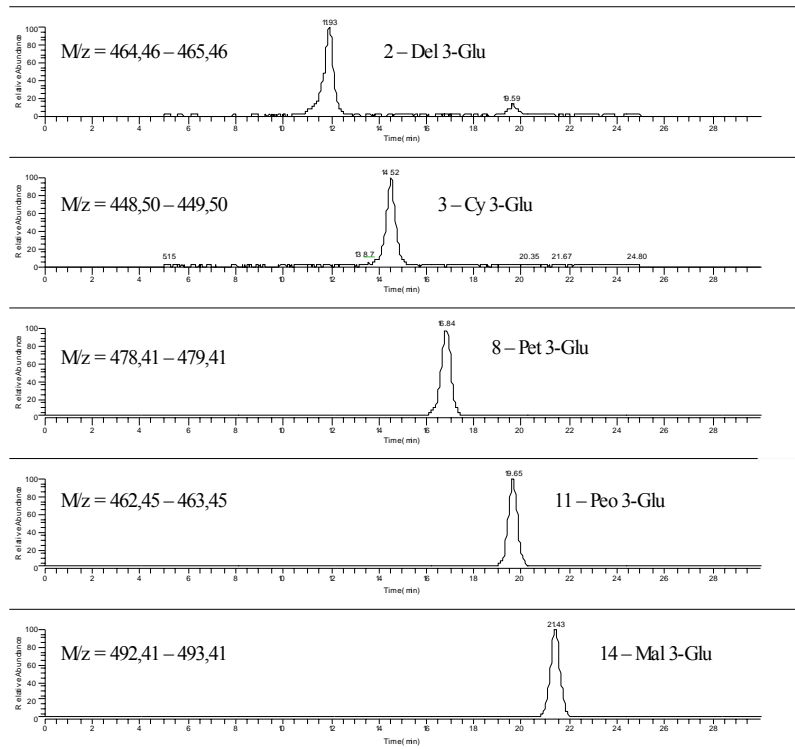
Winkel-Shirley B. 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, 107, 1: 142–149.

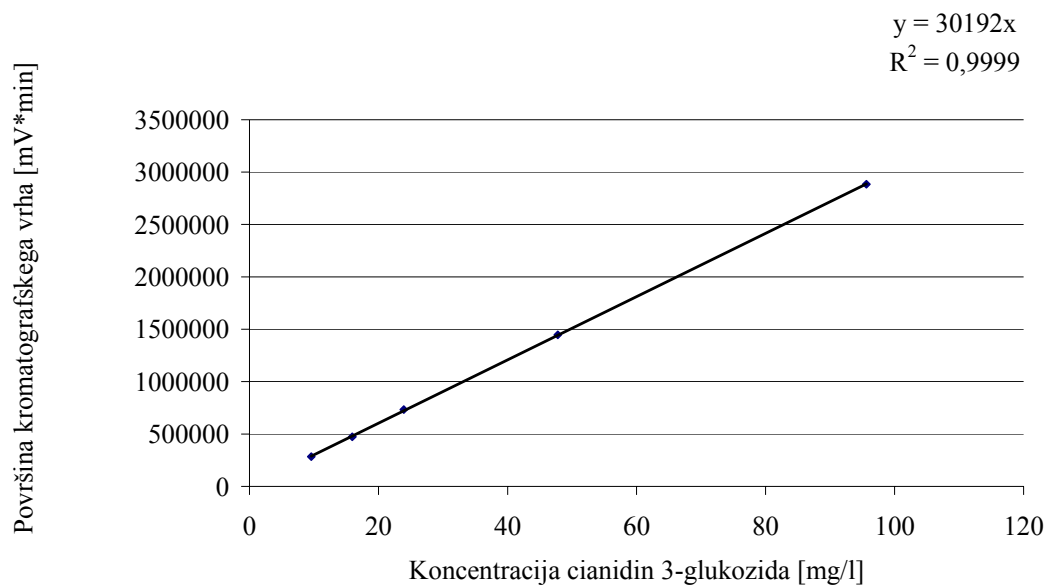
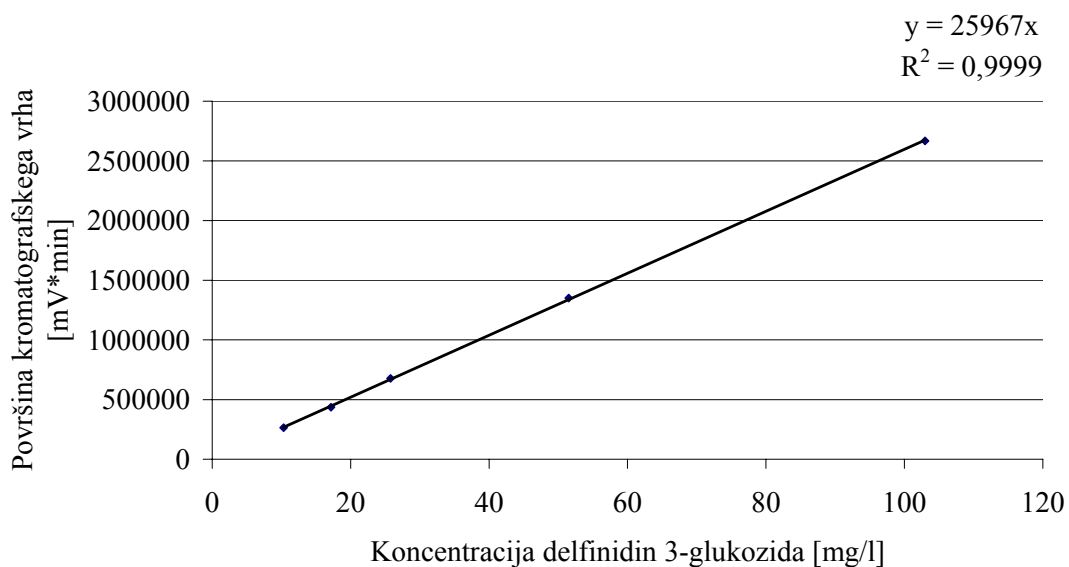
Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485–493.

