

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Karmen BAT

**KARAKTERIZACIJA SLOVENSКИH IN CIPRSКИH SADNIH SOKOV
Z RAZLIČNIMI METODAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF SLOVENIAN AND CYPRIOT FRUIT
JUICES WITH DIFFERENT METHODS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožefa Stefana v Podgorici.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob, za somentorico doc. dr. Nives Ogrinc in za recenzenta doc. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: doc. dr. Nives Ogrinc

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Karmen Bat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 543.061:663.81(043)=163.6
KG sadni sokovi/sadni nektarji/pomarančni sok/jabolčni sok/grenivkin sok/ananasov sok/jabolčni nektar/grenivkin nektar/vsebnost sladkorjev/potvorbe/avtentičnost sokov/izotopi/izotopska sestava ogljika/izotopska sestava kisika/pulpa/sladkorji/etanol/voda/HPLC/IRMS/SNIF-NMR
AV BAT, Karmen
SA GOLOB, Terezija (mentorica)/OGRINC, Nives (somentorica)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN KARAKTERIZACIJA SLOVENSКИH IN CIPRSКИH SADNIH SOKOV Z RAZLIČNIMI METODAMI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 88 str., 16 preg., 24 sl., 5 pril., 63 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen diplomske naloge je bil preveriti ustreznost metod za določanje pristnosti sadnih sokov/nektarjev. V raziskavo so bili vključeni vzorci pomarančnih, jabolčnih, grenivkinih in ananasovih sadnih sokov/nektarjev s slovenskega in ciprskega tržišča. Analitični del je obsegal: določanje vsebnosti sladkorjev s HPLC metodo, merjenje izotopske sestave kisika $\delta^{18}\text{O}$ v vodi, ogljika $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih, pulpi in etanolu z metodo IRMS – Isotope Ratio Mass spectrometry in določanje izotopskega razmerja med devterijem in vodikom (D/H) v etanolu z metodo SNIF-NMR – Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance. Z rezultati vsebnosti sladkorjev in primerjavo z rezultati v prehranskih tabelah smo pokazali, da so bile vsebnosti posameznih sladkorjev različne med analiziranimi vrstami sokov. Ugotovili smo, da se je izotopsko razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ povečalo glede na količino in vrsto dodanega sladkorja, izotopsko razmerje $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ pa zmanjšalo z večanjem količine dodane vode. Zveza med vrednostjo $\delta^{18}\text{O}$ in volumnom dodane vode je bila tesna. S primerjavo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in etanolu, ki smo jih določili z IRMS ter razmerja vodika (D/H)_I, določenega z SNIF-NMR, s podatki iz literature in izrisom trikotnika potvorb, smo pokazali utemeljeni sum na potvorbe nekaterih slovenskih in ciprskih komercialnih sokov. Vplive geografskega porekla na značilnosti izbranih sokov smo pokazali z meritvami $\delta^{18}\text{O}$ v vodi in (D/H)_{II} v etanolu. V ciprskih sokovih smo izmerili bistveno višje vrednosti $\delta^{18}\text{O}$, kar je posledica toplejših klimatskih razmer.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 543.061:663.81(043)=163.6
CX fruit juices/fruit nectars/orange juice/apple juice/grapefruit juice/pineapple juice/apple nectar/grapefruit nectar/adulteration/authenticity/juice isotopes/isotopic composition of carbon/pulp/sugar/ethanol/isotopic composition of oxygen /water/HPLC/IRMS/SNIF-NMR
AU BAT, Karmen
AA GOLOB, Terezija (supervisor)/OGRINC, Nives (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2008
TI CHARACTERIZATION OF SLOVENIAN AND CYPRIOT FRUIT JUICES WITH DIFFERENT METHODS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 88 p., 16 tab., 24 fig., 5 ann., 63 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of our work was to verify the suitability of methods used to determine authenticity of fruit juices/nectars. The research included samples of orange, apple, grapefruit and pineapple fruit juices/nectars from Slovenia and Cyprus. The analytic section determines: the content of sugars using HPLC method, the isotopic composition of oxygen $\delta^{18}\text{O}$ in the water and of carbon $\delta^{13}\text{C}$ in sugars, pulp, and ethanol using IRMS – Isotope Ratio Mass spectrometry, and the isotopic ratio between deuterium and hydrogen (D/H) in ethanol using the SNIF-NMR method – Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance. The contents of sugars and the comparison with the results in food composition and nutrition tables showed that various sugar contents differed among the analysed sorts of juices. It was established, that the isotopic ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ increases depending on the quantity and type of the added sugar, while the isotopic relationship $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ decreases as the quantity of added water grew. There is strong connection between the $\delta^{18}\text{O}$ value and the volume of the added water. The measurements of $\delta^{13}\text{C}$ in the pulp, sugars and ethanol, obtained using the IRMS method, and the (D/H)_I hydrogen ratio, determined by SNIF-NMR, compared with the data from the literature, as well as the adulteration triangle show that the suspicions of adulterations of some juices on Slovenian and Cypriot markets were well founded. The effects of geographic origin on the properties of the selected juices was shown with the measurements of $\delta^{18}\text{O}$ in the water and of (D/H)_{II} in the ethanol. Cypriot juices resulted to contain significantly higher levels of $\delta^{18}\text{O}$, which is a consequence of warmer climatic conditions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POMEN IN SESTAVA SADJA	3
2.2 NASTANEK SLADKORJEV V PLODOVIH	4
2.2.1 C ₃ ali Calvinov cikel	4
2.2.2 C ₄ ali Hatch-Slackov cikel	5
2.2.3 CAM cikel	7
2.2.4 Nadaljnja pot produktov Calvinovega cikla	8
2.3 PROIZVODI IZ SADJA	9
2.3.1 Sokovi in koncentracije	9
2.3.1.1 Bistri sokovi	10
2.3.1.2 Kašasti sokovi	11
2.3.1.3 Motni sokovi	12
2.3.1.4 Zgoščeni ali koncentrirani sokovi	12
2.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI SLADKORJEV V SOKOVIH IN NEKTARJIH Z METODO HPLC	13
2.4.1 Vsebnost sladkorjev v posameznih vrstah sokov	17
2.5 ZAHTEVE SLOVENSKEGA PRAVILNIKA O KAKOVOSTI SADNIH SOKOV IN PODOBNIH SADNIH IZDELKOV	17
2.5.1 Sadni sok	17
2.5.2 Zgoščeni sadni sok	18
2.5.3 Sadni nektar	18
2.6 POTVORBE SOKOV	19
2.6.1 Stabilni izotopi, njihova porazdelitev v naravi in možnosti frakcionacije	20
2.6.2 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ¹² C, ¹³ C, ¹⁶ O in ¹⁸ O	24
2.6.2.1 Izotopska frakcionacija ¹⁶ O in ¹⁸ O	24
2.6.2.2 Izotopska frakcionacija ¹³ C in ¹² C	26
2.6.3 Princip določanja izotopskega razmerja z metodo IRMS	26

2.6.4 Princip določanja izotopskega razmerja (D/H)_I in (D/H)_{II} z metodo SNIF-NMR.....	28
2.6.4.1 Alkoholna fermentacija in povezava med vrednostmi izotopskega razmerja D/H glukoze, vode in etanol.....	29
2.6.5 Kombinacija IRMS in SNIF-NMR metod	31
 3 MATERIALI IN METODE DELA	 34
3.1 VZOREC.....	34
3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE METODE	36
3.2.1 Priprava in analiza poskusa z dodajanjem sladkorja in vode jabolčnemu soku.....	36
3.2.1.1 Priprava vzorcev jabolčnega soka z dodanim sladkorjem.....	36
3.2.1.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v soku z IRMS.....	37
3.2.1.3 Priprava vzorcev z dodano vodo	38
3.2.1.4 Določanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti vode v jabolčnem soku z metodo IRMS.....	39
3.2.2 Analiza slovenskih in ciprskih sadnih sokov in nektarjev.....	39
3.2.2.1 Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze z metodo HPLC	40
3.2.2.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v komercialnih sokovih in nektarjih z metodo IRMS.....	43
3.2.2.3 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi komercialnih sokov in nektarjev z metodo IRMS.....	43
3.2.2.4 Določanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi komercialnih sokov in nektarjev z metodo IRMS.....	44
3.2.2.5 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v etanolu z metodo IRMS	44
3.2.2.6 Določanje izotopskega razmerja vodika (D/H) v etanolu z metodo SNIF-NMR ..	46
3.2.3 Analiza sveže iztisnjenih vzorcev citrusov	46
3.3 ANALIZA POVEZANOSTI DVEH SPREMENLJIVK	46
3.4 GRAFIČNI PRIKAZ – OKVIR Z ROČAJI	48
3.5 TRIKOTNIK POTVORB	48
 4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	 50
4.1 REZULTATI POSKUSA DODAJANJA RAZLIČNIH VRST SLADKORJA IN VODE RAZLIČNEGA GEOGRAFSKEGA IZVORA V 100 % JABOLČNEM SOKU....	50
4.1.1 Spreminjanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorju vzorcev pripravljenih z dodajanjem različnih količin dveh vrst sladkorjev oziroma njihove mešanice 100 % jabolčnemu soku.....	50
4.1.2 Spreminjanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi vzorcev, pripravljenih z dodajanjem različnih volumnov vode z različnim geografskim poreklom v 100 % jabolčnemu soku	54
4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SLADKORJEV Z METODO HPLC	58

4.2.1 Zveza med vsebnostjo sladkorjev in sladkorno stopnjo	61
4.3 REZULTATI MERJENJA $\delta^{13}\text{C}$ PULPE, SLADKORJA, ETANOLA IN $\delta^{18}\text{O}$ VODE Z METODO IRMS TER $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ IN $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ V ETANOLU Z METODO SNIF-NMR V KOMERCIALNIH SOKOVIH IZ SLOVENIJE IN CIPRA	62
4.3.1 Rezultati določanja avtentičnosti oziroma potvorb sadnih sokov s sladkorji ..	62
4.3.1.1 Trikotnik potvorb za pomarančne in grenivkine sokove	68
4.3.2 Rezultati določanja potvorb z vodo in geografskega porekla sadnih sokov	70
 5 SKLEPI	 72
 6 POVZETEK.....	 74
 7 VIRI	 77
 ZAHVALA	 82
PRILOGE	83

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost sladkorjev v posameznih vrstah sokov – povzeto po prehranskih tabelah (Souci in sod., 2008; Souci in sod., 2000)	17
Preglednica 2: Najmanjša vsebnost sadnega deleža v nektarju (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001)	18
Preglednica 3: Stabilni izotopi elementov, ki se pogosto uporabljajo za določanje avtentičnosti in njihova razširjenost (Ghidini in sod., 2006; Kuščer in Moljk, 1960)	20
Preglednica 4: Spremembe vrednosti $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ in R glede na naravo sladkorja, iz katerega je nastal etanol (Košir, 2001)	32
Preglednica 5: Vrsta, tip in izvor soka oz. nektarja in oznake analiziranih komercialnih vzorcev	35
Preglednica 6: Oznaka vzorcev, volumen soka in količina dodanega sladkorja ali njune mešanice v 100 % jabolčni sok	36
Preglednica 7: Oznaka vzorcev, volumen soka in količina dodane vode iz posameznega območja Slovenije v 100 % jabolčni sok	38
Preglednica 8: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996)	47
Preglednica 9: Izmerjene in izračunane $\delta^{13}C$ vrednosti v vzorcih 100 % jabolčnega soka, kateremu so bile dodane različne vrste in mase sladkorjev	51
Preglednica 10: Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti r^2 in r za posamezne vrste sladkorjev, ki smo jih dodajali 100 % soku	53
Preglednica 11: Izmerjene $\delta^{18}O$ vrednosti v vzorcih z dodanimi različnim volumnom vode z različnim geografskim poreklom v 100 % jabolčni sok	55
Preglednica 12: Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti r^2 in r za posamezne izvore vod, ki smo jih dodajali 100 % soku	56
Preglednica 13: Sladkorna stopnja in vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v izbranih sadnih sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra	58
Preglednica 14: Rezultati merjenja $\delta^{13}C$ vrednosti pulpe, sladkorja in etanola v izbranih komercialnih sokovih in nektarjih z metodo IRMS	62
Preglednica 15: Izmerjene vrednosti $(D/H)_I$ in $\delta^{13}C$ v etanolu, pridobljenim iz sladkorjev sveže iztisnjenih sokov	68
Preglednica 16: Izmerjene vrednosti $\delta^{18}O$ v vodi in $(D/H)_{II}$ v etanolu izbranih komercialnih sokovih iz Slovenije in s Cipra	70

KAZALO SLIK

Slika 1: C ₃ ali Calvinov cikel (Uno in sod., 2001)	5
Slika 2: C ₄ ali Hatch – Slackov cikel (Hall in Rao, 1999).....	6
Slika 3: CAM cikel (Uno in sod., 2001).....	7
Slika 4: Nadaljnja pot produktov Calvinovega cikla (Uno in sod., 2001).....	8
Slika 6: Shema najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo (Žorž, 1991).....	15
Slika 7: Možnosti izotopske frakcionacije od molekul atmosfere (izvor CO ₂) do oceana (izvor H ₂ O) do fermentacije soka (Martin, 1990)	23
Slika 8: Klimatski in geografski vplivi na izotopsko frakcionacijo kisika (Calderone in Guillou, 2008; Dennis, 2005)	24
Slika 9: Princip delovanja sistema IRMS (Calderone in Guillou, 2008)	28
Slika 5: Reakcija alkoholne fermentacije (Boyer, 2005).....	30
Slika 10: Izotopski prenosi med glukozo in vodo iz soka ter njunima fermentacijskima produktoma etanolom in vodo (Košir, 2001)	30
Slika 11: Trikotnik potvorb (Jamin in sod., 2004; Martin in sod., 1996a).....	49
Slika 12: Odvisnost $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti od dodanega sladkorja v 100 % jabolčni sok.....	52
Slika 13: Zveza med maso dodanega sladkorja in izotopsko sestavo ogljika $\delta^{13}\text{C}$	53
Slika 14: Odvisnost vsebnosti $\delta^{18}\text{O}$ od dodane vode 100 % jabolčnemu soku	55
Slika 15: Zveza med volumnom dodane vode in izotopsko sestavo kisika $\delta^{18}\text{O}$	56
Slika 16: Prikaz sladkorne stopnje ter vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v sadnih sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra.....	59
Slika 17: Vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra	60
Slika 18: Zveza med vsebnostjo glukoze, fruktoze in saharoze ter sladkorno stopnjo v izbranih komercialnih sokovih iz Slovenije in s Cipra.....	61
Slika 19: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za ananasove sokove.....	64
Slika 20: Zveza med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorju in etanolu izbranih komercialnih sokov.....	66
Slika 21: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za pomarančne sokove	67
Slika 22: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za sokove in nektar iz grenivke	67
Slika 23: Trikotnik potvorb za pomarančne in grenivkine sokove.....	69
Slika 24: Vpliv geografskega porekla na vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ v vodi in (D/H) _{II} v etanolu	71

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Kromatogram standardi	83
Priloga A2: Kromatogram vzorca z oznako Pss8	84
Priloga A3: Kromatogram vzorca z oznako Jss5	85
Priloga B1: Zbrani rezultati meritev opravljenih z metodo HPLC v izbranih komercialnih slovenskih in ciprskih sadnih sokovih	86
Priloga B2: Zbrani rezultati meritev opravljenih z metodama IRMS in SNIF-NMR v izbranih komercialnih slovenskih in ciprskih sadnih sokovih	87

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIJN - Association of the Industry of Juices and Nectars

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

Asc - ananasov sok Ciper

(D/H)_i - absolutno izotopsko razmerje devterij/vodik (v ppm) na specifičnem mestu i v molekuli pri SNIF-NMR

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

$\delta^{18}\text{O}$ - izotopska sestava kisika izražena v ‰

C₃ - rastline skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C₃ ali Calvinov cikel

C₄ - rastline skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C₄ ali Hatch-Slackov cikel

CAM - rastline skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja CAM (ang. (Crassulacean acid metabolism) cikel

CEN - Committee of European Normalization

Gnc - grenivkin nektar Ciper

Gsc - grenivkin sok Ciper

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

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

Jns - jabolčni nektar Slovenija

Jsc - jabolčni sok Ciper

Jss - jabolčni sok Slovenija

Psc - pomarančni sok Ciper

Pss - pomarančni sok Slovenija

r - koeficient korelacije

r^2 - koeficient determinacije

SNIF-NMR - mestno specifična naravna izotopska frakcionacija določena z jedrsko magnetno resonanco (angl. Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance)

1 UVOD

Sadni sok je izdelek pridobljen iz ene ali več vrst zdravih in zrelih sadežev ali iz zgoščenega sadnega soka z dodatkom enake količine vode, kot je bila soku odvzeta med postopkom zgoščevanja. Razen hruškovemu in grozdnemu soku je dovoljeno dodajati sadnim sokovom tudi sladkorje, kar pa mora biti na embalaži označeno z besedami »sladkan« ali »z dodatkom sladkorja« in s podatkom največje količine dodanega sladkorja.

Če sadnemu soku ali sadni kaši dodamo vodo in sladkor, dobimo sadni nektar. Nektarje iz nekaterih vrst sadja (na primer iz marelic) lahko izdelujejo tudi brez dodatka sladkorja. Dodajo mu lahko vitamine in mineralne snovi. Če pa na deklaraciji izdelka piše, da je brez dodanega sladkorja, oziroma z nizko energijsko vrednostjo, so mu lahko dodana sladila, ki deloma ali v celoti nadomeščajo sladkor. Koliko sadnega soka ali sadne kaše mora nektar vsebovati, je odvisno od vrste sadja, iz katerega je izdelan.

Lastnosti sadnega soka, ki je pridobljen s stiskanjem svežega sadja, so odraz področja, iz katerega sadje izhaja. Zato smo želeli poiskati razlike med vsebnostjo sladkorjev ter $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{18}\text{O}$ vrednostmi v izbranih sokovih iz Slovenije in s Cipra.

Potrebe na trgu narekujejo količine proizvedenih posameznih vrst sokov. Z naraščanjem proizvodnje sadnih sokov se povečuje tudi pogostost potvorb, ki so posledica predvsem ekonomskega interesa. V proizvodnji sokov so najpogostejše potvorbe z različnimi sladkorji in vodo. Dodani sladkor je s kemijskega stališča identičen tistemu v naravnem produktu, prav tako ima enako hranilno in fiziološko vrednost, kar še dodatno otežuje dokazovanje nelegalnih dodatkov. Naloga kontrole pristnosti v tem primeru ni določitev posameznih substanc v vzorcih, temveč določitev njihovega izvora. Prav določanju izvora sladkorja in vode ter sočasno potvorb je posvečen tudi velik del te diplomske naloge, ki je bila del bilateralnega projekta med Slovenijo in Ciprom.

1.1 NAMEN DELA

Glavni namen diplomske naloge je bil s pomočjo metod HPLC, IRMS in SNIF-NMR ugotoviti ali izbrani sokovi, ki so dostopni na slovenskem in ciprskem trgu, ustrezajo deklaraciji označeni na embalaži.

Poiskali smo razlike v vsebnosti sladkorjev ter $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{18}\text{O}$ vrednostmi v izbranih sadnih sokovih iz Slovenije in s Cipra in sestavili bazo podatkov pristnih sadnih sokov. Pri tem smo večjo pozornost posvetili jabolčnim sokom, ki so najbolj pogosti na slovenskem tržišču in pomarančnim sokom, ki so najbolj zastopani na ciprskem tržišču

Z izvedenim poskusom smo določili vpliv dodanega pesnega, trsnega sladkorja ali njune mešanice na izotopsko sestavo ogljika v sladkorjih, z uporabo stabilnih izotopov kisika pa določili vpliv redčenja z vodo na izotopsko sestavo kisika v sokovih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom raziskave smo postavili naslednje hipoteze:

- z metodo HPLC lahko uspešno brez dolgotrajne predhodne priprave vzorcev določimo vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze,
- metoda IRMS omogoča določanje potvorb sokov s trsnim sladkorjem ali mešanico, ki ta sladkor vsebuje, ne omogoča pa določanja potvorb s pesnim sladkorjem,
- kombinacija SNIF-NMR in IRMS omogoča določanje pristnosti sadnih sokov oziroma potvorb s pesnim in trsnim sladkorjem,
- z določanjem $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti z metodo IRMS lahko sklepamo na geografsko poreklo sokov ter potvorjenost sokov z vodo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POMEN IN SESTAVA SADJA

Polnovredna hrana je za človeka izrednega pomena, saj z njo pridobiva telo potrebno energijo, vitamine in mineralne snovi. Kerin (1988) svetuje, da porabo sadja v različnih oblikah razporedimo tako, da ga dnevno zaužijemo od 300 do 400 g. S tem dosežemo letno porabo 100 kg sadja na osebo. Zaužijemo ga najpogosteje kot sveže sadje in sadne sokove, redkeje zamrznjeno, v marmeladah, džemih, mezgah, želeju, kompotih, likerjih, vse pogosteje pa tudi kot sušeno sadje in razne sadne jedi.

Sadje in sadne sokove v vsakodnevni prehrani uživamo zaradi prijetnega osvežujočega okusa in lahke prebavljivosti v vseh starostnih obdobjih, z njihovo redno uporabo pa lahko preprečimo tudi številne bolezni modernega časa. Uživanje sadja in sadnih sokov prispeva k kislinobazičnemu ravnotežju v organizmu, saj imajo ostanki hrane rastlinskega izvora bazični učinek, ostanki hrane živalskega izvora pa kisli ostanek (Suwa Stanojevič, 1995).

Po izvoru delimo sadje na kontinentalno, južno in tropsko ali eksotično sadje. Kontinentalno sadje pa glede na obliko in zgradbo plodov delimo na:

- koščičasto: slive, češnje, breskve, marelice,
- pečkato: jabolka, hruške, kutine, kaki, nešplje,
- jagodičevje: grozdje, jagode, črni in rdeči ribez, maline, borovnice, brusnice, kosmulje, šipek, josta,
- lupinasto: orehi, lešniki, mandlji, kostanj, arašidi.

Južno sadje raste v toplejšem podnebju in ga delimo na:

- agrume ali citruse: pomaranče, mandarine, limone in grenivke,
- drugo južno sadje: fige, kivi, datlji, rožiči, aktinidija, granatno jabolko.

V skupino tropskega ali eksotičnega sadja pa spadajo: ananas, banana, mango, pasijonka, marakuja, papaja in drugi (Kodele, 1989; Suwa Stanojevič, 1995).

Sadje ima zelo zapleteno in raznovrstno kemično sestavo. Gvozdenović (1989) v grobem razvrsti kemične snovi v sadju na organske in anorganske. Skupino anorganskih snovi predstavljajo voda, plini (CO_2 , O_2 in N_2) in mineralne snovi. V skupino organskih snovi pa spadajo ogljikovi hidrati, pektinske snovi, organske kisline, aminokisline, proteini, lipidi, aromatične snovi, etilen, rastlinski pigmenti (klorofil, karotenoidi, antociani), vitamini, hormoni. Količina posameznih hranilnih snovi v sadju je odvisna od vrste in kultivarja (sorte) sadja, sestave tal, ekoloških pogojev, rasti sadja, načina vzgoje ter agrotehničnih ukrepov (gnojenje, obrezovanje, redčenje plodov) (Suwa Stanojevič, 1995).

V skupini anorganskih snovi plodu je najpomembnejša snov voda. Vode je v sadju najpogosteje od 75 do 90 % (jagode 85 – 90 %, breskev okoli 86 %, jabolko 84 – 86 %), le pri nekaterih vrstah (oreh, lešnik, mandelj) znaša do 12 %. Količina vode v plodovih je odvisna od tega, koliko vode pride v plodove pred obiranjem, in lahko niha tudi čez dan, če

je temperaturno nihanje večje in če so druge razmere neugodne. Da je pridelek čim večji, se plodovi obirajo tedaj, ko je v njih največ vode (Gvozdenović, 1989).

Ogljikovi hidrati so proizvod asimilacije ali fotosinteze rastlin ter nastajajo iz CO₂ in vode, ob prisotnosti klorofila in sončne svetlobe. Nahajajo se v obliki enostavnih sladkorjev, škroba, celuloze in hemiceluloze. Glavna monosaharida, ki ju vsebuje sadje, sta fruktoza in glukoza ter disaharid saharoza. Fruktoze je v sadju največ, saharoze pa je precej manj od fruktoze in glukoze. Skupna količina teh treh sladkorjev se v svežih plodovih giblje od 2 do 65 % sveže mase. Drugi sladkorji kot so maltoza, arabinoza, rafinoza in ksiloza, običajno nastanejo kot produkti razpadanja drugih snovi ter hitro izginejo. Zeleni plodovi vsebujejo po večini škrob, zreli pa fruktozo, glukozo in saharozo (Gvozdenović, 1989; Suwa Stanojevič, 1995).

2.2 NASTANEK SLADKORJEV V PLODOVIH

V naravi poznamo tri fotosintezne cikle, ki potekajo v zelenih rastlinah in sodelujejo pri sintezi sladkorjev. Na splošno lahko trdimo, da vse rastline vežejo CO₂ in H₂O v organsko snov na enak način, razlika je le v začetni fazi prevzema CO₂ iz zraka.

2.2.1 C₃ ali Calvinov cikel

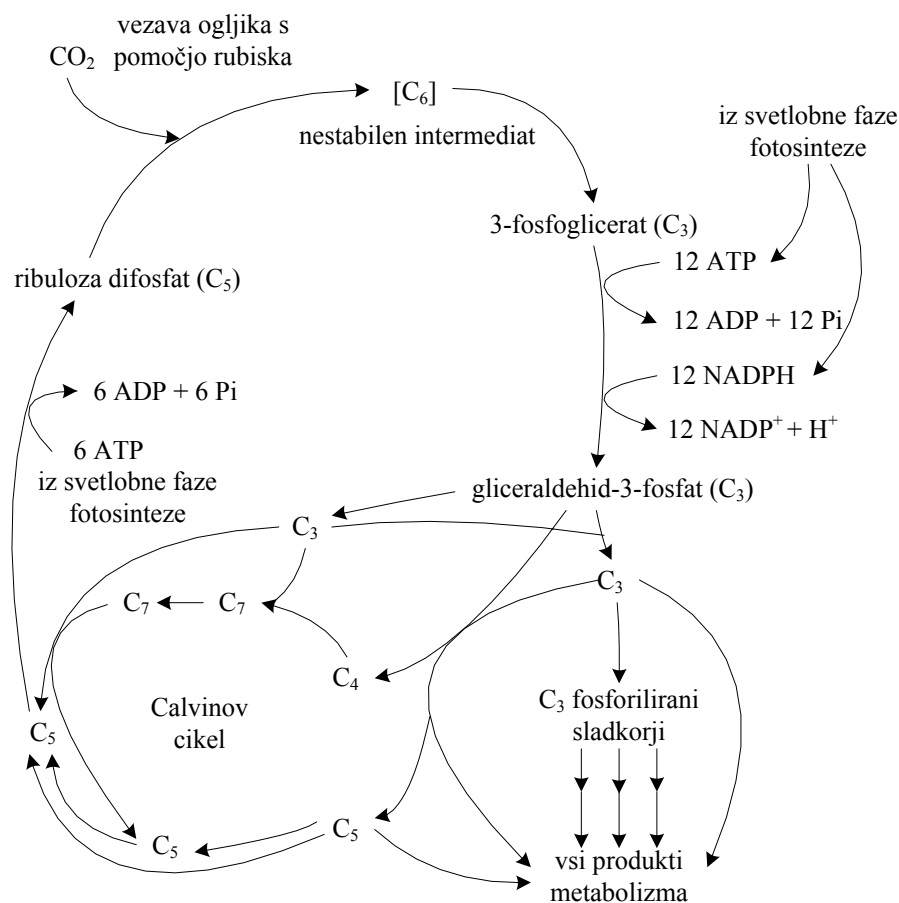
Pri Calvinovem ali C₃ ciklu se CO₂ takoj po vstopu v kloroplast veže na akceptor, to je na molekulo ribuloze-1,5-difosfata. Reakcijo katalizira encim ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza/oksigenaza, bolj poznan kot rubisko, ki ga najdemo v stromi kloroplastov in za katerega Boyer (2005) trdi, da predstavlja 15 % mase vseh proteinov v kloroplastu, Larcher (2001) pa pove, da predstavlja 50 % topnih proteinov v kloroplastu. Ribuloza-1,5-difosfat nato razpade na dve molekuli 3-fosfoglicerata, intermediata s tremi C atomi (od tu ime C₃ cikel). 3-fosfoglicerat se nato v nekaj korakih reducira do gliceraldehid-3-fosfata, Pri teh reakcijah se porabljajo molekule ATP in NADPH iz svetlobne faze fotosinteze (Boyer, 2005; Larcher, 2001; Uno in sod. 2001).

Da nadomestimo šest ogljikovih atomov, ki so se porabili za sintezo ene molekule glukoze, se mora celoten Calvinov cikel šestkrat ponoviti, pri čemer vanj vsakokrat vstopi ena molekula CO₂. Le dve od dvanajstih molekul gliceraldehid-3-fosfata zapustita ciklus in se porabita za sintezo nove molekule glukoze, preostalih deset molekul pa se v seriji reakcij porabi za regeneracijo šestih molekul ribuloza-1,5-difosfata (Boyer, 2005).

Iz gliceraldehid-3-fosfata ali njegovega izomera dihidroksiacetonfosfata se sintetizirajo ogljikovi hidrati. Med tistimi, ki se sintetizirajo v rastlinah, so najpomembnejši: monosaharida glukoza in fruktoza, disaharid saharoza, škrob, ki je rezervni polisaharid, ter celuloza, ki je strukturni polisaharid. Glukoza in fruktoza nastaneta kot glukoza-1-fosfat in

fruktoza-1-fosfat, čeprav ju pogosto imenujejo kar glukoza in fruktoza. Fosforilirani monosaharidi se porabljajo za sintezo saharoze ali škroba (Boyer, 2005).

Rastline, ki v procesu sinteze sladkorjev uporabljajo samo C_3 cikel, uspevajo predvsem v zmernih podnebnih pasovih, nekatere pa tudi v toplejših krajih. Mednje spadajo jablana, breskev, vse vrste agrumov, sladkorna pesa in številni drugi.



Slika 1: C_3 ali Calvinov cikel (Uno in sod., 2001)

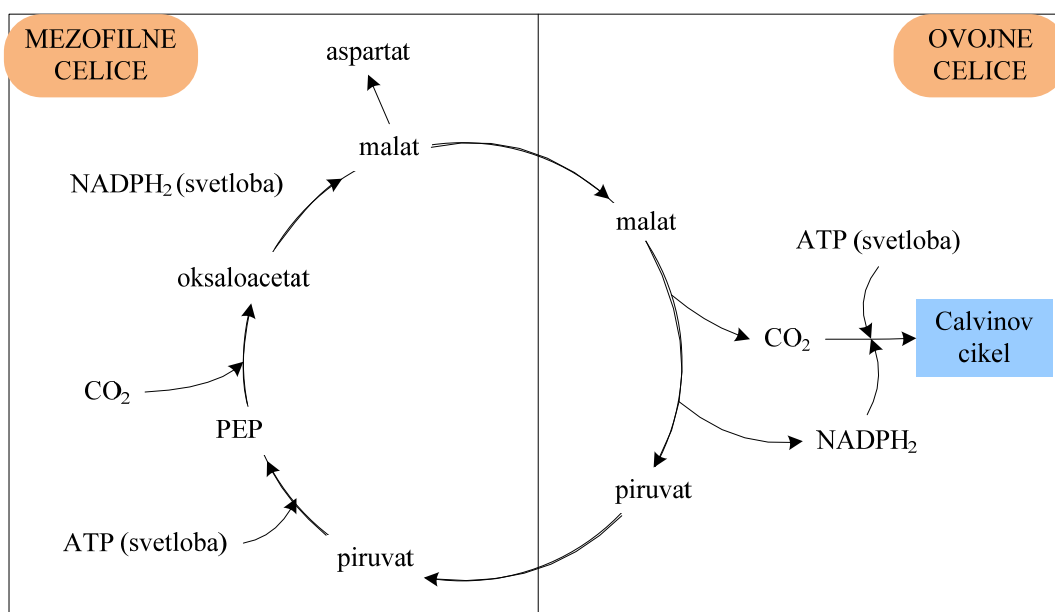
2.2.2 C_4 ali Hatch-Slackov cikel

C_4 ali Hatch-Slackov cikel je posebna oblika fotosinteze, ki poteka v listih predvsem tropskih trav, kot sta sladkorni trs in koruza, značilna pa je še za družino amarantovk, mlečkovk in tolščakovk. Gre izključno za rastline, ki spadajo v družino kritosemenk. Pojavlja se v 17 družinah, ki pa nimajo vseh rodov ali vrst s fotosintezo C_4 in nimajo prednikov s tako fotosintezo. Iz tega sklepajo, da se je fotosinteza C_4 razvila 10 do 15 milijonov let nazaj v različnih razvojnih linijah, če so bile za njen razvoj ustrezne razmere (Dermastia, 2007; Taiz in Zeiger, 2006).

Ime je dobil, ker prvi stabilni presnovni produkt ni fosfoglicerinska kislina s 3 atomi ogljika, temveč oksaloacetna kislina s 4 atomi ogljika. Pri rastlinah s takimi prilagoditvami so listne žile obdane z debelostenimi fotosintetskimi ovojnicami, v katerih je posebna vrsta kloroplastov. Celicam ovojnice sledita ena ali dve plasti zelenih tankostenih mezofilnih celic. Celice ovojnice in mezofilne celice so povezane s številnimi plazmodezmami (Dermastia, 2007).

CO₂ pronica v list skozi reže in se veže v mezofilnih celicah, v katerih ni rubiska. Poveže se z fosfoenolpiruvično kislino (PEP) v oksaloacetno kislino. Oksaloacetna kislina se nato pretvori v malat ali aspartat, ki se skozi plazmodezme premakneta v celice ovoja. V ovojnih celicah se malat dekarboksilira, pri čemer nastane piruvat in CO₂. Sproščeni CO₂ se potem vključi v Calvinov cikel, v katerem lahko nastanejo različni sladkorji in škrob, piruvat pa se vrne v mezofilne celice in se uporabi za regeneracijo PEP. Malat pa se lahko vključi v Krebsov cikel ali pa v procesu aminacije nastane aspartat, ki predstavlja izhodno molekulo za tvorbo aminokislin (Dermastia, 2007; Hall in Rao, 1999).

Rastline, ki so anatomijo svojih listov razvile za potek take fotosinteze, imajo veliko selekcijsko prednost, ki je izrednega pomena predvsem v suhem in vročem podnebju. S tem načinom prenosa CO₂ iz zraka v rastlino je namreč omogočeno koncentriranje CO₂ iz zraka pred vstopom v C₃ cikel, kar je izrednega pomena v vročih in suhih dneh, ko so reže zaprte in česar rastline, ki uporabljajo samo C₃ cikel, ne zmorejo (Košir, 2001; Uno in sod., 2001).