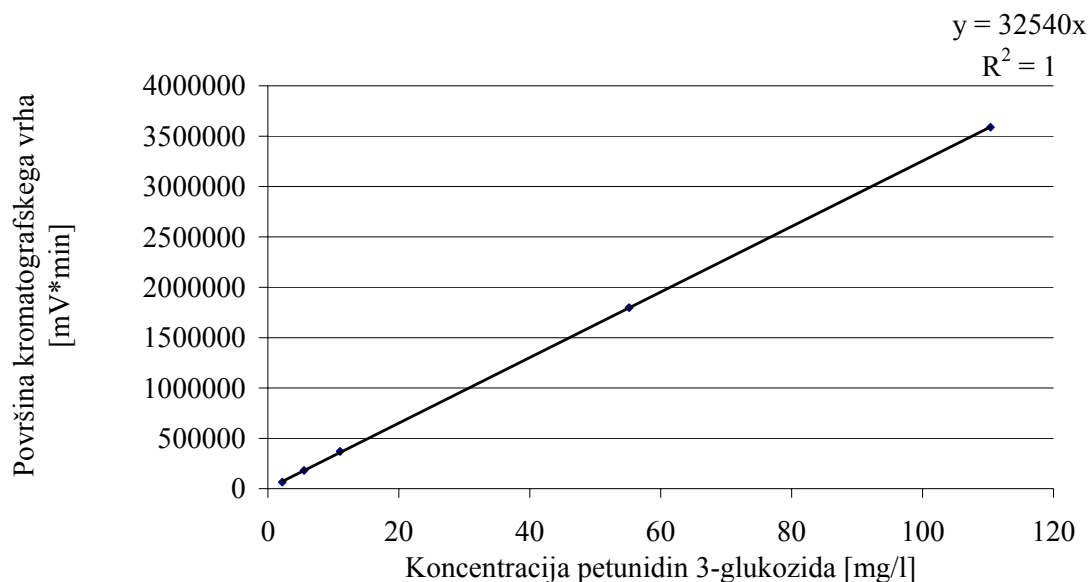
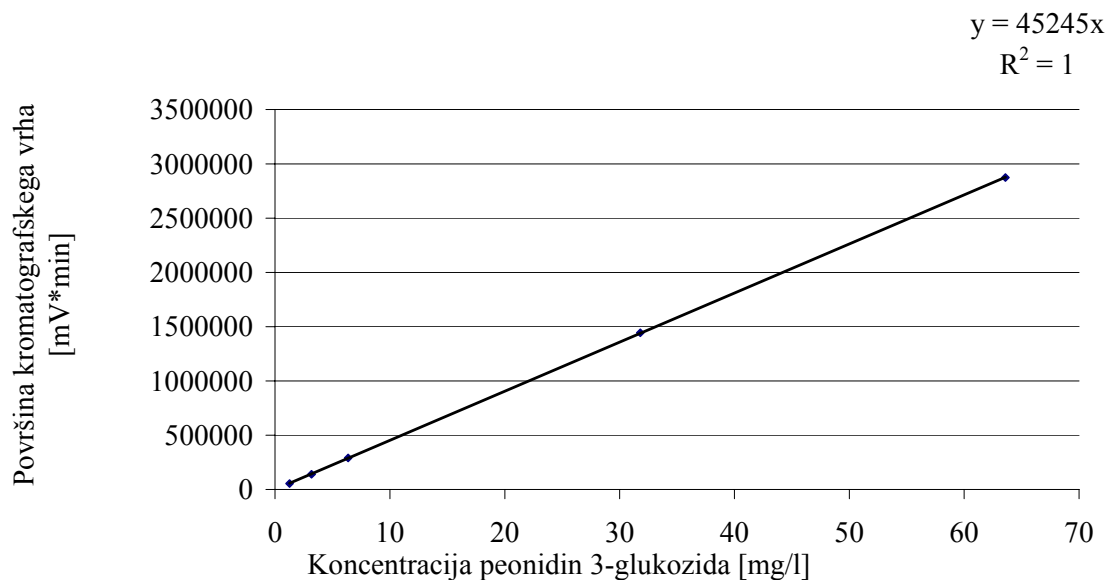
Yoshikawa Y., Fujimori T., McMahon A. P., Takada S. 1997. Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Development Biology*, 183, 2: 234–242.

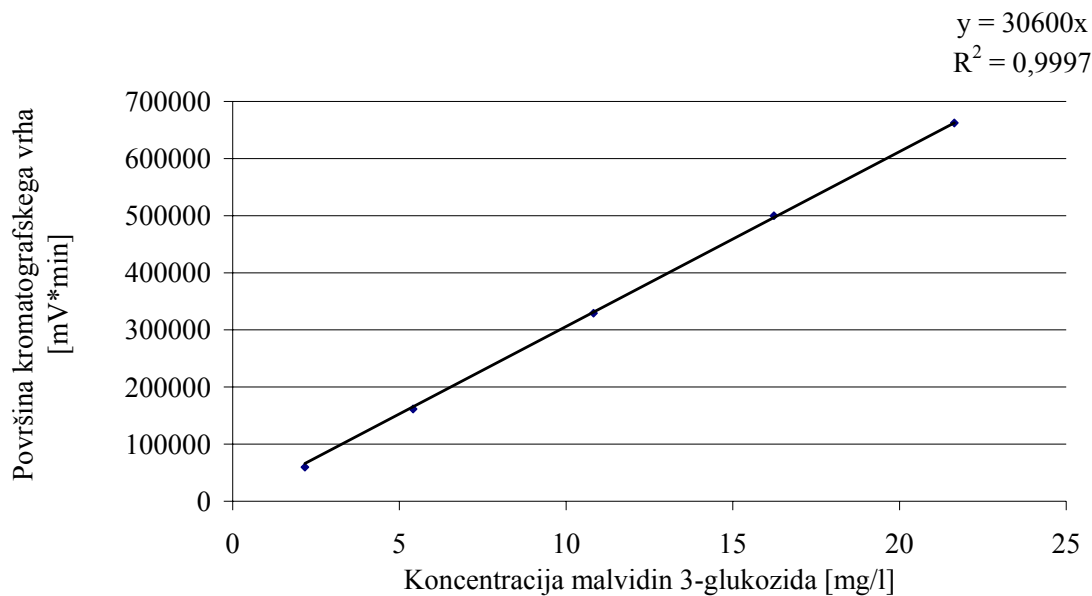
Zerdin K., Rooney M.L., Vermuë J. 2003. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chemistry*, 82, 3: 387–395.