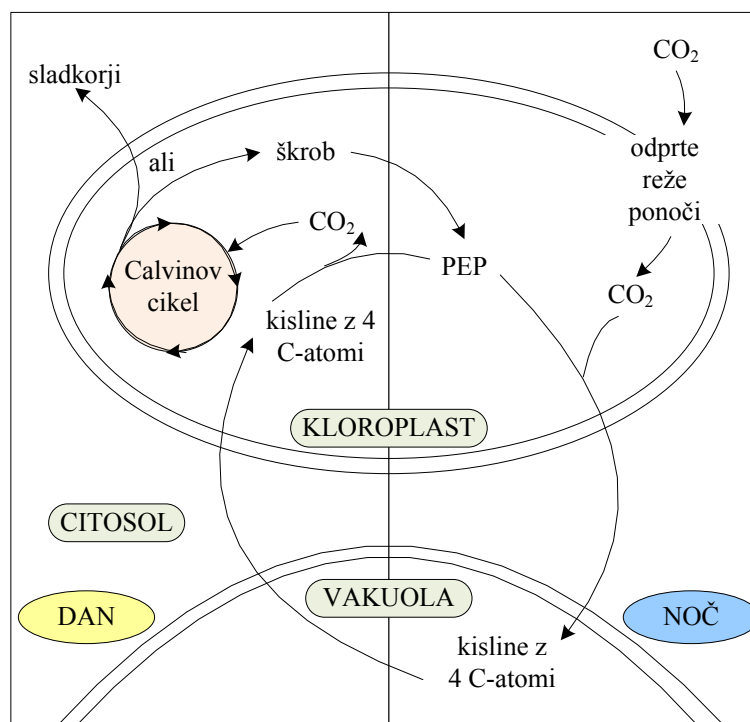
Slika 2: C₄ ali Hatch – Slackov cikel (Hall in Rao, 1999)

2.2.3 CAM cikel

Kot že samo ime CAM (Crassulacean acid metabolism) pove, je bil ta redek način fotosinteze širše preučevan na družini *Crassulaceae*, ki vključuje predvsem sekulente. Poleg teh imajo tak način fotosinteze še kaktusi, orhideje, ananas in druge (Uno in sod., 2001).

Razmerje med izgubo vode in vnosom CO_2 je v rastlinah s CAM ciklom bistveno nižje kot v C_3 in C_4 rastlinah in sicer zato, ker imajo reže odprte samo ponoči, ko so temperature nižje, vlažnost pa višja. Vse to pa prispeva k nižjemu izhlapevanju vode (Taiz in Zeiger, 2006).

Za te rastline je značilno, da uporabljajo C_3 in različico C_4 cikla, ki jim omogoča, da časovno ločijo pridobivanje in koncentriranje CO_2 iz zraka ter njegovo nadaljnjo porabo v C_3 ciklu. CO_2 torej ponoči vstopa v liste, kjer se v vakuolah poveže z PEP, pri čemer nastane oksalocetna kislina. Le ta se potem reducira in nastane jabolčna kislina, ki se akumulira v vakuolah listnih celic. Podnevi, ko se reže zaprejo, se malat transportira najprej v citosol, nato pa v kloroplaste, kjer se dekarboksilira in nastane piruvat in CO_2 . Sproščeni CO_2 vstopi v Calvinov cikel, pri čemer lahko nastanejo različni ogljikovi hidrati. Zaradi razpada jabolčne kisline pride do povišanja celičnega pH, hkrati pa pade intracelularna koncentracija CO_2 , zato se reže pričnejo zopet odpirati in CO_2 ponovno vstopi v vakuole, kjer se veže z PEP (Hall in Rao, 1999; Košir, 2001; Larcher, 2001).



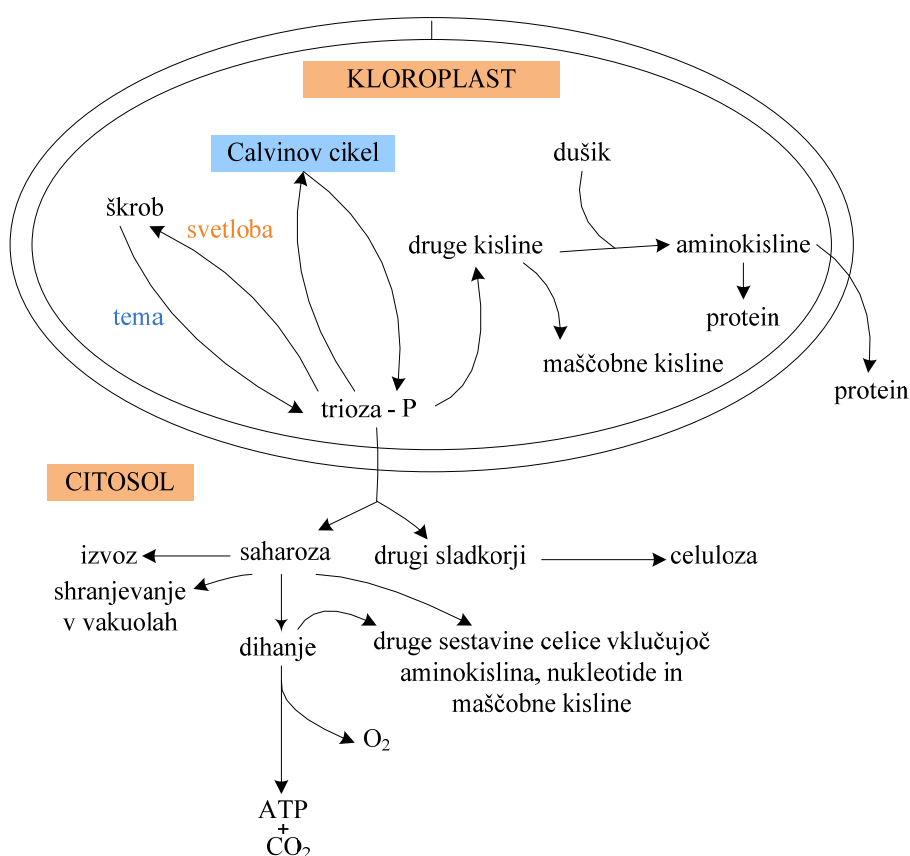
Slika 3: CAM cikel (Uno in sod., 2001)

2.2.4 Nadaljnja pot produktov Calvinovega cikla

Produkti Calvinovega cikla se lahko vključijo v različne nadaljnje reakcije:

- Trioza fosfat se pogosto kopiči kot zaloga v obliki škroba. Manjše količine le tega se lahko začasno shranjujejo v kloroplastih, večina pa se ga skladišči v koreninah in deblu. Ko rastlina potrebuje enostavne sladkorje za izgradnjo drugih substanc, se škrob razgradi.
- Manjša količina trioze fosfata se porabi za sintezo aminokislin v kloroplastu.
- Veliko trioze fosfate se transportira iz kloroplastov v citosol, kjer se porabi za nastanek saharoze in drugih sladkorjev. Saharoza se lahko potem shranjuje v vakuolah, pogosteje pa se premesti v rastoče dele rastline kot so sadeži, novi listi in korenine. Tukaj se lahko metabolizira, pri čemer nastaja energija, lahko se shranjuje v vakuolah ali se pretvori v škrob.
- Rastline lahko produkte Calvinovega cikla uporabijo tudi za sintezo sekundarnih metabolitov (Uno in sod., 2001).

Uno in sodelavci (2001) navajajo, da fotosinteza izkoristi okrog 10 % ogljika v atmosferi. Ljudje pa direktno ali indirektno uporabimo okrog 40 % neto produktov fotosinteze. Noben biološki proces se s fotosintezo ne more primerjati, saj vzdržuje praktično celotno življenje na zemlji. Brez fotosinteze so vse biološke reakcije nepomembne.



Slika 4: Nadaljnja pot produktov Calvinovega cikla (Uno in sod., 2001)

2.3 PROIZVODI IZ SADJA

Iz sadja lahko z različnimi postopki predelave pripravimo številne proizvode ali polproizvode, kot so sadni sokovi, zamrznjeno sadje, suho sadje, marmelada, džem, žele in kandirano sadje. Sadni sokovi in zamrznjeno sadje sta izdelka, ki so enakovredni svežemu sadju predvsem po količini vitaminov in mineralov. Manj hranilnih snovi se ohrani v suhem sadju. Sadni izdelki, kot so marmelada, džem, kandirano sadje, sadni žele in drugi pa so konzervirani s sladkorjem in so le energijsko živilo z malo mineralov in skoraj nič vitamini (Kodele, 1989).

2.3.1 Sokovi in koncentrati

Sadni sokovi in njim sorodni proizvodi so torej ena od najznačilnejših skupin sadnih izdelkov s prehrabnega in gospodarskega pogleda. Glede na fizikalne lastnosti in glede na uporabljeno tehnologijo predelave Lovrić in Piližota (1994) razvrščajo v naslednje skupine: bistri sokovi, motni ali opalescentni sokovi in kašasti sokovi, medtem ko Suwa Stanojević (1995) loči le bistri in kašasti sok. S postopkom koncentriranja (zgoščevanja) v določeni fazi proizvodnje omenjenih tipov sokov, se pridobivajo koncentrirani sokovi (koncentrati), ki služijo kot polproizvod za nadaljnjo predelavo ali kot končni proizvod za neposredno uporabo, pri čemer je potrebno razredčevanje do vrednosti suhe snovi izhodiščnega soka. Postopki proizvodnje sadnih sokov so praviloma kontinuirani v vseh fazah – od vhoda surovine pa do odpreme v skladišče ali distribucije. Vrsti sadja je potrebno prilagajati celoten postopek predelave – od načina rokovanja s samo surovino do prebiranja in kasnejše predelave. Razlike med samimi postopki predelave so predvsem v tem, kakšen končni proizvod želimo pridelati: ali želimo bistri, motni, kašasti ali koncentrirani sok (Lovrić in Piližota, 1994).

Primernost nekega sadja za proizvodnjo določene vrste (tipa) soka je odvisna od njegovih značilnosti, najprej od kemijske sestave, pri čemur odločujoča vloga pripada rastlinskim pigmentom – to je nosilec značilne barve tega sadja. Sadje, čigar barva izvira iz snovi topnih v vodi ali matičnem soku, kakršni so antociani (rdeče, vijoličaste ali modre barve), je primerno v osnovi za proizvodnjo kakršnega koli tipa soka. V to skupino sadja spadajo malina, jagoda, robidnica, višnja, borovnica, ribez in podobni. V sokovih, ki pa se izdelujejo iz vrst sadja, kot so pomaranča, marelica, breskev, pa se zgodi, da se tekom bistenja in filtracije zadrži izvorna barva. Barvo marelici, breskvi in pomaranči namreč dajejo karotenoidni pigmenti, ki v vodi niso topni in se zato pri filtraciji odstranjujejo. Iz teh vrst sadja se zato praviloma ne proizvajajo bistri, temveč samo motni in kašasti sokovi (Lovrić in Piližota, 1994).

Poleg kemijske sestave, ki pretežno vpliva na izbor tipa soka, pri izbiri postopka proizvodnje in posameznih tehnoloških operacij, ima zelo pomembno vlogo tudi aromatsko-morfološka zgradba plodu določene vrste sadja. To pride še posebno do izraza v

začetni fazi proizvodnje. V primerjavi z jabolki zahteva jagodičasto sadje zaradi izrazite občutljivosti na mehanske poškodbe zelo hitro rokovanje v vseh fazah, od obiranja do začetka predelave, vključno z načinom in pogoji prevoza ter kasnejšo čim hitrejšo predelavo, predvsem zato, ker se v številnih slučajih to sadje ne pere. Če pa se v kratkem obdobju od obiranja ne more predelati, ga je potrebno začasno uskladiščiti v hladnem prostoru. Jagode, maline in robidnice je celo zaželeno zadržati dan ali dva v hladnem prostoru zaradi popolnega razvoja barve in arome. Priporočljivo je, da se nabiranje izvaja v jutranjih urah, ko je temperatura nižja, zaradi česar ni potrebno dodatno hlajenje (Lovrić in Piližota, 1994).

2.3.1.1 Bistri sokovi

Bistri sadni sok je sok, ki ga dobimo s stiskanjem svežega sadja. Sok nato še zbistrimo, obstojnost pa mu podaljšamo s konzerviranjem (Suwa Stanojević, 1995)

Tehnološki postopki priprave surovine za predelavo so: sprejem, pranje, prebiranje in mletje (Suwa Stanojević, 1995). Embalaža za prevoz in način dostave v predelavo je odvisen od vrste sadja. Jabolka in sadje podobne zgradbe plodu se dostavljajo pretežno v razsutem stanju oziroma v zabojih z večjim volumnom. Za drobno sadje pa se uporabljajo manjši, plitvejši zaboji in druga primerna sredstva za prevoz. Razlike v dostavi različni vrst sadja so neodvisne od nadaljnjih postopkov predelave (Lovrić in Piližota, 1994). Način pranja in prebiranja so močno odvisni od vrste sadja.

Pranju in prebiranju sledi mletje, pri čemer mlini drobijo sadno meso v sadno kašo. Pri tem je važna velikost delcev v zrnato – kašasti zmesi, če so namreč delci premajhni, je stiskanje oteženo. Po mletju sadja se takoj začne vrsta biokemičnih procesov, ki so za zgradbo aromatičnih snovi deloma zaželeni, sočasno pa se odvijajo tudi neželeni procesi. Nastajajo presnovni produkti kvasovk in bakterij, kot so alkohol, očetna kislina, aceton, diacetil, ... odvijajo se tudi številni encimski, oksidacijski in redukcijski procesi, ki negativno vplivajo na kvaliteto soka (Koren, 1989). Surovini, ki je občutljiva na porjavenje, se v tej fazi predelave doda askorbinsko kislino, da porjavenje prepreči (Suwa Stanojević, 1995).

Toplotna obdelava, segrevanje na okrog 85 °C, v pripravljalni fazi se praviloma uporablja za vse vrste obarvanega sadja, kakršno je jagodičasto sadje ter višnje in češnje. Povezana je s kasnejšo encimsko obdelavo, pomembna pa je predvsem za maksimalno iztiskanje soka in snovi, ki dajejo soku barvo ter povečajo stabilnost le teh. Jabolka in belo grozdje se praviloma ne obdeluje toplotno pred stiskanjem (Lovrić in Piližota, 1994).

V proizvodnji bistrih sokov so glavne razlike pojavljajo v pripravi sadja za stiskanje (prešanje) in izboru odgovarjajoče opreme. Za drobljenje (iztiskanje) jabolk služijo batne stiskalnice ali druge naprave s podobnim učinkom, za jagodičasto sadje pa uporabljajo predvsem naprave z valji. Medtem ko je mehansko stiskanje drobnega sadja, na primer

višnje in češnje povezano s toplotno obdelavo, po kateri se odstranjujejo tudi koščice. Za uspešno izdvajanje soka iz mnogih vrst sadja, predvsem jagodičevja, ni dovolj le mletje in stiskanje, niti toplotna obdelava (predgevanje), temveč je potrebno poseči še po encimski obdelavi z pektinolitičnimi in maceracijskimi encimi pri temperaturi 50-55°C, ki mora trajati 1-2 uri (Lovrić in Piližota, 1994).

Bistrenje soka je ključna faza v proizvodnji bistrih sokov. Zajema posege, procese in operacije, katerih cilj je odstranjevanje delcev, ki povzročajo motnost in/ali tistih sestavin, ki lahko šele kasneje povzročijo motnost. Tako dobimo stabilen bistri sok. Med posege v soku z namenom bistrenja spadajo:

- obdelava s pektinolitičnimi encimi (depektinizacija) ter
- obdelava s sredstvi za bistrenje, kot so želatina, tanin, bentonit, kisle soli in polivinilpirolidon (Lovrić in Piližota, 1994).

Bistrenju sledijo dekantiranje, centrifugiranje in filtracija, v novem času pa tudi flotacija. Filtracija je postopek, pri katerem izločimo iz soka vse večje delce. Učinek filtriranja lahko še izboljšamo z uporabo kremenčeve sige in diatomejske zemlje. Namesto filtracije se pogosto uporablja centrifugiranje. Bistvo tega postopka pa je vpliv centrifugalne sile, ki je močnejša od gravitacijske, zato iz tekočine odstranimo težje delce, ki bi se sicer usedli na dno (Suwa Stanojević, 1995).

Dokončna obdelava v proizvodnji bistrih sokov vključuje eventuelno korekcijo s sladkornim sirupom in kislinami (v skladu s pravilnikom) ali kupažiranje sokov, filtracija, odzračevanje (deaeracija), pasterizacija in polnjenje v odgovarjajočo embalažo (Lovrić in Piližota, 1994).

2.3.1.2 Kašasti sokovi

Postopki proizvodnje kašastih sokov se precej razlikujejo od postopkov, s katerimi se pridobivajo bistri sokovi. Proizvodnja namreč predpostavlja vnos dela pulpe, to je netopnih delov tkiva sadja (Lovrić in Piližota, 1994).

Sadje se predela v kašasti sadni sok po naslednjih tehnoloških postopkih:

- prebiranje sadja po kakovosti,
- pranje s potapljanjem v bazene z vodo,
- izpiranje s tuširanjem,
- kontrola učinkovitosti pranja,
- odstranjevanje poškodovanih plodov,
- odstranjevanje koščic pri koščičastem sadju s strgalkami, ki strgajo meso s koščic,
- blanširanje ali parjenje pri temperaturi 80 – 90 °C, zato da zmehčamo meso ploda, inaktiviramo encime in nekatere mikroorganizme. Med blanširanjem se pektin hidrolizira, zato je stiskanje ali pasiranje bistveno lažje,

- pasiranje v pasirki, ki ima sita z 1,5 – 5 mm velikimi odprtinami. Sledi pasiranje na sitih, ki imajo odprtine v velikosti do 0,3 mm. Učinek pasiranja je veliko boljši, če je surovina segreta,
- koloidno mletje sadne kaše za boljšo homogenizacijo. Kaša za proizvodnjo kašastega koncentrata mora biti čim bolj gosta in stabilna. To pomeni, da se ne sme razslojevati na trdno in tekočo fazo. V ta namen uporabljamo posebne encimske preparate za maceracijo, ki povzročijo razpadanje medceličnega rastlinskega tkiva,
- deaeracija ali odzračevanje (odstranjevanje zraka) na deaeratorjih, kjer kašo v vakuumu razpršimo čim bolj na drobno,
- homogenizacija v visokotlačnih napravah,
- pasterizacija na ploščnih pasterizatorjih, pri temperaturi 75 °C 15 minut, če poteka potem vroče polnjenje ali pasterizacija v tunelskih pasterizatorjih, pri temperaturi 95 °C 30 sekund, če je sok v embalaži,
- končna kontrola kakovosti in skladiščenje (Suwa Stanojevič, 1995).

2.3.1.3 Motni sokovi

Motni sokovi predstavljajo neko prehodno skupino med bistrimi in kašastimi sokovi. Delci v motnih sokovih so takih značilnosti in dimenzij, da se običajno ne usedajo, njihov skupni delež v motnem soku pa je znatno nižji kot v kašastih sokovih. Proces proizvodnje je enak proizvodnji bistrnih sokov, pri čemer se izpusti proces bistrenja, to je depektinizacija in filtracija. Tipični predstavniki motnih sokov so sokovi iz citrusov (agumov): pomaranče, limone, grenivke, mandarine. Poleg soka iz agrumov, se lahko motni sok pridobiva tudi iz jabolk in grozdja (Lovrić in Piližota, 1994).

Postopki pridobivanja sokov iz citrusov se specifični, posebno v začetni fazi. To se najprej pokaže v načinu izdvajanja soka iz plodov in potrebnem odstranjevanju eteričnih olj iz površinskega dela lupine. To je potrebno izpeljati pred izdvajanjem soka, ki se opravlja s pomočjo ekstraktorjev, praviloma brez drobljenja lupine. V tem primeru se ne uporablja toplotne obdelave, in sicer vse do končne obdelave ali eventuelnega koncentriranja z uparovanjem (Lovrić in Piližota, 1994).

2.3.1.4 Zgoščeni ali koncentrirani sokovi

To so sokovi, ki jim je bila odvzeta voda, zaradi česar se jim je povečala vsebnost suhe snovi, katere vsebnost mora biti vsaj 45 %. Za proizvodnjo sadnih koncentratov se uporablja pečkato, koščičasto in jagodičasto sadje. Njihova proizvodnja ima velik pomen v predelavi sadja, posebno v proizvodnji sokov in napitkov oz. brezalkoholnih pijač in sadnih sirupov. Koncentriranje sadnih sokov se uvršča med najzahtevnejše procese predelave sadja, v prvi vrsti zaradi težav pri ohranjanju arome ter težav pri koncentriranju sokov, ki vsebujejo koloidne, netopne snovi (delce, ki povzročajo motnosti), kakršni so

ponavadi motni, zagotovo pa kašasti sokovi (Lovrić in Piližota, 1994, Suwa Stanojević, 1995).

Še vedno zelo pogosto uporabljen način koncentriranja ostaja uparevanje, čeprav ima ta postopek pomanjkljivost. Pri uparevanju vode se namreč izgubljajo tudi hlapne aromatične snovi, ki pa se ponovno ulovijo, koncentrirajo in vračajo v koncentriran sok (Lovrić in Piližota, 1994). Z novejšim tehnološkim postopkom proizvodnje predvsem kašastih koncentratov, ki ga imenujemo serumski postopek, kašo ločimo na trdno fazo ali pulpo, ki vsebuje 15 – 25 % suhe snovi in tekočo fazo ali serum. Ločevanje poteka v dekanterjih s pomočjo centrifugalne sile, čas zgoščevanja seruma potem pa je bistveno krajši (Suwa Stanojević, 1995). Poleg uparevanja se vedno pogosteje uporabljajo tudi druge moderne metode koncentriranja, kakršna sta reverzna osmoza in koncentriranje z zamrzovanjem, čeprav so še vedno omejene na določene vrste sokov (npr. sokove iz citrusov) oz. jih je mogoče uporabiti le za določeno stopnjo koncentriranja (do 30 % suhe snovi pri reverzni osmozi) (Lovrić in Piližota, 1994).

2.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI SLADKORJEV V SOKOVIH IN NEKTARJIH Z METODO HPLC

Poznamo številne kvantitativne metode za merjenje vsebnosti sladkorjev:

- Fizikalne metode:
 - refraktometrija,
 - polarimetrija,
 - hidrometrija.
- Kemijske metode:
 - kolorimetrične titracijske metode (Fehlingova in Luff – Schorlova metoda ter metoda za določanje fruktoze),
 - spektrofotometrične metode.
- Fizikalnokemijske metode:
 - kromatografske metode (papirna, tankoplastna, tekočinska in plinska kromatografija).
- Avtomatske metode:
 - FIA (flow injection analiza).

Za HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) je značilna njena občutljivost, selektivnost, učinkovitost in visoka stopnja ločljivosti, zaradi česar je bila tudi izbrana za določanje vsebnosti sladkorjev v vzorcih in nektarjih v moji diplomski nalogi.

Kromatografske tehnike omogočajo ločevanje molekul s podobnimi kemijskimi lastnostmi v kompleksnih vzorcih. Na splošno jih razdelimo na kolonsko kromatografijo in planarno kromatografijo. Pri kolonski kromatografiji, med katere spada tudi HPLC, se stacionarna

faza nahaja v ozki cevi (kolona), skozi katero se s pomočjo tlaka ali gravitacije pomika mobilna faza (Kordiš Krapež in Štrancar, 2005).

HPLC je instrumentalna oblika tekočinske kromatografije, ki je od svojega razvoja v poznih 1960-ih poznana pod različnimi imeni, vključno z imenoma visokotlačna tekočinska kromatografija, ki ga je dobila zaradi visokega pritiska, ki je potreben za potiskanje mobilne faze oziroma vzorca preko stacionarne faze in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, zaradi dobre ločljivosti, ki jo dosežemo z uporabo te tehnike (Moreno-Arribas in Polo, 2003).

Pri kromatografskih procesih gre za porazdelitev komponent vzorca med stacionarno fazo in mobilno fazo. Vzorce navadno raztopimo v mobilni fazi, mobilno fazo pa potiskamo preko stacionarne faze. Stacionarna faza (mikronski delci raznih velikosti z različno kemijsko sestavo) se nahaja v stekleni, plastični ali jekleni cevi, ki se imenuje kromatografska kolona. Hitrost potovanja tistih spojin, ki jih stacionarna faza močnejše zadržuje, je manjša in obratno, komponente, ki jih stacionarna faza šibkeje zadržuje, potujejo hitreje (Kordiš Krapež in Štrancar, 2005).

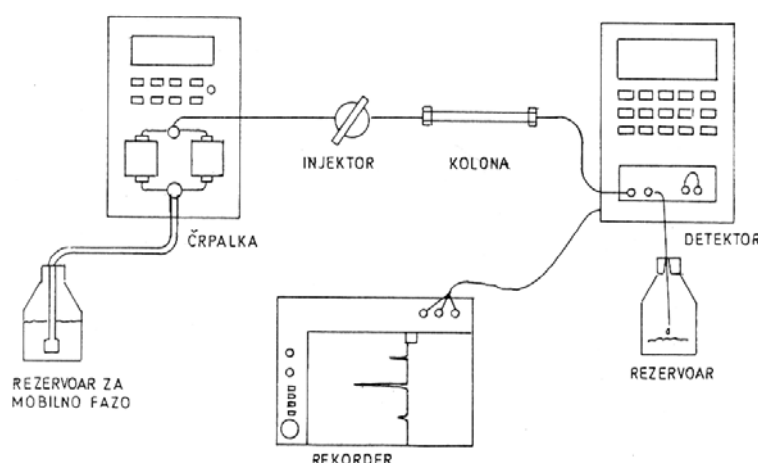
Glede na kemizem separacije Moreno-Arribas in Polo (2003) ločita več vrst HPLC tehnik: kromatografija na normalni in reverzni fazi, ionska izmenjevalna kromatografija, gelska filtracija oziroma permeacija, kromatografija ionskih parov in afinitetna kromatografija.

Za določanje sladkorjev v vzorcu je najbolj primerna ionska izmenjalna kromatografija. Pri tej vrsti kromatografije je stacionarna faza ionski izmenjalec. To je inerten netopen nosilec, na katerem so kemijsko vezane nabite skupine, ki so v ravnotežju z mobilnimi ioni nasprotnega naboja. Ti protiioni se lahko reverzibilno izmenjujejo z drugimi ioni istega naboja, ne da bi se pri tem spremenila struktura nosilca. Ionski izmenjalec s pozitivno nabitimi skupinami in negativno nabitimi protiioni (anionski izmenjevalec), je primeren za ločevanje snovi, ki so negativno nabite, medtem ko je kationski izmenjalec uporaben za ločevanje pozitivno nabitih snovi. V samem procesu izmenjave mora ion najprej difundirati do površine izmenjalca, ki je uravnotežen z začetnim pufrom, in nato skozi mrežasto strukturo nosilca do nabite skupine. Hitrost difuzije je odvisna od stopnje zamreženosti nosilca in je omejujoč faktor v celotnem procesu. Izmenjani protiion mora difundirati na površino izmenjalca. Čim bolj je snov nabita, tem močnejše se bo vezala na izmenjalec in težje jo je zamenjati z drugimi ioni. Selektivna desorpcija nastopi ob dotoku mobilne faze (pufra), ki vsebuje protiione z višjo afiniteto, ali ima zvišano ionsko jakost ali spremnjen pH (Kreger, 1996).

Za delo pri visokotlačni kromatografiji potrebujemo instrument, ki omogoča delovanje pri visokih tlakih do 40-50 MPa. Osnovne komponente HPLC sistema so:

- razplinjevalnik, ki odstranjuje pline iz mobilne faze,
- ena ali več črpalk, ki potiskajo mobilno fazo skozi kolono,
- avtomatski vzorčevalnik ali injektor za nanos vzorca na kolono,

- kromatografska kolona, ki predstavlja bistveni del HPLC sistema in v kateri se dogajajo najpomembnejši procesi separacije,
- detektor, ki se uporablja za slednje sprememb določene fizikalno-kemijske lastnosti mobilne faze, v kateri se nahajajo komponente vzorca na izhodu iz kolone in
- sistem za beleženje signala ali rekorder, najpogosteje računalnik z ustreznim kromatografskim programom (Kordiš Krapež in Štarancar, 2005; Žorž, 1991).



Slika 6: Shema najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo (Žorž, 1991)

Detektorje lahko glede na naravo analiziranega signala razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo dokaj univerzalni kot na primer detektorji za merjenje električne prevodnosti, lomnega količnika, dielektrične konstante, ki pa niso selektivni. V drugo skupino pa spadajo selektivni detektorji, pri katerih analizni signal izvira le iz odziva topljenja. Taki detektorji so UV-VIS, fluorescenčni detektor, elektrokemijski detektor, detektor za merjenje električne prevodnosti. Izbiro detektorja pogojujejo predvsem kemijske in fizikalne značilnosti komponent, ki jih analiziramo ter koncentracijski nivo merjene komponente in prisotnost motečih komponent. Za analizo sladkorjev, glicerola in nenasičenih trigliceridov se najpogosteje uporablja refraktometer (RI detektor). To je detektor za merjenje lomnega količnika in spada med najbolj univerzalne HPLC detektorje. Njegova slaba stran pa je majhna občutljivost in velika odvisnost od temperature (Kordiš Krapež in Štarancar, 2005).

Kljub temu, da je matematično nemogoče opisati vsa dogajanja v kromatografski koloni, je za načrtovanje in optimizacijo kromatografskih procesov potrebno spremljanje nekaterih spremenljivk, kot so:

- retenzijski čas,
Čas, ki je potreben, da vzorčna komponenta pripotuje od injektorja skozi kolono do detektorja.
- ločljivost,
Cilj kromatografije je v zmernem času ločiti zmes komponent na posamezne komponente. Komponenti sta ločeni, ko je ločljivost (R) med njima najmanj 1,5. Ločljivost med kromatografskima vrhoma lahko izboljšamo z izbiro ustrezne kolone ali spremembo kromatografskih pogojev (sestavo mobilne faze). Za uspešno kromatografsko ločbo je potreben kompromis med ločljivostjo med posameznimi kromatografskimi vrhovi in hitrostjo ločevanja.
- učinkovitost kolone,
Učinkovitost kolone je tem boljša, čim daljši je zadrževalni čas in čim ožji je kromatografski vrh. Na širjenje kromatografskega vrha v koloni vplivajo: različne poti molekul iste komponente skozi kolono, difuzija vzorca in vplivi masnega prenosa med fazami.
- selektivnost kolone,
Selektivnost kolone (α) je funkcija izmenjevalnega procesa med komponentami vzorca in mobilno ter stacionarno fazo. Pomemben podatek pri selektivnosti kolone je tudi porazdelitveni koeficient (K). Velik porazdelitveni koeficient pomeni, da ima komponenta vzorca veliko afiniteto do stacionarne faze in bo zato njen retenzijski čas dolg. Spremembo selektivnosti kolone oziroma spremembo porazdelitvanega koeficienta lahko dosežemo na več načinov: z zamenjavo mobilne (sprememba polarnosti, pH, ionske moči) ali stacionarne faze (sprememba velikosti por, lastnosti adsorbenta ali ionskega izmenjevalca), s spremembo temperature ali s spremembo narave komponente vzorca (formiranje ionskih parov).
- kapaciteta kolone.
Kapaciteta kolone je število aktivnih mest, ki se nahajajo v določeni koloni. To število je odvisno od lastnosti stacionarne in mobilne faze. Majhna kapaciteta pomeni, da bodo komponente imele kratek retenzijski čas in zato slabo separacijo. Večja kapaciteta bo ločevanje izboljšala, vendar se bo čas analize podaljšal, vrhovi pa se bodo razširili (Kordiš Krapež in Štrancar, 2005).

2.4.1 Vsebnost sladkorjev v posameznih vrstah sokov

Podatke o vsebnosti razpoložljivih ogljikovih hidratov, glukoze, fruktoze in saharoze smo našli v prehranskih tabelah Soucija in sodelavcev (2008, 2000).

Preglednica 1: Vsebnost sladkorjev v posameznih vrstah sokov – povzeto po prehranskih tabelah (Souci in sod., 2008; Souci in sod., 2000)

Vrsta soka	Vrednosti (g/100 ml)	Sladkorji			
		razpoložljivi	glukoza	fruktoza	saharoza
pomarančni sok	povprečna vrednost	8,690	2,610	2,470	3,440
	interval		2,300 - 2,900	2,000 - 3,400	2,700 - 4,800
jabolčni sok	povprečna vrednost	11,100	2,400	6,400	1,700
	interval		1,700 - 3,000	5,100 - 7,700	1,200 - 2,300
granivkin sok	povprečna vrednost	10,100	4,300	4,200	1,600
	interval		2,600 - 5,600	2,700 - 5,000	1,100 - 2,100
ananasov sok	povprečna vrednost	9,710	2,603	2,593	4,513
	interval	9,380 - 11,400	2,420 - 3,520	2,390 - 3,610	4,230 - 4,570

2.5 ZAHTEVE SLOVENSKEGA PRAVILNIKA O KAKOVOSTI SADNIH SOKOV IN PODOBNIH SADNIH IZDELKOV

2.5.1 Sadni sok

Sadni sok se pridobiva iz ene ali več različnih vrst svežega ali zamrznjenega sadja z mehanskimi postopki in lahko fermentira, vendar ne sme biti fermentiran. Barva, aroma, vonj in okus morajo biti značilni za sadje, iz katerega je sadni sok pridobljen. Sadni sok iz citrusov se pridobiva samo iz mesnatega dela plodu, le sadni sok iz limete se lahko pridobiva iz celega plodu, pod pogojem, da z ustreznim tehnološkim postopkom preide čim manj sestavin zunanega dela plodu v sok (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001).

Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov (2001) dovoljuje tudi, da se sadni sok lahko pridobiva tudi iz zgoščenega sadnega soka z dodatkom enake količine vode, kot je bila soku odvzeta med postopkom zgoščevanja. Dodana voda mora biti glede kemijskih, mikrobioloških in organoleptičnih lastnosti takšna, da je po razredčenju zagotovljena enaka kakovost soka, kot je bila pred zgoščevanjem. Sadnemu soku, ki se pridobiva iz zgoščenega sadnega soka, se lahko doda hlapne aromatične snovi (aroma), ki so bile odvzete med postopkom zgoščevanja istega soka ali soka iste vrste sadja. Aroma se lahko povrne soku le do količine, ki jo je vseboval sadni sok pred zgoščevanjem.

Sadnemu soku, razen hruškovemu in grozdnemu, se lahko doda sladkorje, pod naslednjimi pogoji:

- a) za korekcijo je lahko dodan sladkor, izražen kot topna suha snov, do največ 15 g/l soka;
- b) za uravnavanje sladkosti je lahko dodan sladkor, izražen kot topna suha snov, do največ:
 - 40 g/l pri jabolčnem soku;
 - 200 g/l pri soku iz citrusov: limon, limet, bergamot ter soku iz črnega, rdečega ter belega ribeza;
 - 100 g/l pri sokovih iz drugih vrst sadja (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001).

2.5.2 Zgoščeni sadni sok

Zgoščeni sadni sok se pridobiva iz sadnega soka s fizikalnimi postopki, s katerimi se soku odvzame del vsebovane vode. Za proizvodnjo zgoščenega sadnega soka se lahko uporablja sveže ali zamrznjeno sadje in sadni sok, ki so konzervirani le s fizikalnimi postopki. Pri zgoščenem sadnem soku, ki je namenjen neposredno potrošniku, se mora odvzeti tolikšen delež vsebovane vode, da je njegov volumen zmanjšan najmanj za 50 odstotkov (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001).

2.5.3 Sadni nektar

Sadni nektar se pridobiva iz sadnega soka z dodajanjem vode in sladkorja; lahko fermentira, vendar ne sme biti fermentiran. Namesto sadnega soka se lahko uporablja zgoščeni sadni sok, sadna kaša, zgoščena sadna kaša ali mešanica le-teh. Voda je lahko dodana do količine, pri kateri sta vsebnost sadnega deleža ter vsebnost skupnih kislin v sadnem nektarju v vrednostih, kot so določene v preglednici 2 (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001).

Preglednica 2: Najmanjša vsebnost sadnega deleža v nektarju (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001)

Vrsta sadja	Najmanjša vsebnost sadnega deleža (masni %)
pomaranča quito (solanum quitoense)	5
jabolko	3*
breskev	3*
ananas	4
citrusi, razen limon in limet	5

* Pri sadnem nektarju, ki je proizveden iz sadne kaše ali zgoščene sadne kaše, te mejne vrednosti ni mogoče uporabiti.

Sladkor je lahko dodan do največ 20 % glede na skupno maso sadnega nektarja. Sladkor se lahko nadomesti z medom, vendar mora biti nadomeščen v celoti (Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov, 2001).