Zheng Y., Wang C.Y., Wang S.Y., Zheng W. 2003. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 24: 7162–7169.

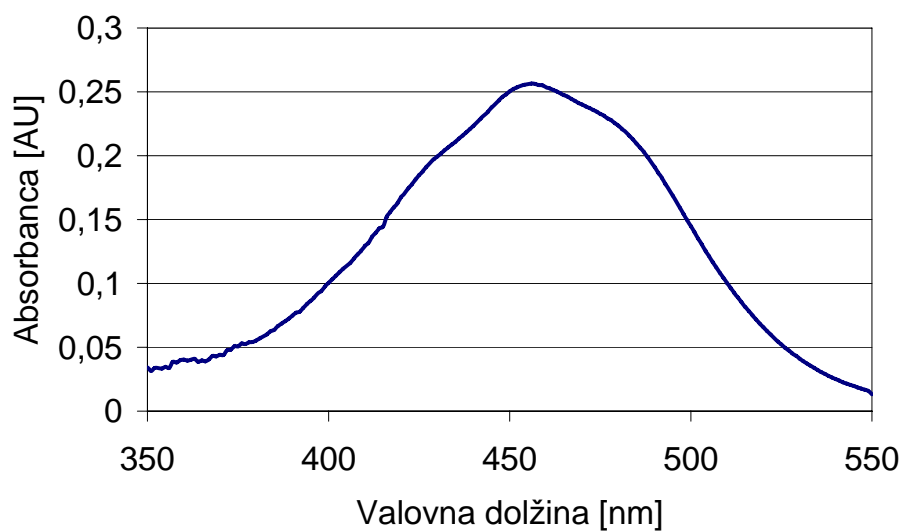
PRILOGE**Priloga 1. HPLC-MS kromatogram antocianinskih standardov**

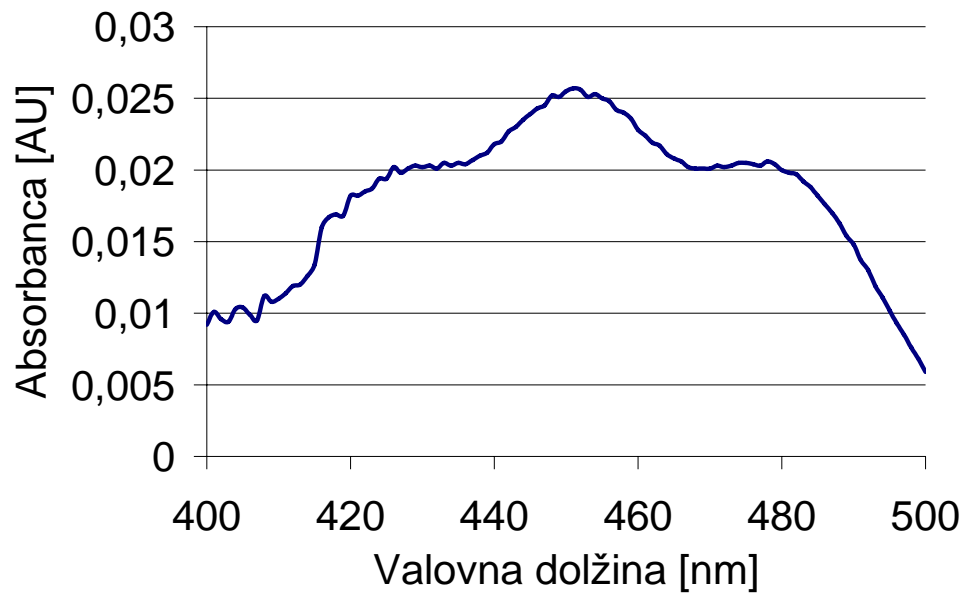
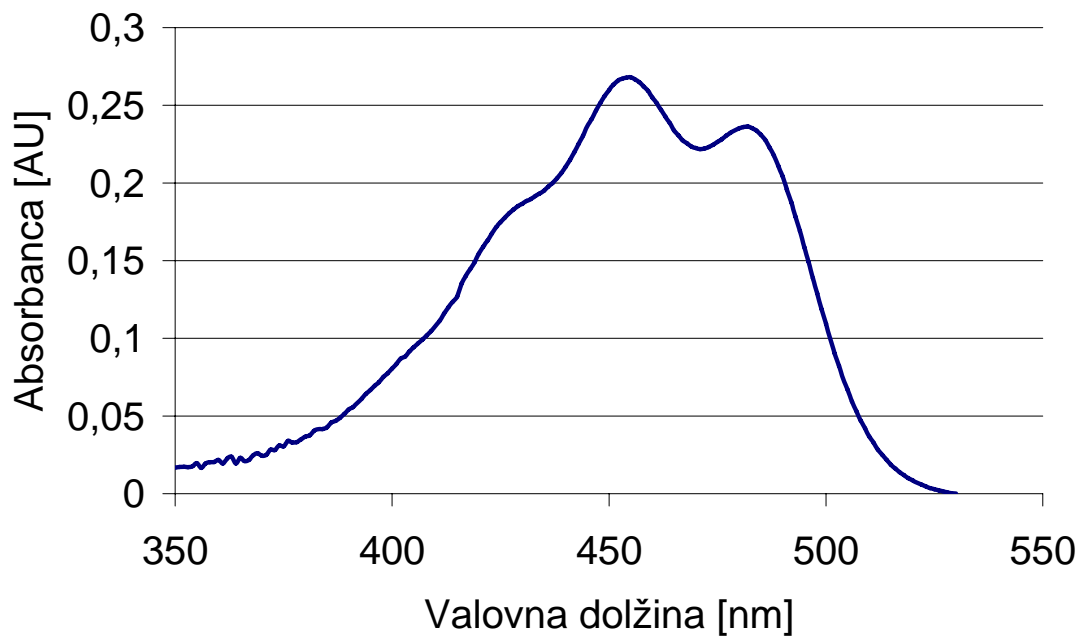
Priloga 2. Umeritvena krivulja za cianidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)**Priloga 3.** Umeritvena krivulja za delphinidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)