2.6 POTVORBE SOKOV

Potvorjenost prehrablenih izdelkov predstavlja pereč problem na tržišču tako v Evropski Uniji kot tudi v svetu. Day in sodelavci (2001) navajajo, da je to postalo problem, ko se je začela komercialna produkcija sokov v 50-ih letih prejšnjega stoletja. Poleg ostalih prehrablenih izdelkov, je tudi potvorjenost sadnih sokov pomembna iz ekonomskega vidika, saj je potrošnja sadnih sokov velika. Najbolj obsežne potvorbe sadnih sokov so:

- redčenje z vodo,
- dodatek sladkorjev,
- dodajanje citronske in vinske kisline ter različnih barvil in
- nenazadnje dodajanje cenejših sokov, kot na primer sok grenivk, čistemu soku.

Za uspešno nujno kontrolo ter za ugotavljanje potvorb prehranskih izdelkov se lahko izkoriščajo številne analitske metode: HPLC, GC, GC-MS, UV, AAS/AES, ICP-AES, ICP-MS, IRMS, DSC, IR, in NMR (Ogrinc in sod., 2003). Kljub obstoju številnih analitskih tehnik, je za dokazovanje potvorb najboljša uporaba kombinacije analiz izotopske sestave sokov. Te metode temeljijo na merjenju vsebnosti stabilnih izotopov H, C, in O v specifičnih komponentah sokov oziroma nektarjev.

Specifično naravno izotopsko frakcionacijo torej lahko določimo z uporabo dveh metod: masno spektrometrijo za merjenje izotopskih razmerij (Isotope Ratio Mass Spectrometry – IRMS) in mestno specifično naravno izotopsko frakcionacijo določeno z jedrsko magnetno resonanco (Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance – SNIF-NMR). IRMS in SNIF-NMR se uporabljata za določitev eksogenega sladkorja, kakršni so pesni in trsni sladkor ter koruzni sladkor z visoko vsebnostjo fruktoze in invertni pesni sladkor. Z IRMS pa lahko določimo tudi redčenje sokov z vodo. Specifičnost obeh metod pa se izkorišča tudi za določanje geografskega porekla.

Metode, ki jih uporabljamo za analizo sokov, so bile podrobno proučevane s strani AOAC ter Evropske organizacije za normalizacijo (Committee of European Normalization – CEN) (Martin in sod., 1996a; Martin in sod., 1996b). Kozić in sodelavci (1993) navajajo, da je bila delovna skupina Tehničnega komiteja (CEN/TC 174 WG 1 »Stable Isotopes«) Evropske organizacije za Normalizacijo imenovana prav za to, da sestavi in standardizira izotopske metode za izboljšanje kvalitete kontrole sadnih in zelenjavnih sokov ter da organizira medlaboratorijske teste za preverjanje ponovljivosti in obnovljivosti teh metod. Metode so vključevale določitev ^{13}C v sladkorjih in ^{18}O in ^2H v vodi iz sadnih sokov s pomočjo masne spektrometrije (IRMS) ter ^2H v etanolu pridobljenem po fermentaciji ter

izmerjenim z ^2H – jedrsko magnetno resonanco (^2H -NMR). Glede na dobljene rezultate so bile te metode predlagane kot Evropske standardne metode (European Standard Methods - ENVs). V nadaljevanju bom najprej predstavila osnove določitve izotopske sestave določene spojine oziroma zvrsti.

2.6.1 Stabilni izotopi, njihova porazdelitev v naravi in možnosti frakcionacije

Izotopi so atomi nekega elementa, ki imajo enako vrstno število, torej enako število protonov, a različno masno število, torej različno število nevtronov (Brenčič in Lazarini, 1992). Sama beseda izotopi (grško: iso = isti, topos = mesto) pa pove, da spadajo izotopi na isto mesto v periodnem sistemu elementov (Kuščer in Moljk, 1960). Stabilni izotopi pa so izotopi elementov, ki so stabilni in tekom radioaktivnih procesov ne razpadejo (Ghidini in sod., 2006). Naravni kemijski elementi so večinoma zmesi po več izotopov (Kuščer in Moljk, 1960).

Večina elementov ima več kot samo en stabilen izotop. Vodik obstaja v obliki dveh stabilni izotopov ^1H , ki mu pravimo lahki vodik in ^2H , imenovan tudi devterij (grško: devteros = drugi). Ogljik obstaja v obliki dveh stabilnih izotopov ^{12}C in ^{13}C , medtem ko ima kisik tri stabilne izotope ^{16}O , ^{17}O in ^{18}O . V večini primerov ima v naravi prevladujoči stabilni izotop najnižje število nevtronov, torej je najpogostejši najlažji izotop (Ghidini in sod., 2006). Kuščer in Moljk (1960) navajata, da na 6000 atomov lahkega atoma pride le en atom težjega izotopa. Stabilni izotopi se bistveno razlikujejo od radioaktivnih, ki imajo omejeno življenjsko dobo in so podvrženi razpadu, pri čemer nastane drug element. Čas, ki je potreben za tak razpad, se giblje med eno sekundo do nekaj tisočletij. Na primer, ogljik ima šest radioaktivnih izotopov (^9C , ^{10}C , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}C in ^{16}C), od katerih je ^{14}C najbolj poznan in ima razpolovni čas 5730 let (Ghidini in sod., 2006).

Preglednica 3: Stabilni izotopi elementov, ki se pogosto uporabljajo za določanje avtentičnosti in njihova razširjenost (Ghidini in sod., 2006; Kuščer in Moljk, 1960)

Element	Število izotopov	Število stabilnih izotopov	Stabilni izotop	Razširjenost (%)
vodik	3	2	^1H	99,985
			^2H	0,015
ogljik	8	2	^{12}C	98,89
			^{13}C	1,11
kisik	6	3	^{16}O	99,759
			^{17}O	0,037
			^{18}O	0,204

Prav zaradi svoje stabilnosti predstavljajo stabilni izotopi lahkinih elementov H, C, N, O in S pomembno sledilo pri študiju kroženja biogenih prvin v okolju. Te prvine so najpomembnejše v biološkem sistemu in poleg tega sodelujejo v večini geokemijskih reakcij. Izotopsko sestavo oziroma razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo δ , ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

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

V enačbi 1 A pomeni težji izotop elementa (^2H , ^{13}C , ^{18}O), vrednost R pa je razmerje med izotopi ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in jo vedno podajamo kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu. Mednarodne standarde sta določila Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju (IAEA) in Nacionalni institut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST). Ti standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine. Delta (δ) vrednost vsakega standarda pa je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga vsebuje manj. Za ogljik je privzet karbonatni standard fosila *Belemnite Americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini (PDB – Pee Dee Belemnite) z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$ (Craig, 1957), za kisik pa je privzet standard povprečne morske vode (SMOW – Standard Mean Ocean Water) na globini enega metra pri temperaturi 25 °C z vrednostjo $R_{st} = 0,002005$.

Naravne vsebnosti stabilnih izotopov so v principu konstantne (potemtakem tudi njihova razmerja) in so določene z nastankom elementov oziroma s sestavo Zemlje ob njenem nastanku. Vendar pa so v naravi opazna določena nihanja v vrednostih razmerij zaradi izotopske frakcionacije. Razlike v razmerju $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ so na primer posledica izotopskih efektov, do katerih pride pri nastanku in razpadu vezi, v katerih je bil vključen ogljikov atom ali zaradi drugih procesov, ki so posledica mase, kakšna je difuzija plinov. Izotopski efekti se pogosto delijo na kinetične in termodinamske, glede na to ali so ravnotežni ali ne (Farquhar in sod., 1989).

Kinetični izotopski efekt je posledica različnih vibracijski nivojev vezi, v katerih so udeleženi težji izotopi. Pri procesih, kjer gre za cepitev vezi, se vpletenost molekule s težjim izotopom odraža v kinetiki same reakcije, zato je eden izmed produktov favoriziran (bodisi tisti z lažjim, bodisi tisti s težjim izotopom). To dejstvo pride še zlasti do izraza v različnih biokemijskih reakcijah v naravi. Prvi primer kinetičnega efekta je razlika v dvojni difuzivnosti $^{13}\text{CO}_2$ in $^{12}\text{CO}_2$ v zraku, drugi pa razlika v kinetični konstanti reakcije $^{12}\text{CO}_2$ oziroma $^{13}\text{CO}_2$ z rubiskom. Oba primera kinetičnega efekta sta v korist lažjega izotopa (Farquhar in sod., 1989; Košir, 2001).

Termodinamski efekt pa predstavlja ravnotežje med kinetičnima efektoma kemijskega ravnotežja in je v splošnem manjši kot posamezni kinetični efekt. Odraža se predvsem v

fizikalnih lastnostih, kot so parni tlak, vrelišče, tališče ipd. in pride do veljave, kadar imamo opravka s snovnim prenosom med dvema fazama (difuzija, izparevanje, kristalizacija ipd.). Tako termodinamski efekt kot tudi nekateri kinetični so odvisni od temperature (Farquhar in sod. 1989; Košir, 2001).

V primeru ravnotežnih reakcij med posameznimi fazami izražamo izotopske efekte s faktorjem izotopske frakcionacije, α . Faktor izotopske frakcionacije α za fazi R (reaktanti) $\leftrightarrow$ P (produkti), ki je posledica ravnotežnih in/ali kinetičnih izotopskih procesov, je podan z enačbo:

$$\alpha = \frac{R_r}{R_p} \quad \dots(2)$$

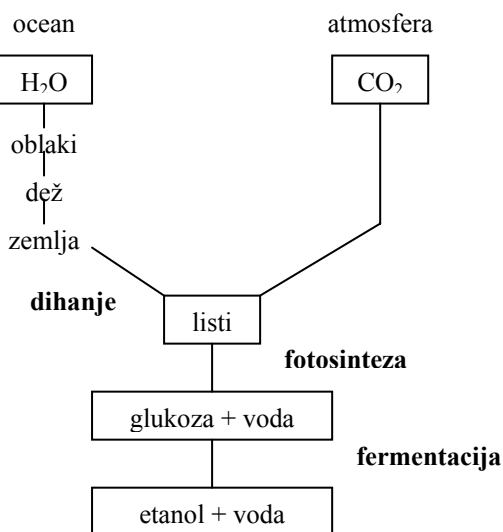
pri čemer je R_r razmerje vsebnosti težjega izotopa in vsebnosti lažjega izotopa istega elementa v molekuli ali fazi R (reaktantov), R_p pa razmerje istih izotopov v molekuli ali fazi P (produktov).

V primeru ogljika in kisika sta to razmerji $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Do frakcionacije katerih prihaja tako v atmosferi in v tleh, najpomembnejše razlike pa nastanejo zaradi frakcionacije v samih organih rastline. Ob upoštevanju enačbe 1 lahko izrazimo frakcionacijski faktor α z vrednostjo δ in dobimo:

$$\alpha_{R-P} = \frac{1000 + \delta R}{1000 + \delta P} \quad \dots(3)$$

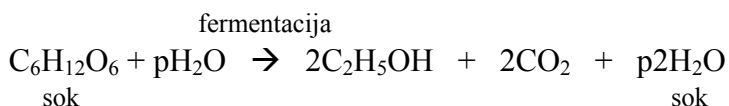
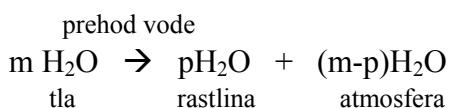
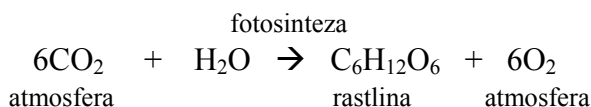
kjer sta vrednosti δR in δP izotopski sestavi R (reaktanta) in P (produkta).

Martin (1990) navaja, da pride v vsaki fizikalni, kemijski, fiziološki in biokemijski transformaciji do izotopske frakcionacije. Difuzija svetlobe in izotopov z različno težo v rastlino je odvisna od njene vrste in geoklimatskih razmer. Rastlina proizvaja sok z izotopsko sestavo, na katero vplivajo okolje in leto nastanka (klimatološka frakcionacija), raznolikost med posameznimi vrstami (fiziološka frakcionacija) in vrsta fotosinteze, ki jo rastlina uporablja za sintezo sladkorjev (biokemijska frakcionacija). Če pa v sok dodamo ustrezne kvasovke in omogočimo pogoje za fermentacijo ter se le ta izvrši, pride med to biokemijsko transformacijo prav tako do tipičnih transformacijskih mehanizmov.



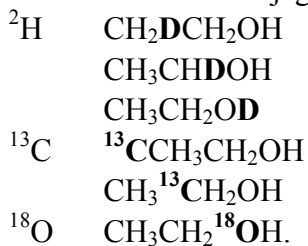
Slika 7: Možnosti izotopske frakcionacije od molekul atmosfere (izvor CO₂) do oceana (izvor H₂O) do fermentacije soka (Martin, 1990)

Metabolična procesa nastanka sladkorjev in fermentacije zapisana še v obliki kemijskih enačb:



Za molekulo etanola je izotopski opis še nekoliko zahtevnejši, ker molekula vsebuje izotope devterija na različnih specifičnih mestih v molekuli in jih zato imenujemo tudi izotopomeri (Martin, 1990).

Možnosti vezave težjega izotopa:

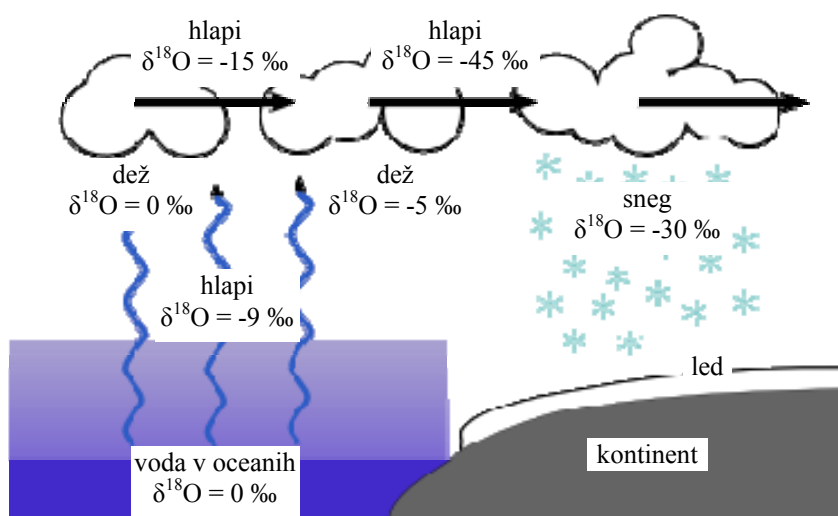


2.6.2 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{12}C , ^{13}C , ^{16}O in ^{18}O

2.6.2.1 Izotopska frakcionacija ^{16}O in ^{18}O

Na izotopsko sestavo kisika v vodi vsake rastline ima največji vpliv vir rastlinam dostopne vode. Izvor rastlinam dostopne vode na Zemlji je predvsem talna voda, ki izvira iz meteornih vod, vir le teh pa so večinoma drugi večji površinski vodni viri. Voda na poti od izhodišča do rastline prehaja preko vrste procesov, katerih posledica je izotopska frakcionacija (Košir, 2001; Rossman in sod., 1999). Poleg tega pa Bréas in sodelavci (1994) dodajajo, da do frakcionacije prihaja tudi med izhlapevanjem in biokemijskimi reakcijami v rastlinah.

Frakcionacija izotopov kisika se zgodi tekom evaporacije in kondenzacije v procesu kroženja vode. Voda namreč prehaja iz tekoče faze v oceanih v plinsko, ko postane v obliki vlage del atmosfere. Tekom teh procesov je podvržena močnim izotopskim frakcionacijam, katerih posledica je osiromašenje težjega izotopa (^{18}O) v vlagi in oblakih. Obseg teh frakcionacij je odvisen predvsem od temperature (Calderone in Guillou, 2008).



Slika 8: Klimatski in geografski vplivi na izotopsko frakcionacijo kisika (Calderone in Guillou, 2008)

Ko zračna masa potuje od vira (oceani, morja), preko kontinentov, se ohlaja, posledica tega pa je nižja zračna vlažnost. Pri transportu vode iz morja do kontinentalnih področij začne padati izotopsko obogaten dež in vlaga postane postopoma vedno revnejša glede na vsebnost ^{18}O . Osiromašenje vode s težjim izotopom ^{18}O je zelo opazno od ekvatorja proti poloma. Podobno pa se osiromašenje veča tudi od morskih obal proti notranjim kontinentalnim predelom. Rezultat klimatskih, geografskih in topografskih razmer je torej značilen izotopski vzorec meteornih vod (Calderone in Guillou, 2008; Košir, 2001).

Meteorne vode prodirajo v tla in hkrati iz njih tudi izparevajo, kar vodi do obogatitve talne vode s težjimi izotopi. Ta proces je še posebej močno izražen v obdobjih toplih in relativno suhih poletnih mesecev, ko je izparevanje največje, dotok sveže meteorne vode pa manjši. Frakcionacija v tleh je najmočnejše izražena na površini in z globino hitro pada. V globini 40–60 cm teoretično ni več prisotna. Upoštevati pa je potrebno tudi dejstvo, da je značilnost tal zelo odvisna od vrste prsti in lahko odločilno vpliva na pojavljanje izotopske frakcionacije tudi v globljih plasteh (Košir, 2001).

Razliko v vsebnosti ^{18}O glede na klimatske razmere v meteorinih vodah lahko predstavimo z enačbo:

$$\delta^{18}\text{O} (\text{‰}) = -11,8 + (0,42 \pm 0,23)T - (0,008 \pm 0,005)P \quad \dots(4)$$

kjer je T povprečna mesečna temperatura v $^{\circ}\text{C}$ in P povprečna mesečna količina padavin v mm. Odločilni faktor spremembe je temperatura, medtem ko je količina padavin pomembna predvsem v krajih, kjer je pričakovana velika količina padavin (obalni predeli). Glede na navedena dejstva je upravičeno sklepati, da bodo razlike med klimatskimi pogoji posledično vplivale na letne razlike v izotopskih razmerjih (Košir, 2001).