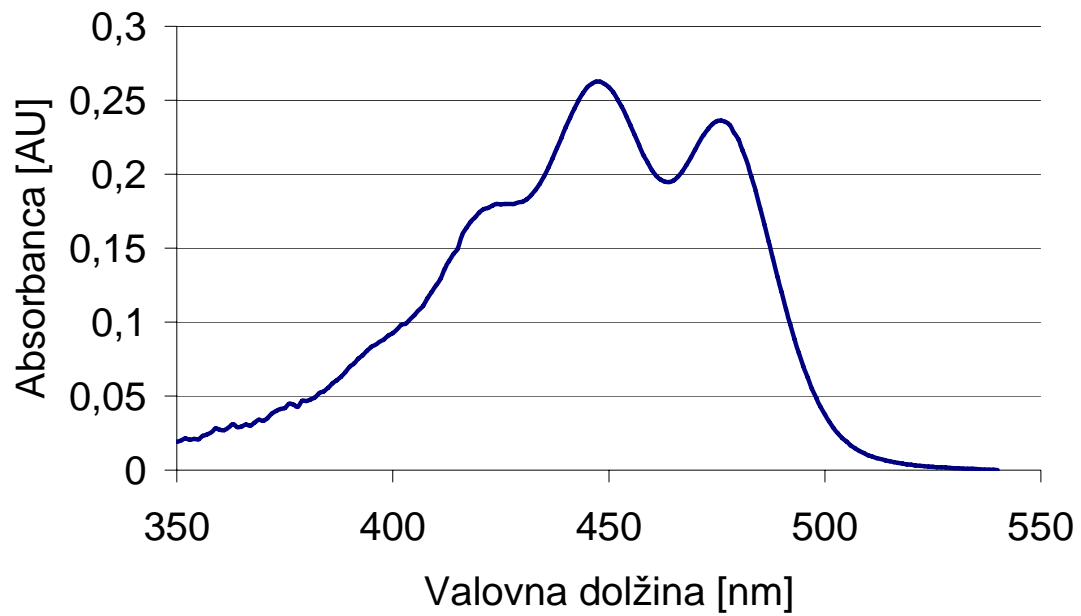
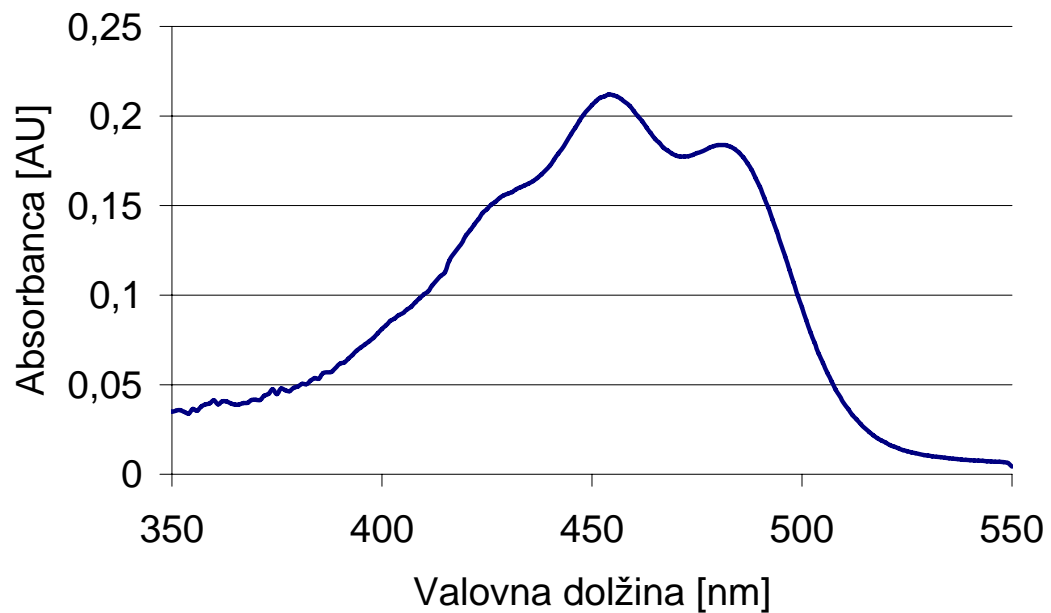
Priloga 4. Umeritvena krivulja za petunidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)**Priloga 5.** Umeritvena krivulja za peonidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)