Pomembno vlogo pri izotopski frakcionaciji pa igra tudi fiziologija rastlin, na primer z prilagajanjem relativne odprtosti oziroma zaprtosti rež in s tem dostopom vode (atmosferska ali zemeljska vlaga) v rastlino. Evapo-transpiracija, to je kombiniran transport vode – izhlapevanje in izločanje vode, ki se odvija med dozorevanjem sadja, je prav tako faktor izotopske frakcionacije. Ta proces povzroča obogatitev težjih izotopov kisika, pa tudi vodika vode v rastlinah in plodovih. Opazovana izotopska razmerja v vodi rastline so pozitivna v primerjavi z vodo, ki je bila na voljo med rastjo. Omenjena obogatitev je tem večja, čim bolj suho in toplo je podnebje na določenem področju. Še več, nadzemne rastline, kakršne so sadne rastline, kažejo močnejši evapo-transpiracijski efekt kot na primer sladkorna pesa, ki raste pod zemljo, kar se pokaže kot obogatitev devterija v sladkorjih iz sadežev kot v sladkorjih iz pese (Calderone in Guillou, 2008; Doner in sod., 1992; Košir, 2001).

Viri v rastlino vnesenega kisika so lahko različni: atmosferski kisik in ogljikov dioksid, glavni pa je v primeru kisika voda iz zemlje. Zatorej je vsebnost ^{18}O v vodi, ki se nahaja v sokovih le odsev kraja, na katerem je sadje, iz katerega je bil sok izdelan, raslo (Calderone in Guillou, 2008). Martin in sodelavci (1996a) namreč trdijo, da način predelave nima nobenega vpliva na izotopsko frakcionacijo.

2.6.2.2 Izotopska frakcionacija ^{13}C in ^{12}C

Primarna rezervoarja ogljika v naravi sta HCO_3^- v hidrosferi in CO_2 v atmosferi (Bréas in sod., 1994). Velika količina ogljika v morskih vodah omogoča nadzor izotopskega razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v večini bioloških sistemov preko različnih ravnotežnih reakcij, v katerih je udeležen tudi atmosferski CO_2 . Rezultat te izotopske frakcionacije je, da je razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v večini bioloških sistemov v primerjavi z morji vedno občutno nižje (Košir, 2001).

Zaradi različnih biosinteznih poti, ki jih rastline uporabljajo za fotosintezo in so podrobneje opisane v poglavju 2.2, pride do različne izotopske obogatitve v rastlinskih produktih. Produkti iz rastlin z C_4 ciklom so praviloma znatno bogatejši s težjimi izotopi glede na produkte rastlin z C_3 ciklom (Guček in sod., 1998). Te razlike so dovolj velike, da lahko na njihovi osnovi določimo botanično poreklo omenjenih spojin, kar omogoča potrjevanje avtentičnosti končnih izdelkov. Primarni encim odgovoren za fiksacijo anorganskega ogljika je ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (rubisko), ki katalizira reakcijo med ribulozo 1,5-bifosfatom in CO_2 , pri čemer nastaneta dve molekuli 3-fosfoglicerata kot del Calvin-Bensonovega ciklusa. Encim močno diskriminira težji izotop ^{13}C , tako da so vrednosti izotopske frakcionacije do 27 ‰ v primerjavi z izotopsko vrednostjo izvirnega ogljika. Značilne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za rastline s C_3 ciklom se gibljejo med -32 in -24 ‰. Rastline, ki uporabljajo C_4 pot fotosinteze, imajo alternativni encim, fosfoenolpiruvat karboksilazo (PEP karboksilaza) za prvi korak fiksacije CO_2 . Izotopski efekt, povezan s tem encimom (2,2 ‰) je veliko manjši od efekta rubisko, zato imajo C_4 rastline bolj pozitivno izotopsko sestavo v obsegu od -8 do -18 ‰, povprečno -17 ‰.

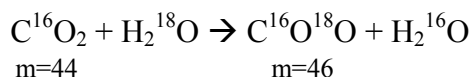
2.6.3 Princip določanja izotopskega razmerja z metodo IRMS

Nihanja v razmerju izotopov istega elementa so izredno majhna, zato je za merjenje odstopanj potrebno imeti občutljiv instrument. Izotopsko sestavo elementov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov Isotope Ratio Mass Spectrometer - IRMS. To je naprava, v kateri najprej ioniziramo delce (atome, molekule ali fragmente molekul), nato pa snop takih delcev v električnem polju pospešimo ter v magnetnem polju odklonimo. Odklon je odvisen od razmerja med maso delca in nabojem (m/z). Iz odklona, ki ga merimo, sklepamo na zvrst delca ali na masno število izotopa. Natančnost meritev se izboljša, ker vzorec primerjamo s standardom, ki ima natančno znano izotopsko sestavo.

Poznamo dva tipa IRMS – z dvojnim uvajalnim sistemom in s kontinuiranim pretokom nosilnega plina. V primeru spektrometra z dvojnim uvajalnim sistemom merimo vzorec relativno glede na standard, ki ga analiziramo simultano. V primeru spektrometra s kontinuiranim pretokom, pa vzorec uvajamo v masni spektrometer s He. Največja prednost spektrometra z dvojnim uvajalnim sistemom je njegova natančnost, medtem ko je prednost s spektrometra s kontinuiranim pretokom v lažji predpripravi vzorca in v številu analiziranih

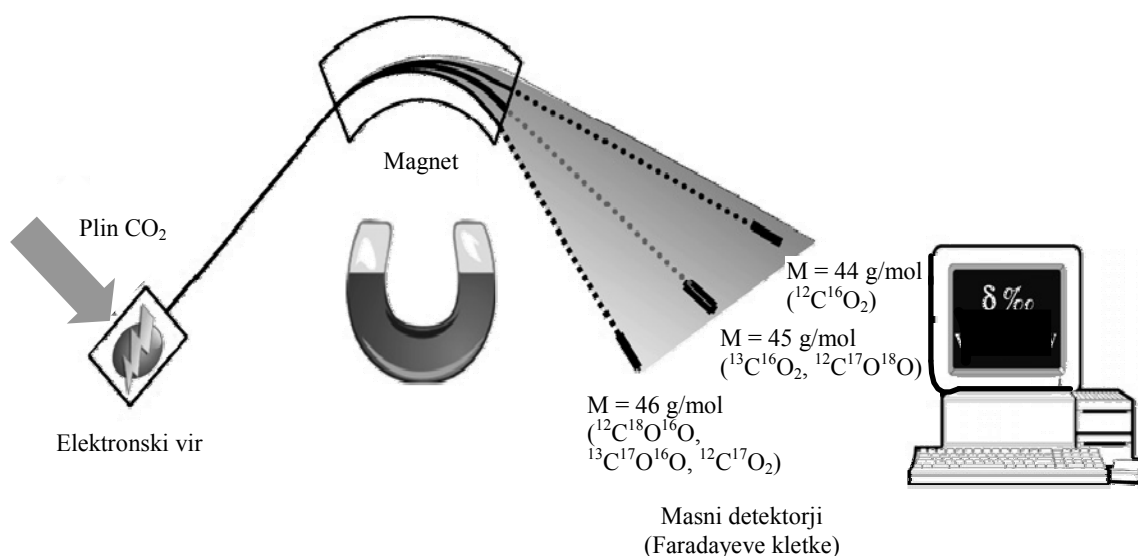
vzorcev. Pri naših meritvah smo uporabili oba masna spektrometra. Meritve izotopske sestave kisika smo izvedli na masnem spektrometru z dvojnimi uvajalnimi sistemi. Pri določitvi izotopske sestave ogljika pa smo uporabili masni spektrometer s kontinuiranim pretokom plina.

Izotopsko razmerje $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ se lahko izmeri na različne načine, kljub temu pa vse uradne metode temeljijo na ravnotežni metodi, ki sta jo prvič opisala Epstein in Mayeda leta 1953 (Epstein in Mayeda, 1953 cit. po Calderone in Guillou, 2008) in jo lahko predstavimo z naslednjo enačbo:



Ta klasična metoda se je skozi leta izboljševala in jo lahko danes uporabimo za merjenje vsebnosti stabilnega izotopa ^{18}O tudi v kompleksih matriksih, kakršni so tudi sadni sokovi in nektarji. Plin ogljikov dioksid (CO_2) se uporablja za izmenjavo izotopa ^{18}O z vodo v sadnih sokovih. Iz plinske kape se nato črpa preko hladne zanke, kjer se odstrani H_2O in morebiten etanol, čemur sledi uvajanje in analiza v masnem spektrometru za stabilne izotope (Calderone in Guillou, 2008; Kozić in sod., 1995).

Pri določanju razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pa je potreben sežig v krožečem toku čistega kisika, tako vzorcev pulpe in sladkorjev izoliranih iz sokov, kot tudi etanola, ki ga pridobimo z destilacijo fermentiranih sokov. Masni spektrometer je povezan z elementnim analizatorjem, kjer vzorec v toku čistega kisika sežgemo, nastalo plinsko mešanico pa ločimo na kromatografski koloni in pline enega za drugim uvajamo v ionski izvor. Pri tem je nujno zagotoviti popolno pretvorbo organskega ogljika v CO_2 z metodo, ki se izogne kakršnikoli izotopski frakcionaciji in omogoča zbiranje plina brez vsakršnih izgub. Za lovljenje sproščenega CO_2 se najpogosteje uporablja past s tekočim dušikom (Jamin in sod., 2004; Kozić in sod., 1993).



Slika 9: Princip delovanja sistema IRMS (Calderone in Guillou, 2008)

2.6.4 Princip določanja izotopskega razmerja $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ z metodo SNIF-NMR

Jedrska magnetna resonančna spektroskopija (NMR) je metoda, ki jo odlikuje velika selektivnost, nedestruktivnost ter zmožnost določevanja molekularnih struktur, čeprav je na drugi strani omejena z nizko občutljivostjo. Njena bistvena prednost pa je, da omogoča istočasno kvalitativno in kvantitativno določevanje številnih spojin, ki pripadajo različnim kemijskim skupinam brez dolgotrajne predhodne separacije. Posledica tega je poenostavitev analiznih postopkov in bistveno krajši čas potreben za izvedbo analize (Košir, 2005). Je tudi edina tehnika, ki omogoča ločevanje med različnimi izotopomerami.

NMR spektroskopijo lahko v analitiki kompleksnih prehranskih mešanic uporabljamo na različne načine. Uporabo lahko v grobem razdelimo na kvalitativno in kvantitativno. Pri kvalitativnem delu se izrabljajo predvsem možnosti, ki jih nudi za ugotavljanje molekulske strukture in s tem posledično identifikacijo posameznih spojin. Pri kvantitativnem delu pa jo lahko uporabljamo za določanje absolutne ali relativne vsebnosti posameznih spojin (Košir, 2005).

Bistvo SNIF-NMR (ang. Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance) metode, ki je ena izmed možnih aplikacij NMR, je določanje razmerja med devterijem (D) in vodikom (H) na specifičnih mestih molekule z devterijevo jedrsko magnetno resonanco.

Glede na relativno nizko koncentracijo devterija v naravi, je verjetnosti, da bi bila v molekuli etanola po dva ali več atomov devterija hkrati, zanemarljivo majhna. Zato se je smiselno omejiti le na izotopomere, ki vsebujejo samo po en atom devterija. V primeru etanola ločimo tri takšne izotopomere:

- $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$
- CH_3CHDOH
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$.

Ker je težko določiti intenziteto oziroma površino resonančnega signala z natančnostjo, ki je potreba za kvantitativno delo, zaradi izredno hitre izmenjave na $-\text{OH}$ mestu v etanolu z vodo, NMR spektroskopijo določujemo samo izotopska razmerja devterij/vodik na neizmenljivem metilnem in metilenskem mestu (Košir, 2001; Martin in sod., 1996a).

Sladkorje je pred meritvijo potrebno prevesti v etanol, ki mu potem določamo, kot je bilo že navedeno, razmerje D/H na metilni $(\text{D/H})_{\text{I}}$ in metilenski skupini $(\text{D/H})_{\text{II}}$. Ti parametri se izračunavajo s primerjanjem površine ^2H NMR signalov, I in II, z površino delavnega standarda, to je tetrametilurea (TMU). Vrednost razmerja intenzitet omenjenih signalov (R) pa lahko izračunamo z enačbo (Martin in sod., 1996a):

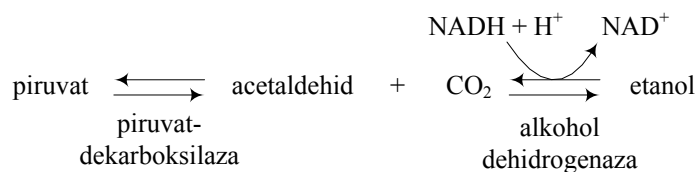
$$R = 2 \frac{(\text{D/H})_{\text{II}}}{(\text{D/H})_{\text{I}}} \quad \dots(5)$$

2.6.4.1 Alkoholna fermentacija in povezava med vrednostmi izotopskega razmerja D/H glukoze, vode in etanol

Fermentacija ali vrenje je razgradnja organskih spojin zaradi delovanja mikroorganizmov in njihovih encimov (Šafar in Snoj, 1973).

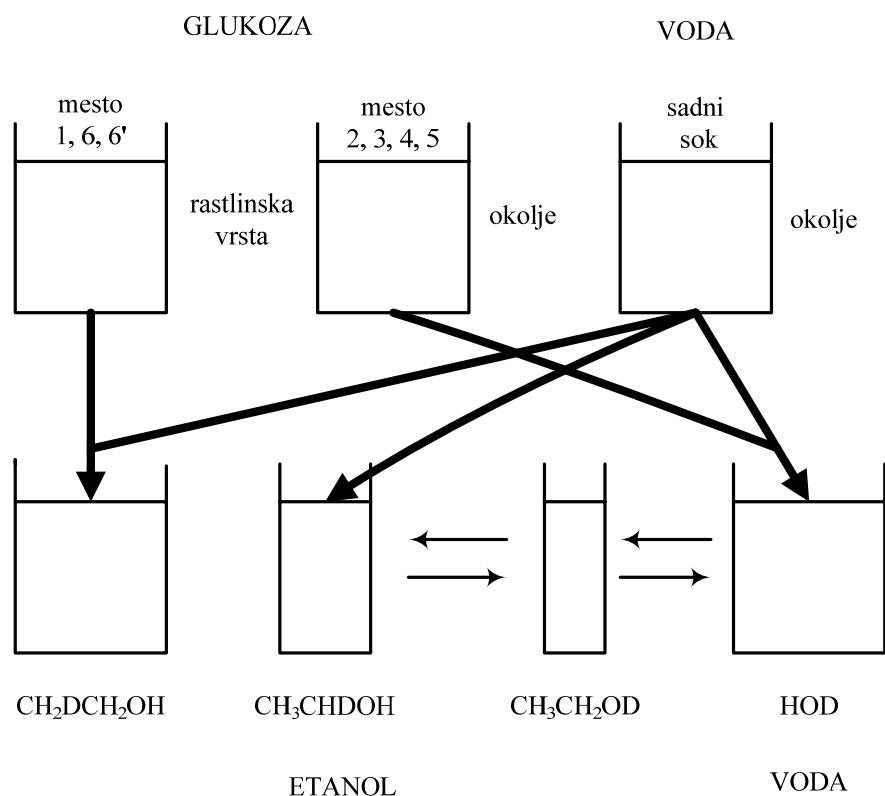
Glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnasova (EMP) pot ali pot heksoze fosfata) je glavna pot pretvorbe fruktoze in saharoze, katere končni produkt je piruvat. V proces glikolize pa ne vstopata le glukoza in fruktoza, temveč tudi drugi fermentabilni sladkorji, ki se v reakcijah, ki jih katalizirajo različni encimi, pretvarjajo v omenjena sladkorja, ki potem vstopata v glikolizo.

Procesu glikolize sledita še dve reakciji, ki ju poznamo pod imenom alkoholna fermentacija in pri katerih nastane etanol. Prvo reakcijo katalizira piruvat-dekarboksilaza, produkta le te pa sta acetaldehid in CO_2 . V drugi reakciji pa gre za redukcijo karbonilne skupine acetaldehida, ki jo katalizira alkohol dehidrogenaza in pri kateri nastane alkohol etanol (Boyer, 2005).



Slika 5: Reakcija alkoholne fermentacije (Boyer, 2005)

Proučevanje prenosa vodika med fermentacijo je pokazalo, da je razmerje D/H na metilnem mestu etanola približno 5-krat bolj odvisno od D/H vrednosti na neizmenljivih mestih v glukozi kot od razmerja D/H v začetni vodi. V nasprotju s tem pa je razmerje na metilenskem mestu etanola predvsem odvisno od D/H razmerja v vodi in ne toliko od glukoze. Iz opisanih povezav med D/H razmerji lahko dobimo informacije o tem, kako poteka prenos vodikovih atomov in stopnjo izotopske frakcionacije med procesi fermentacije (Košir, 2001)



Slika 10: Izotopski prenosi med glukozo in vodo iz soka ter njunima fermentacijskima produktoma etanolom in vodo (Košir, 2001)

Močan vpliv na D/H razmerje na metilnem mestu etanola ima torej izotopsko razmerje v glukozi. Metilno mesto etanola nastane med fermentacijo iz mesta 1, 6, ali 6' glukoze, katerega D/H razmerje je nižje glede na celokupno razmerje v glukozi. Med fermentacijo se ohranita prvotna glukozna vodikova atoma, vir tretjega pa je voda. Med reakcijami

poteka močna izotopska frakcionacija, ki se v končnem produktu izrazi kot znatno znižanje D/H razmerja glede na vstopne snovi (Košir, 2001).

V primeru metilenskega mesta pa vodikovi atomi izvirajo iz vodnega medija, iz katerega prehajajo v procesu dekarboksilacije piruvata in encimske redukcije acetaldehida. Tudi med tema procesoma je prisotna močna izotopska frakcionacija, kar se odraža v nižjem D/H razmerju v primerjavi z vodo (Košir, 2001).