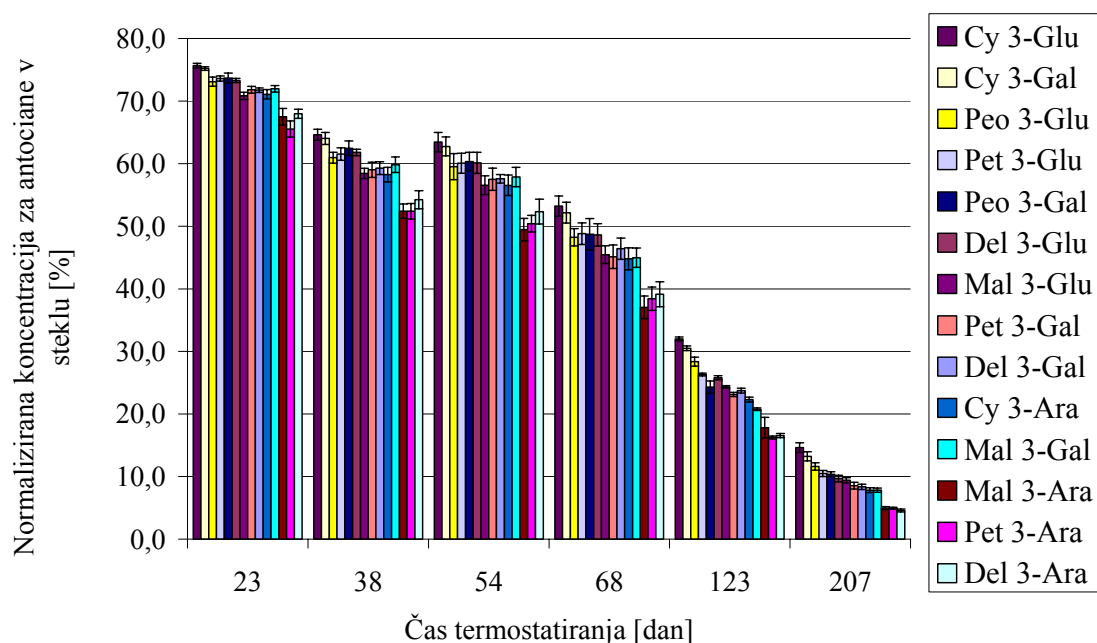
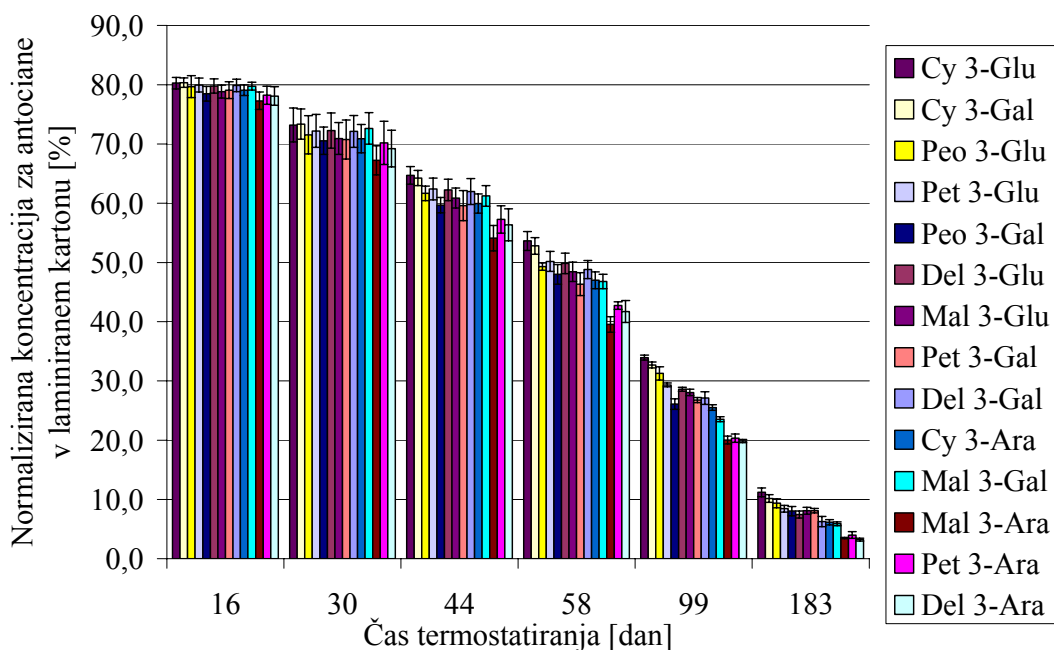
Priloga 6. Umeritvena krivulja za malvidin 3-glukozid (metoda za kvantitativno določanje antocianov)

Ostale umeritvene krivulje so narejene po istem postopku.

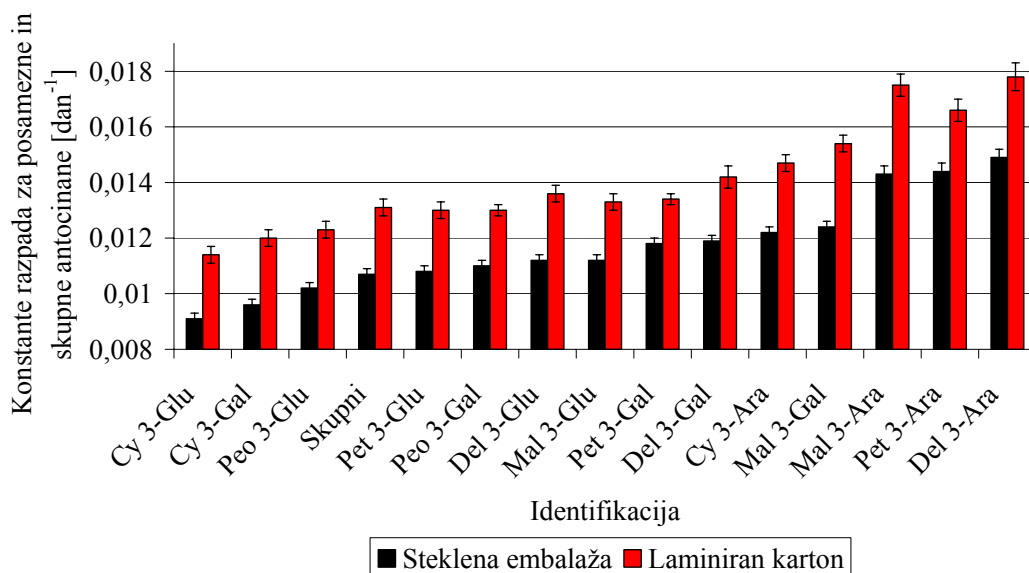
Priloga 7. Spekter β -apo-karotenala

Priloga 8. Spekter β -karotena**Priloga 9. Spekter zeaksantina**

Priloga 10. Spekter luteina**Priloga 11.** Spekter β -kriptoksantina

Priloga 12. Normalizirane koncentracije posameznih antocinaov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v stekleno embalažo**Priloga 13.** Normalizirane koncentracije posameznih antocinaov v nektarju iz borovnic in aronije, napolnjenem v večslojen karton