2.6.5 Kombinacija IRMS in SNIF-NMR metod

Za popolno sliko o avtentičnosti oziroma potvorjenosti sokov je potrebna kombinacija IRMS in SNIF-NMR metod, kajti vsaka od teh metod daje specifične podatke.

Z določanjem $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti z metodo IRMS dobimo predvsem podatke o ciklu, kateremu rastlina pripada in torej ne omogoča razločevanja med rastlinami istega cikla. ^{13}C v glukozi je enakomerno porazdeljen in metoda za ugotavljanje izotopskega razmerja omogoča samo meritve celokupnega razmerja v molekuli, kar ima precej slabosti. Glede na dejstvo, da spadata sladkorna pesa in številne sadne rastline v isto skupino rastlin, ki uporabljajo C_3 cikel za pridobivanje sladkorjev, z meritvami $\delta^{13}\text{C}$ ne moremo določiti dosladkanja s pesnim sladkorjem. Lahko pa z omenjenimi meritvami ugotovimo dosladkanje s sladkorjem iz sladkornega trsa ali koruznim sirupom, saj rastlini pripadata skupini rastlin s C_4 ciklom ali z mešanico sladkorja sladkorne pese in sladkornega trsa. Za dosladkanje sokov se sicer najpogosteje uporablja sladkor pridobljen iz sladkorne pese, lahko pa tudi trsni sladkor ali katera druga vrsta (Dennis, 1997; Guček in sod., 1998; Jamin in sod., 2004; Ogrinc in sod., 2003). Nasprotno, pa lahko sadnim sokovom, ki izhajajo iz C_4 rastline na primer ananas, lahko z meritvami $\delta^{13}\text{C}$ dokažemo dosladkanje s pesnim sladkorjem, ki se tudi najbolj uporablja.

Z meritvami D/H razmerij na metilni in metilenski strani molekule etanola z devterijevo magnetno resonanco (SNIF-NMR) pa lahko razlikujemo tudi med sladkorji iz rastlin z istim biosinteznim ciklom pridobivanja sladkorjev (Ogrinc, 2002). Vsebnost devterija na teh dveh specifičnih mestih je namreč odvisna od vrste sladkorja, iz katerega je etanol nastal: naravnega sladkorja sadja, iz katerega je bil sok izdelan ali pa iz pesnega oziroma trsnega sladkorja (Martin in sod., 1996c; Košir, 2005). Martin in sodelavci (1996c) celo navajajo, da je vsebnost devterija na specifičnih mestih sladkornih molekul višja v sladkorjih iz sadja kot v pesnem sladkorju ter da je parameter $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ nižji, ko je v sok ali koncentrat dodan pesni sladkor.

V preglednici 4 je predstavljeno, kako dodajanje različnih sladkorjev vpliva na vrednosti $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$, $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ ter R.

Preglednica 4: Spremembe vrednosti $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ in R glede na naravo sladkorja, iz katerega je nastal etanol (Košir, 2001)

			Parametri		
			$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
Naravni sadni sok			→	→	→
Obogaten sadni sok	Sladkor rastlin C_3		↗	↗	↗
	Sladkor rastlin C_4		↗	↗	↘
Dodana voda			→	↘	↘

Pri dodatku pesnega sladkorja se vrednost $(D/H)_I$ zniža, vrednost $(D/H)_{II}$ in R pa se povečajo. V primeru dosladkanja s sladkorji rastlin s C_4 ciklom pa se zvišata vrednosti $(D/H)_I$ in $(D/H)_{II}$, medtem ko se vrednost razmerja R zniža (Košir, 2001). Dokazovanje nedovoljenih dodatkov pa postane oteženo v primeru, ko je za dosladkanje uporabljena mešanica sladkorjev C_3 in C_4 skupine (Ogrinc in sod., 2002). V takšnem primeru se poviša le razmerje $(D/H)_{II}$, medtem ko ostajata razmerji $(D/H)_I$ in R skoraj enaka (Košir, 2001). To dokazuje že v začetku zapisano dejstvo, da je potrebno meritve s SNIF-NMR dopolniti z rezultati meritev razmerja $^{13}C/^{12}C$ v etanolu z IRMS metodo, ki v tem primeru pokažejo zadostno razliko za potrditev dosladkanja.

S primerjavo izmerjenih vrednosti $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$, R in $\delta^{13}C$ v vzorcu z avtentičnimi vzorci, ki sestavljajo bazo podatkov za vsako leto posebej, lahko torej določimo dodatek pesnega ali trsnega sladkorja, koruznega sirupa ali mešanice sladkorjev, nastalih v C_3 in C_4 rastlinah, v avtentične sadne sokove (Ogrinc in sod. 2002; Košir in sod., 2001). Največji problem nastaja pri določitvi izotopskih parametrov avtentičnih vzorcev. Izotopska sestava ogljika se ne spreminja glede na geografsko poreklo v takem obsegu kot izotopska sestava kisika, zato se izotopski parametri sadnih sokov iz različnih geografskih območij med seboj tudi prekrivajo. Bazo podatkov avtentičnih vzorcev je potrebno vzdrževati vsako leto in jo po potrebi tudi dopolnjevati. Izotopska sestava se namreč ne spreminja samo na geografsko poreklo temveč je odvisna tudi od podnebnih razmer.

Da bi se izognili tem težavam, se v sadnem soku poleg sladkorja določi tudi $\delta^{13}C$ vrednosti v pulpi kot interni referenci. $\delta^{13}C$ vrednosti v sladkorju in pulpi v avtentičnem vzorcu morata biti enaki. Kljub temu pa obstajajo težave pri prevzemu pulpe kot ustrezne interne reference. Ker so posamezne frakcije v pulpi kompleksne, se lahko pri fizikalnih in kemijskih procesih njihova sestava in posledično tudi izotopska sestava spremeni. Obstaja tudi nekaj eksperimentalnih težav med čiščenjem pulpe (Rossman in sod., 1997). Poleg tega v bistrih sokovih in nekaterih koncentratih pulpe ni, tako da se v zadnjem času kot interno referenco uporabljajo proteini izolirani iz sadnih sokov (Jamin in sod., 1998). Kljub temu standardne analize, ki jih vključujejo tudi medlaboratorijski primerjalni testi vključujejo tudi meritve izotopske sestave ogljika v pulpi.

Z meritvami $\delta^{18}\text{O}$ v vodi z IRMS pa lahko določimo potvorbe sokov z vodo. Poznamo številne vplive, ki povzročajo variacije v vrednostih $\delta^{18}\text{O}$. Največji vpliv ima zagotovo rastlinam dostopna voda, sledijo pa še klimatske razmere na področju, kjer rastlina raste, evo-transpiracijski efekt listov in plodov in drugi (Rossmann in sod., 1999).

Še več. Glede na prenose vodika med fermentacijo, opisane pod točko 2.6.4.1, lahko s primerjanjem vrednosti $(\text{D/H})_{\text{II}}$ in $\delta^{18}\text{O}$ sklepamo tudi na geografsko poreklo sadnega soka (Versini in sod., 1997).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 VZOREC

Da bi potrdili hipotezo o določanju potvorjenosti sadnih sokov, smo najprej izvedli dva ločena poizkusa s 100 % jabolčnim sokom, ki je najbolj zastopan na slovenskem tržišču, v katerega smo ločeno dodajali vodo in sladkor. Opazovali smo spreminjanje izotopske sestave ogljika $\delta^{13}\text{C}$ sladkorjev izoliranih iz sadnega soka in spreminjanje izotopske sestave kisika $\delta^{18}\text{O}$ v vodi z masno spektrometrijo (Isotope Ratio Mass Spectrometry – IRMS). Sledila je raziskava komercialnih slovenskih in ciprskih sadnih sokov. Poleg omenjenih parametrov, smo vzorcem, iz katerih smo lahko izločili pulpo, določili še izotopsko sestavo ogljika $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi. Nato so bili vzorci fermentirani, destilirani, temu pa je sledila določitev izotopske sestave ogljika $\delta^{13}\text{C}$ v etanolu z metodo IRMS ter vodika (D/H) v etanolu z devterijevo NMR spektroskopijo (Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance - SNIF-NMR). Analizirana je bila tudi vsebnost posameznih sladkorjev v sokovih oz. nektarjih z metodo HPLC.

V ločenih poskusih smo v 100 % jabolčni sok v prvem poskusu dodajali različne vrste in količine sladkorjev (pesni, trsni ter mešanico pesnega in trsnega sladkorja enkrat v razmerju 50:50, drugič pa v razmerju 70:30). V drugem poskusu pa smo soku dodajali različne volumne vode z različnim geografskim poreklom in različno izotopsko sestavo kisika $\delta^{18}\text{O}$ (ajdovsko vodo in vodo z Instituta Jožef Stefan v Podgorici). Prvič smo merili spreminjanje izotopske sestave ogljika $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih, drugič pa kisika $\delta^{18}\text{O}$ v vodi z metodo IRMS.

Raziskavo komercialnih sokov smo izvedli na 29 vzorcih sokov in nektarjev, od katerih je bilo 5 sokov in 5 nektarjev iz Slovenije, 18 sokov in 1 nektar pa s Cipra. Ciprske vzorce smo izbrali zaradi različnega tržišča in podnebnih značilnosti, predvsem pa zato, ker je to diplomsko delo del mednarodnega, bilateralnega projekta med Ciprom in Slovenijo. Vzorec za analizo je predstavljal pomarančne sokove ter jabolčne sokove in nektarje iz obeh držav, poleg tega pa še sokove in nektar iz grenivke ter ananasove sokove s Cipra. Oznake vzorcev in njihov izvor je predstavljen v preglednici 5. V sokovih in nektarjih je bila najprej izmerjena vsebnost sladkorjev z metodo HPLC. Nato smo določili $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih izoliranih iz sadnih sokov in, kjer je bilo mogoče, tudi v pulpi ter $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi z metodo IRMS. Vzorci so bili nato fermentirani in destilirani. V etanolu, ki smo ga dobili po destilaciji, smo določili izotopsko sestavo ogljika $\delta^{13}\text{C}$ z metodo IRMS ter vodika (D/H) z metodo SNIF-NMR. Zaradi primerjave s komercialnimi sokovi smo pripravili tudi sokove iz svežih pomaranč in grenivk. Tudi te vzorce smo fermentirali in destilirali. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in NMR parametre smo določili le v etanolu.

Preglednica 5: Vrsta, tip in izvor soka oz. nektarja in oznake analiziranih komercialnih vzorcev

Vrsta soka	Tip soka	Izvor	Oznake komercialnih vzorcev
pomarančni	sok	Ciper	Psc1 – Psc7
		Slovenija	Pss8 – Pss9
jabolčni	sok	Ciper	Jsc1 – Jsc4
		Slovenija	Jss5 – Jss7
	nektar	Slovenija	Jns8 – Jns12
grenivkin	sok	Ciper	Gsc1 – Gsc5
	nektar	Ciper	Gnc6
ananasov	sok	Ciper	Asc1 – Asc3

3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE METODE

3.2.1 Priprava in analiza poskusa z dodajanjem sladkorja in vode jabolčnemu soku

3.2.1.1 Priprava vzorcev jabolčnega soka z dodanim sladkorjem

Pribor:

- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce (liquid, HAMILTON 75, V = 5 ml),
- plastične centrifugirke,
- terilnica,
- kovinska žlica,
- tehtnica,
- ladjice za tehtanje.

Priprava vzorcev:

Oznaka vzorcev, volumen soka in dodana količina posameznega sladkorja ali mešanice je predstavljena v preglednici 6.

Preglednica 6: Oznaka vzorcev, volumen soka in količina dodanega sladkorja ali njune mešanice v 100 % jabolčni sok

Oznaka vzorca – poskus dodajanja sladkorja	V _{sok} (ml)	Dodatek sladkorja m _{sladk.} (g)
PS1	10	0,04
PS2	10	0,10
PS3	10	0,50
PS4	10	1,00
TS1	10	0,04
TS2	10	0,10
TS3	10	0,50
TS4	10	1,00
PT1	10	0,04
PT2	10	0,10
PT3	10	0,50
PT4	10	1,00
TP1	10	0,04
TP2	10	0,10
TP3	10	0,50
TP4	10	1,00

V vzorce z oznako PS je bil dodan komercialni pesni sladkor, v vzorce z oznako TS pa komercialni trsni sladkor. Za vzorce PT smo pripravili zmes pesnega in trsnega sladkorja v razmerju 50:50, medtem ko je bilo razmerje trsnega in pesnega sladkorja dodanega v vzorce z oznako TP 30:70.

Vzorci smo nato dobro premešali, da se je sladkor popolnoma raztopil. Sledila je analiza opisana pod točko 3.2.1.2.

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

Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika v izoliranem sladkorju. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo δ v ‰, $\delta^{13}\text{C}$, definiranega z enačbo (1).

Reagenti:

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

Aparatura in pribor:

- termoblok (Termoproc TBGE),
- centrifuga (Centric 322A),
- kalibrirani brizgalki za tekoče vzorce (liquid, HAMILTON 75, $V = 1000 \mu\text{l}$ in $V = 5 \mu\text{l}$),
- plastične posodice ($V = 10 \text{ ml}$),
- kositrove kapsule dimenzije $\phi = 4/6 \text{ mm}$ (PDZ Europa Ltd),
- absorbent (Chromosorb W 30-60 mesh; PDZ Europa Ltd),
- pinceta za zatiskanje kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce.

Izvedba analize:

- Analiza je bila opravljena na vzorcih, ki smo jih pripravili po postopku opisanem pod točko 3.2.1.1. Najprej smo iz vzorcev očistili topne snovi z dodatkom približno 200 mg kalcijevega hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), pri čemer smo vse skupaj mešali in 3 minute segrevali v vodni kopeli pri temperaturi 90°C . Organske kisline, aminokisline in druge sestavine se v tej fazi postopka oborijo. Oborino s centrifugiranjem (3 min, 3000 obr./min) ločimo iz vroče raztopine.
- Nato 4 ml čistega supernatanta odpipetiramo v plastične posodice in dodamo 1 M žvepleno kislino do $\text{pH} \approx 5$ oziroma do spremembe barve raztopine v rumeno. Ta raztopina vsebuje predvsem sladkorje in kalcijev sulfat ter majhno količina barvil. Preostali kalcijev sulfat, ki se izobori, potem delno odstranimo tako, da hranimo raztopino čez noč v hladilniku pri približno 4°C . Vzorec nad oborino vsebuje sladkorje in je tako pripravljen za analizo.

- Pred merjenjem je v kositrove kapsule potrebno dodati absorbent (≈ 1 mg). Na njega nanese 6 μ l vzorca, ki vsebuje izolirane sladkorje iz sadnega soka. Kapsule previdno zatisnemo s pinceto. Sledi merjenje na masnem spektrometru.
- Pred merjenjem vzorcev je potrebno pripraviti tudi ustrezne standarde. Standarde pripravimo podobno kot vzorec. Za merjenje uporabljamo laboratorijski standard ureaC. 3 μ l standarda ureaC nanese na absorbent v kapsulah. Izotopsko sestavo standarda, ki znaša $-30,6 \pm 0,2$ ‰, je potrebno določiti na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev. Poleg laboratorijskega standarda je potrebno za spremljanje kvalitete meritev pripraviti še referenčne standarde IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6 s sledečimi $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi $-29,7 \pm 0,2$ ‰, $-31,8 \pm 0,2$ ‰ in $-10,4 \pm 0,2$ ‰. Napaka meritev znaša 0,2 ‰.

3.2.1.3 Priprava vzorcev z dodano vodo

Pribor:

- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce (liquid, HAMILTON 75, V = 5 ml),
- plastične centrifugirke.

Priprava vzorcev:

Oznaka vzorcev, volumen soka in dodana količina posamezne vode je predstavljena v preglednici 7.

Preglednica 7: Oznaka vzorcev, volumen soka in količina dodane vode iz posameznega območja Slovenije v 100 % jabolčni sok

Oznaka vzorca – poskus dodajanja vode	V _{sok} (ml)	V _{voda} (ml)
H0	20	0
H4	16	4
H6	14	6
H8	12	8
H10	10	10
I0	20	0
I4	16	4
I6	14	6
I8	12	8
I10	10	10

V vzorce z oznako H je bila dodana voda iz Ajdovščine, v vzorce z oznako I pa z Instituta Jožef Stefan v Podgorici.

3.2.1.4 Določanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti vode v jabolčnem soku z metodo IRMS

Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa kisika v vodi. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo δ v ‰, $\delta^{18}\text{O}$, definiranega z enačbo (1).

Reagenti:

- laboratorijski standard – vodovodna voda,
- jeklenka CO_2 za prepihovanje.

Aparatura in pribor:

- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce (liquid, HAMILTON 75, $V = 1000\text{ ml}$),
- posebne steklene vial, ki so prilagojene za merjenje izotopske sestave kisika, v termostatisirani posodi,
- masni spektrometer Varian Mat 250 z dvojnimi uvajalnimi sistemi.

Izvedba analize:

2 ml vsakega vzorca, ki smo ga pripravili po postopku opisanem pod točko 3.2.1.3, odpipetiramo v steklene vial, povežemo z ekvilibracijsko linijo v termostatisirani posodi in avtomatično prepihujemo s CO_2 . Določanje izotopske sestave kisika v vodi temelji na izmenjavi izotopov kisika med vodo in CO_2 pri temperaturi $21\text{ }^\circ\text{C}$. Meritve izvedemo na masnem spektrometru. Pri meritvah uporabljamo standard vodovodno vodo z $\delta^{18}\text{O}$ vrednostjo $-9,45 \pm 0,06\text{ ‰}$. Napaka meritev znaša $0,1\text{ ‰}$.

3.2.2 Analiza slovenskih in ciprskih sadnih sokov in nektarjev

Na izbranih vzorcih sadnih sokov in nektarjev so bile opravljene naslednje analize:

- določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze z metodo HPLC,
- Analize so bile opravljene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu.
- določitev izotopske sestave ogljika, $\delta^{13}\text{C}$, sladkorjev in pulpe v sokovih in nektarjih z metodo IRMS,
- določitev izotopskega sestave kisika, $\delta^{18}\text{O}$, v vodi prav tako z metodo IRMS,
- določitev izotopskega sestave ogljika, $\delta^{13}\text{C}$, v etanolu z metodo IRMS in
- določitev izotopskega razmerja vodika (D/H) v etanolu z metodo SNIF-NMR.