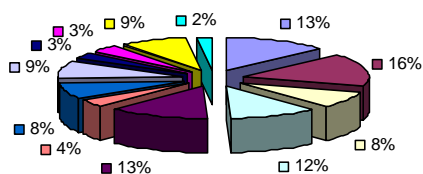
Priloga 14. Primerjalni graf koeficientov razpada posameznih antocianov v nektarju iz borovnic in aronije



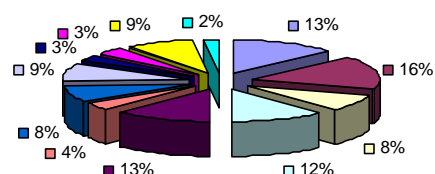
Priloga 15. Normalizirani deleži posameznih antocianov v borovničevem nektarju, napolnjenem v različno PET embalažo in vzorčenem na različne datume

■ Del 3-Gal ■ Del 3-Glu □ Cy 3-Gal □ Del 3-Ara ■ Cy 3-Glu ■ Pet 3-Gal
 ■ Cy 3-Ara □ Pet 3-Glu ■ Peo 3-Glu ■ Mal 3-Gal ■ Mal 3-Glu ■ Mal 3-Ara

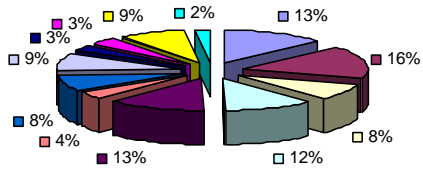
PET - 1 - vzorčenje 22.12.04



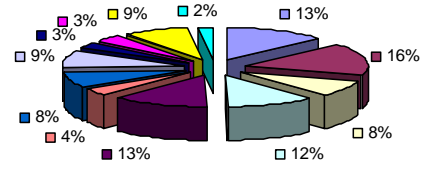
PET - 2 - vzorčenje 22.12.04



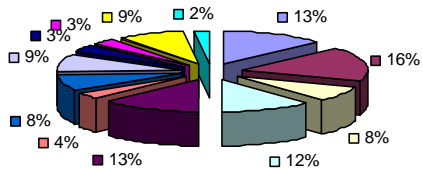
PET - 3 - vzorčenje 22.12.04



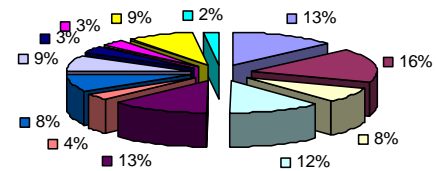
PET - 4 - vzorčenje 22.12.04



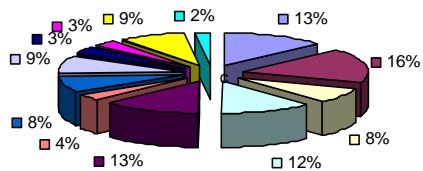
PET - 1 - vzorčenje 12.2.05



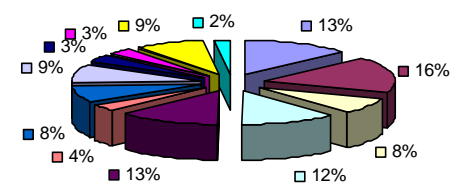
PET - 2 - vzorčenje 12.2.05



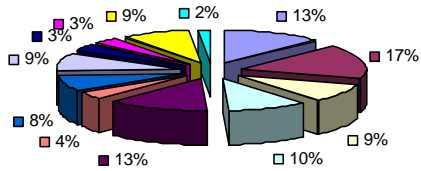
PET - 3 - vzorčenje 12.2.05



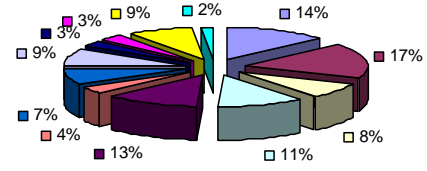
PET - 4 - vzorčenje 12.2.05



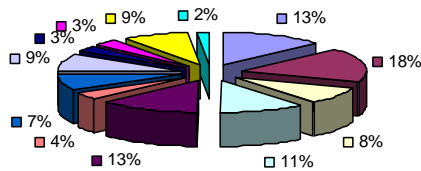
PET - 1 - vzorčenje 1.6.05



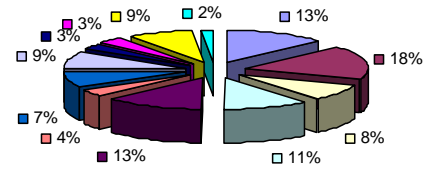
PET - 2 - vzorčenje 1.6.05



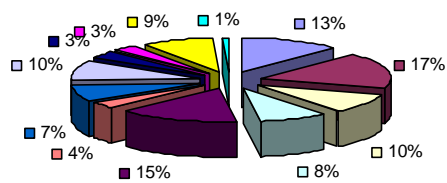
PET - 3 - vzorčenje 1.6.05



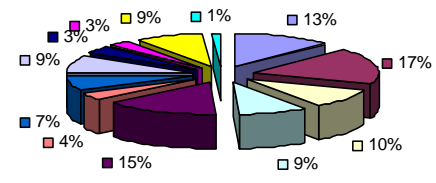
PET - 4 - vzorčenje 1.6.05



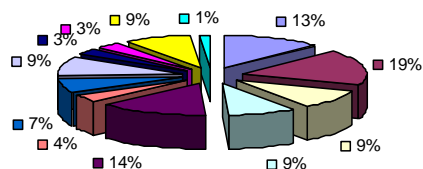
PET - 1 - vzorčenje 15.9.05



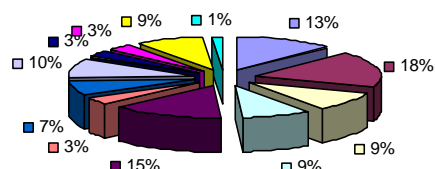
PET - 2 - vzorčenje 15.9.05



PET - 3 - vzorčenje 15.9.05



PET - 4 - vzorčenje 15.9.05



Priloga 16. Tabele koncentracij saharoze, fruktoze in glukoze v odvisnosti od vrste embalaže in datuma skladiščenja v borovničevem nektarju

Datum vzorčenja	Koncentracija saharoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	79	77	70	61
12.2.2005	79	71	63	65
1.6.2005	52	53	45	42
15.9.2005	26	23	25	27

Datum vzorčenja	Koncentracija fruktoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	25	27	25	27
12.2.2005	21	22	21	22
1.6.2005	38	33	34	32
15.9.2005	50	51	54	56

Datum vzorčenja	Koncentracija glukoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	19	20	23	25
12.2.2005	17	18	18	21
1.6.2005	31	25	29	26
15.9.2005	46	47	49	49

Priloga 17. Tabele koncentracij saharoze, fruktoze in glukoze v odvisnosti od vrste embalaže in datuma skladiščenja v pomarančnem soku

Datum vzorčenja	Koncentracija saharoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	38	39	38	37
12.2.2005	36	35	33	34
1.6.2005	34	32	29	33
15.1.2006	29	30	30	29

Datum vzorčenja	Koncentracija fruktoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	25	28	27	28
12.2.2005	26	26	25	25
1.6.2005	29	29	27	28
15.1.2006	29	30	31	29

Datum vzorčenja	Koncentracija glukoze [g/l]			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
22.12.2004	27	24	26	25
12.2.2005	26	25	23	26
1.6.2005	30	28	27	31
15.1.2006	31	30	33	31

Priloga 18. Tabele parametrov CIE 1976 barvnega prostora (L, a, b, ΔE) in njihovo spreminjanje s skladiščenjem in vrsto embalaže za borovničev nektar

	L parameter			
Datum vzorčenja	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	3,11	3,11	3,11	3,11
26.11.04	9,01	8,42	0,21	4,3
07.01.05	7,05	6,94	4,55	7,64
19.02.05	6,32	4,73	5,56	3,96
11.04.05	6,11	5,97	3,82	4,33
29.06.05	4,58	3,58	3,63	4,57
21.07.05	6,48	3,58	3,57	3,69

	a parameter			
Datum vzorčenja	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	-1,53	-1,53	-1,53	-1,53
26.11.04	2,48	0,37	-0,68	-0,79
07.01.05	0,54	0,43	0,67	0,4
19.02.05	1,12	0,72	0,67	0,76
11.04.05	1,44	1,2	0,73	0,7
29.06.05	1,3	1,3	0,76	1,17
21.07.05	0,8	1,51	0,37	0,25

	b parameter			
Datum vzorčenja	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	7,22	7,22	7,22	7,22
26.11.04	-4,03	-2,03	4,25	3,83
07.01.05	-0,74	-0,54	-0,75	-0,77
19.02.05	-0,4	-0,43	-0,83	0,05
11.04.05	-1,39	-2,35	1,14	0,61
29.06.05	0,46	-1,5	1,28	0,06
21.07.05	-0,36	-1,87	1,37	1,42

Datum vzorčenja	ΔE parameter			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	0,00	0,00	0,00	0,00
26.11.04	13,32	10,83	4,24	3,67
07.01.05	9,12	8,87	8,39	9,39
19.02.05	8,68	8,14	8,70	7,57
11.04.05	9,59	10,35	6,53	7,08
29.06.05	7,47	9,18	6,39	7,79
21.07.05	8,62	9,60	6,17	6,09

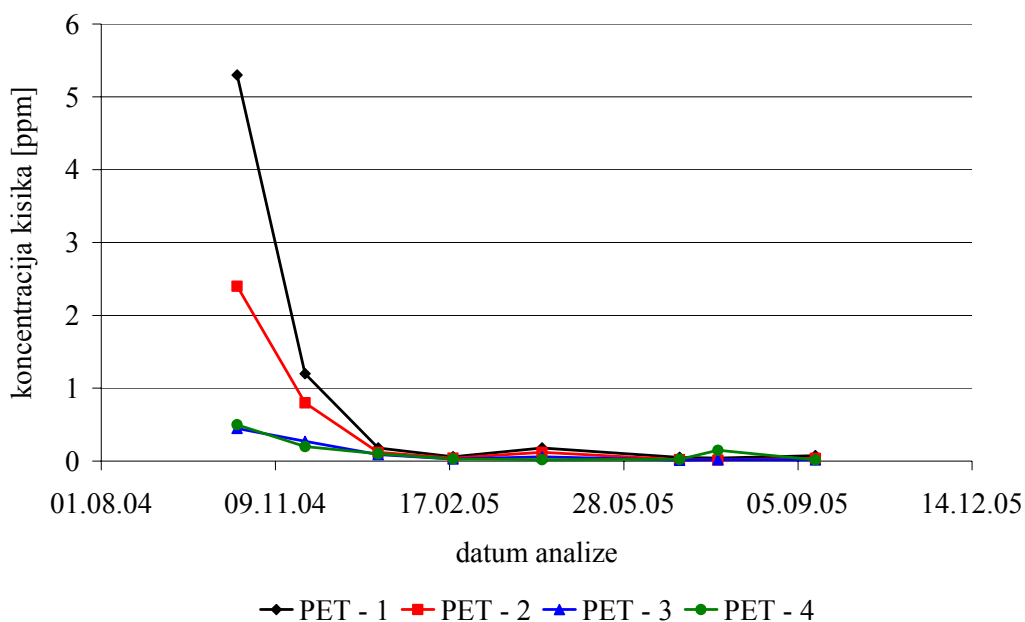
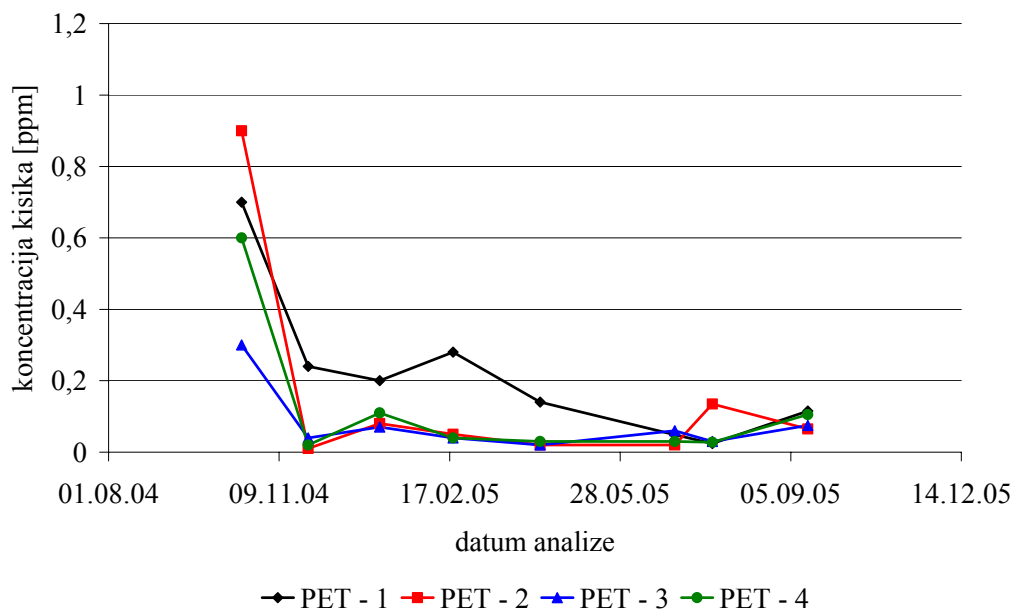
Priloga 19. Tabele parametrov CIE 1976 barvnega prostora (L, a, b, ΔE) in njihovo spreminjanje s skladiščenjem in vrsto embalaže za pomarančni sok

Datum vzorčenja	L parameter			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	36,5	36,5	36,5	36,5
18.10.2004	39,54	38,66	38,45	38,65
26.11.04	39,91	38,48	39,87	37,02
07.01.05	39,1	38,48	37,36	38,09
19.02.05	40,28	39,96	38,45	38,48
11.04.05	36,13	39,32	39,17	38,86
29.06.05	39,96	40,64	37,86	35,82
21.07.05	34,08	36,89	38,67	37,56

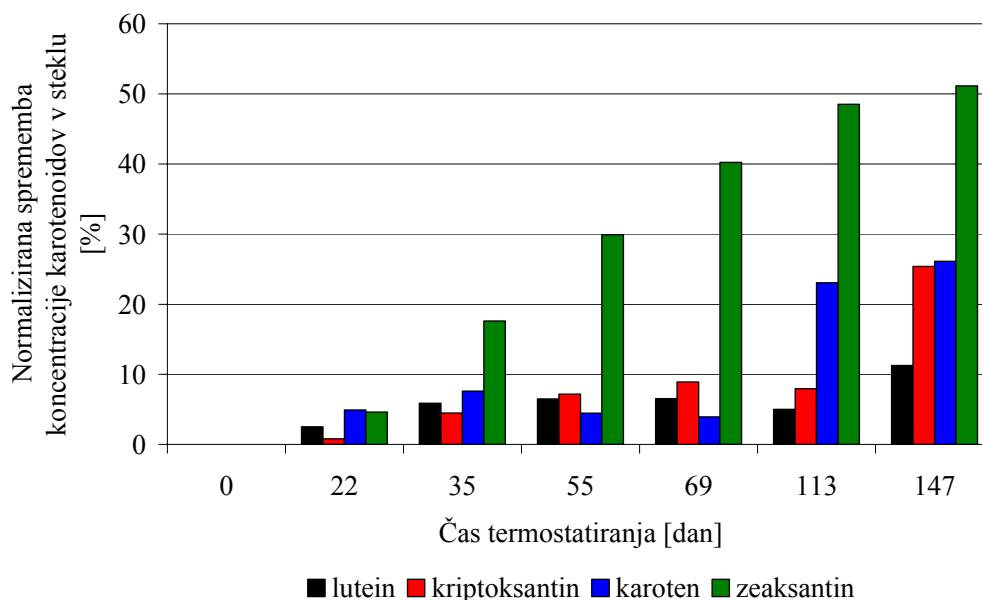
Datum vzorčenja	a parameter			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7
18.10.2004	-2,54	-2,66	-2,33	-2,85
26.11.04	-2,69	-2,72	-2,26	-2,48
07.01.05	-1,72	-1,87	-2,01	-2,04
19.02.05	-2,07	-2,22	-2,39	-2,18
11.04.05	-1	-2,11	-2,22	-2,24
29.06.05	-1,4	-2,09	-2,09	-2,32
21.07.05	1,18	2,07	0,6	0,65

Datum vzorčenja	b parameter			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	20,87	20,87	20,87	20,87
18.10.2004	23,71	23,12	20,76	23,79
26.11.04	23,07	23,18	21,44	22,42
07.01.05	20,62	20,26	21,14	21,35
19.02.05	22,06	22,15	21,82	20,99
11.04.05	18,91	21,11	21,92	20,96
29.06.05	22,06	21,6	21,6	21,82
21.07.05	18,86	20,56	21,58	19,7

Datum vzorčenja	ΔE parameter			
	PET - 1	PET - 2	PET - 3	PET - 4
10.09.04	0,00	0,00	0,00	0,00
18.10.2004	4,32	3,29	2,39	3,72
26.11.04	4,18	3,20	3,71	2,04
07.01.05	3,28	2,76	1,92	2,35
19.02.05	4,29	3,97	2,53	2,50
11.04.05	3,36	3,25	3,23	2,78
29.06.05	4,32	4,50	2,23	1,81
21.07.05	5,81	5,79	4,87	4,63

Priloga 20. Koncentracija kisika v pomarančnem soku v odvisnosti od časa skladiščenja in vrste embalaže**Priloga 21.** Koncentracija kisika v borovničevem nektarju v odvisnosti od časa skladiščenja in vrste embalaže

Priloga 22. Graf normaliziranih sprememb koncentracij posameznih karotenoidov v odvisnosti od trajanja termostatiranja za pomarančni sok, napolnjen v steklo



Priloga 23. Graf normaliziranih sprememb koncentracij posameznih karotenoidov v odvisnosti od trajanja termostatiranja za pomarančni sok, napolnjen v embalažo iz večslojnega kartona