Meritve so bile opravljene v Državnem centralnem laboratoriju Ministrstva za zdravje na Cipru.

3.2.2.1 Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze z metodo HPLC

Analiza vsebnosti sladkorjev z metodo HPLC je bila opravljena na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu.

Princip:

Metoda temelji na določanju vsebnosti sladkorjev v sadnih sokovih in nektarjih s pomočjo ionske izmenjalne kromatografije in refraktometričnega detektorja. Določimo monosaharida glukozo in fruktozo ter skupaj vse disaharide (DP2 oz. saharoza, maltoza) in vse trisaharide (DP3 oz. maltotrioza). Vzorce razredčimo z demineralizirano vodo in prefiltriramo. Tako pripravljen vzorec injiciramo v tekočinski kromatograf. Vsebnost sladkorjev določimo primerjalno glede na standard, ki vsebuje fruktozo, glukozo in maltozo. Vsebnost trisaharidov (maltotrioze) pa izračunamo s primerjavo s standardom za disaharide (maltoza).

Reagenti:

- D(+)-glukoza, $C_6H_{12}O_6$,
- D(-)-fruktoza, $C_6H_{12}O_6$,
- maltoza monohidrat, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$,
- 96 % žveplova (VI) kislina,
- metanol, CH_3OH , $\rho = 0,79$ g/ml.

Aparature in pribor:

- nosilec za membranski filter,
- membranski filtri ($\Phi = 13$ mm, $0,45$ μm , nitroceluloza, MILLIPORE, kat. št. HAWP01300),
- membranski filter ($\Phi = 47$ mm, $0,20$ μm),
- plastična injekcijska brizga, $V = 10$ ml,
- sistem za filtracijo mobilne faze, SARTORIUS,
- merilne bučke, $V = 50, 100, 500$ ml,
- merilni valj, $V = 1000$ ml,
- epruveta z obrisom s steklenim zamaškom, $V \approx 10$ ml,
- polnilna pipeta, $V = 5$ ml,
- merilna pipeta, $V = 10$ ml,
- siringa, $V = 100$ μl ,
- jeklenka helija,
- analitska tehtnica s točnostjo $\pm 0,0005$ g,
- HPLC črpalka (HP 1050),
- refraktometrični detektor (HP 1047A),
- analitska kolona AMINEX HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, kat. št. 125-0140,
- predkolona KATION H^+ , kat. št. 125-0129,
- injekcijska zanka, $V = 10$ μl ,
- integrator HP 3390A.

Izvedba analize:

- Pred začetkom analize so bili vzorci temperirani na sobno temperaturo.
- 5 ml vzorca je bilo odpipetirano v 50 ml merilno bučko in z demineralizirano vodo dopolnjeno do oznake. Raztopina je bila nato potisnjena skozi 0,45 m filter. Prvih 5 ml je bilo zavrženo, nato pa mililiter ali dva natočeno v 10 ml epruveto in zadržano za kromatografsko analizo. Raztopino je bilo potrebno injicirati v kromatograf še isti dan.
- Pred samo analizo je bilo potrebno izvesti še zahtevno pripravo in kalibracijo HPLC sistema ter pripravo mobilno fazo. Ko je bilo vse to pripravljeno, se je lahko pričelo z izvajanjem analize. Standardno raztopino je bilo potrebno injicirati trikrat. Enkrat na začetku, enkrat med vzorci in enkrat na koncu same analize. Pri končnem izračunu pa je bilo potem potrebno upoštevati povprečje vseh treh analiz standardne raztopine.
- Vzorce so bili injicirani po enkrat. V idealnih razmerah so retenzijski časi za maltozo oz. DP2 20 minut, glukozo 24 in fruktozo 26 minut, vendar se ti časi podaljšujejo z dolgotrajno uporabo kolone. Retenzijski časi pa so poleg stanja kolone odvisni tudi od pretoka.

Izračun:

- a) Ročni izračun
- Izračun masnih koncentracij v standardni raztopini

$$\begin{aligned}c_{1st} &= m_1 / V_1 \\c_{2st} &= m_2 / V_1 \\c_{3st} &= m_3 * k / V_1\end{aligned}$$

c_{1st} ... masna koncentracija fruktoze v standardni raztopini ((g/100 ml)

c_{2st} ... masna koncentracija glukoze v standardni raztopini (g/100 ml)

c_{3st} ... masna koncentracija maltoze v standardni raztopini (g/ 100 ml)

m_1 ... odtehta fruktoze (g)

m_2 ... odtehta glukoze (g)

m_3 ... odtehta maltoze (g)

V_1 ... prostornina standardne raztopine (100 ml)

k ... stehiometrijski faktor (maltoza/maltoza monohidrat = 0,950)

- Izračun faktorjev odzivnosti

$$\begin{aligned}r_1 &= A_{1st} / c_{1st} \\r_2 &= A_{2st} / c_{2st} \\r_3 &= A_{3st} / c_{3st}\end{aligned}$$

r_1 ... faktor odzivnosti za fruktozo

r_2 ... faktor odzivnosti za glukozo

r_3 ... faktor odzivnosti za maltozo

A_{1st} ... povprečje ploščin kromatografskega vrha fruktoze v standardni raztopini (v 1000 enotah) – iz treh injiciranj

A_{2st} ... povprečje ploščin kromatografskega vrha glukoze v standardni raztopini (v 1000 enotah) – iz treh injiciranj

A_{3st} ... povprečje ploščin kromatografskega vrha maltoze v standardni raztopini (v 1000 enotah) – iz treh injiciranj

Ker je maltotrioza hidroskopična, njen faktor odzivnosti izračunamo iz faktorja odzivnosti za maltozo.

$$r_4 = 1,03 * r_3$$

r_4 ... faktor odzivnosti za maltotrioza

- Izračun vsebnosti posameznih sladkorjev

Vsebnost posameznega sladkorja izračunamo kot količnik med ploščino kromatografskega vrha in faktorjem odzivnosti. Pri tem upoštevamo še razredčitveni faktor 10.

$$c_1 = A_1 / r_1$$

$$c_2 = A_2 / r_2$$

$$c_3 = A_3 / r_3$$

$$c_4 = A_4 / r_4$$

c_1 ... masna koncentracija fruktoze v vzorcu (g/100 ml)

c_2 ... masna koncentracija glukoze v vzorcu (g/100 ml)

c_3 ... masna koncentracija disaharidov (DP2) v vzorcu (g/100 ml)

c_4 ... masna koncentracija trisaharidov (DP3) v vzorcu (g/100 ml)

A_1 ... ploščina kromatografskega vrha fruktoze v standardni raztopini (v 1000 enotah)

A_2 ... ploščina kromatografskega vrha glukoze v standardni raztopini (v 1000 enotah)

A_3 ... ploščina kromatografskega vrha DP2 v standardni raztopini (v 1000 enotah)

A_4 ... ploščina kromatografskega vrha DP3 v standardni raztopini (v 1000 enotah)

Rezultate podajamo v gramih na 100 ml, in sicer kot masno koncentracijo fruktoze, glukoze, disaharidov in trisaharidov.

b) Izračun s programom LAB

Z uporabo programa LAB, lahko izračunamo vsebnost sladkorjev v vzorcu iz podatkov o ploščinah kromatografskih vrhov in masah zatehtanih standardov.

3.2.2.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v komercialnih sokovih in nektarjih z metodo IRMS

Princip:

Princip izolacije sladkorjev in meritve izotopske sestave ogljika v sladkorjih je že opisan pod točko 3.2.1.2. Preden izoliramo sladkor, moramo v sadnih sokovih, ki vsebujejo pulpo, pulpo ločiti od sadnega soka.

Izvedba analize:

50 ml vsakega vzorca nalijemo v plastične centrifugirke. Netopne sestavine ali pulpo iz soka ali nektarja odstranimo s 5 minutnim centrifugiranjem pri 3000 obr./min. Pulpo shranimo, supernatant pa odlijemo in uporabimo za izolacijo sladkorja v vzorcu. Izvedba analize je opisana pod točko 3.2.1.2.

3.2.2.3 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi komercialnih sokov in nektarjev z metodo IRMS

Princip:

Metoda temelji na enakem principu kot določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorja, ki je opisan pod točko 3.2.1.2.

Reagenti:

- destilirana voda,
- aceton,
- interni, laboratorijski standard: ureaC,
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6.

Aparatura in pribor:

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

Izvedba analize:

- Ločba pulpe iz soka oz. nektarja je opisana pod točko 3.2.2.2 v izvedbi analize. Pulpi ponovno dodamo vodo (25 ml) in dobro premešamo. Sledi centrifugiranje (5 min, 3000 obr./min), nato supernatant odlijemo. Ponovimo spiranje z vodo in centrifugiranje. Sledi spiranje z acetonom in centrifugiranje (2 min, 3000 obr./min). Tudi to spiranje in centrifugiranje ponovimo. Oborino osušimo na zraku.
- Pri tem postopku uporabimo vodo za odstranjevanje prostih sladkorjev in aceton za odstranjevanje lipidov iz pulpe. Po vsakem centrifugiranju je potrebno dobro

premešati pulpo in topljence, da pripravimo čist vzorec pulpe. Sladkorje je treba z vodo popolnoma odstraniti, da se izognemo težavam pri ekstrakciji lipidov z vodo in pri sušenju vzorcev. Nepopolna ekstrakcija lipidov povzroči precejšnje napake v vsebnosti ^{13}C v pulpi. Postopek obdelave vzorca pulpe z vodo in acetonom lahko ponovimo še tretjič, če je prisotna večja količina sladkorjev in karotenov.

- Tik pred merjenjem pripravimo kositrove kapsule ($\phi = 4/6$ mm), v katere s pinceto prenesemo košček pulpe posameznega vzorca, kapsule zatisnemo s pinceto in vzorce izmerimo v masnem spektrometru.
- Postopek meritve in uporaba standardov je enaka kot pri določitvi $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih in je opisana pod točko 3.2.1.2.

3.2.2.4 Določanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi komercialnih sokov in nektarjev z metodo IRMS

V komercialnih sokovih in nektarjih smo $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti določili po metodi, ki je opisana pod točko 3.1.1.4.

3.2.2.5 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v etanolu z metodo IRMS

Pred meritvami je potrebno sok fermentirati in destilirati. Fermentacijo in destilacijo so izvedli v Državnem centralnem laboratoriju Ministrstva za zdravje na Cipru.

Reagenti:

- kvasovke *Zymasil Bayanus* (Pascal Biotech).

Aparature:

- inkubator za fermentacijo,
- cliniterst® (Bayer) za kontrolo fermentacije,
- ADCS (Eurofinis) sistem za destilacijo etanola,
- Karl-Fischer (Metrhom) aparatura za merjenje vsebnosti vode v destilatih,
- DMA-5000 za merjenje alkoholne stopnje.

Postopek:

Pri fermentaciji so uporabili kvasovke *Zymasil Bayanus* (Pascal Biotech), ki so se izkazale za najboljše. Fermentacija je potekala v inkubatorju pri konstantni temperaturi. Potek fermentacije sladkorjev v alkohol so spremljali z uporabo Clinitest® (Bayer). Fermentacijo, ki je trajala 3 do 4 dni, so zaključili, ko je bila koncentracija sladkorja $\leq 2,5$ g/l. Tako pripravljene vzorce so nadalje destilirali na Bulloiovem ultratermostatičnem destilacijskem aparatu (ADCS – EUROFINS). Pridobljen destilat mora po standardni metodologiji in iz nje izhajajočih zahtev vsebovati najmanj 92 masnih % etanola, pri čemer mora biti med destilacijo zagotovljen 98 % kvantitativni prenos etanola iz vzorca v destilat, da se izognemo izotopski frakcionaciji. Vsebnost vode so spremljali tekom destilacije z

Karl-Fischerjevo aparaturo. V tako pripravljenih vzorcih etanola smo nato izmerili $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti.

Princip določanja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti:

Metoda temelji na enakem principu kot metodi za določanje izotopskega razmerja ogljika $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih in v pulpi in je opisan pod točko 3.2.1.2.

Reagenti:

- standard BCR-656.

Aparatura in pribor:

- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce (liquid, HAMILTON 75, $V = 3\ \mu\text{l}$),
- pinceta za zatiskanje kositrovih kapsul,
- absorbent (Chromosorb W 30-60 mesh; PDZ Europa Ltd),
- kositrove kapsule dvojnih dimenzij ($\phi = 4/6\ \text{mm}$, $\phi = 8/5\ \text{mm}$; PDZ Europa Ltd),
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 s preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce ANCA-SL.

Izvedba analize:

- Za te meritve uporabljamo certificirani referenčni material BCR-656 (Isotope ratio in absolute alcohol (in 96 % ethanol)) z znano izotopsko sestavo ($\delta^{13}\text{C} = -26,91\ \text{‰}$). Pripravimo ga tako, da v kositrove kapsule ($\phi = 4/6\ \text{mm}$), kjer je absorbent ($\approx 1\ \text{mg}$), nanasemo $1,0\ \mu\text{l}$ alkohola. Tako pripravljen standardni referenčni alkohol nato damo v večje kapsule ($\phi = 8/5\ \text{mm}$), da zmanjšamo izhlapevanje. Standarde pripravimo sproti, tik preden jih damo v avtomatični vzorčevalnik.
- Vzorce etanola pripravimo tako, da vnesemo v kositrove kapsule ($\phi = 4/6\ \text{mm}$), kjer je $\approx 1\ \text{mg}$ absorbenta, $1,0\ \text{ml}$ alkohola. Tako pripravljene vzorce nato damo v večje kapsule ($\phi = 8/5\ \text{mm}$), da zmanjšamo izhlapevanje. Tudi vzorce moramo pripravljati sproti, tik preden jih damo v avtomatični vzorčevalnik, da preprečimo izhlapevanje.
- Meritve izotopske sestave ogljika v etanolu določimo z masnim spektrometrom Europa Scientific 20-20 s preparativnim nastavkom za tekoče in trdne vzorce ANCA-SL.

3.2.2.6 Določanje izotopskega razmerja vodika (D/H) v etanolu z metodo SNIF-NMR

Princip:

Z metodo SNIF-NMR merimo razmerja med devterijem in vodikom (D/H) na specifičnih mestih v molekuli etanola, zato morajo biti vzorci predhodno fermentirani pod kontroliranimi pogoji, nastali etanol pa predestiliran. Razmerje (D/H) je lahko merjeno na metilnem (D/H)_I ali metilenskem mestu molekule etanola (D/H)_{II}. Za izračun interne porazdelitve v molekuli etanola uporabljamo relativni parameter R, ki je definiran z enačbo (5). Postopek fermentacije in destilacije je opisan pod točko 3.2.2.4. SNIF-NMR meritve so bile izvedene v Državnem centralnem laboratoriju Ministrstva za zdravje na Cipru z Bruker 400 MHz NMR spektrometerom za snemanje NMR spektra, ki uporablja X-WIN NMR 3.1 programsko opremo za obdelavo spektra in EUROSPEC programsko opremo za preračunavanja. Razmerja (D/H)_I and (D/H)_{II} so podani v ppm, napaka meritev je manjša od 0,5 %.

3.2.3 Analiza sveže iztisnjenih vzorcev citrusov

V Državnem centralnem laboratoriju Ministrstva za zdravje na Cipru so pripravili sokove iz svežih pomaranč, grenivk in mandarin. Vzorce so nato fermentirali in etanol predestilirali po postopku opisanem pod točko 3.2.2.4. V etanolu so po postopku opisanem pod točko 3.2.2.5 določili razmerji (D/H)_I ali (D/H)_{II} ter $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti z metodo opisano pod točko 3.2.2.4.

3.3 ANALIZA POVEZANOSTI DVEH SPREMENLJIVK

Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk (x in y) se uporabljata metodi korelacije in regresije. Z njuno uporabo želimo izvedeti, ali med spremenljivkama obstaja povezanost in kakšne vrste je, včasih pa raziskujemo povezanost v upanju, da bomo lahko iz vrednosti ene spremenljivke napovedali vrednost druge (Adamič, 1989).

O regresiji govorimo, kadar imamo neodvisno spremenljivko (x), katere vrednost izberemo sami in je naprej določena, ter drugo spremenljivko, ki je od prve odvisna in jo opisuje matematična funkcija $y = f(x)$. Regresijsko analizo je moč predstaviti v grafični obliki. Najpreprostejša, a hkrati najbolj zaželena, je linearna funkcija, kar pomeni, da je zveza dveh spremenljivk podana z enačbo premice. Enačba regresijske premice pa predstavlja nekoliko spremenjeno enačbo premice (1). Dobimo jo z metodo najmanjših kvadratov. Za tako premico je značilno, da je vsota odklonov posameznih točk od nje manjša kot od katerekoli druge možne premice. Kako dobro se posamezne vrednosti parametrov skladajo z enačbo premice, nam pove koeficient determinacije (r^2) (Adamič, 1989).

$$y = a + bx = y + b(x - x) \quad \dots(9)$$

Korelacija je prav tako metoda za statistično analizo dveh spremenljivk, od katere pa nobene ne izberemo sami vnaprej, zato ne moremo govoriti o odvisnosti ene od druge, ampak le o njuni medsebojni povezanosti. Za analizo te povezanosti uporabljamo metodo korelacije. Korelacija je lahko negativna ali pozitivna, velika ali majhna, ali pa sploh ne obstaja. Opisujejo jo različni koeficienti korelacije (Adamič, 1989).

Koeficient korelacije (r) je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge. R lahko zasede vrednosti med -1 in 1 . Pozitivne vrednosti koeficienta pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, medtem ko vrednost druge pada. Vrednost -1 predstavlja maksimalno negativno korelacijo, vrednost $+1$ maksimalno pozitivno in vrednost 0 nam pove, da med spremenljivkama ni povezanosti (Adamič, 1989). Vrednost korelacijskega koeficienta v primeru linearne regresije izračunamo kot kvadratni koren koeficienta determinacije.

Analizo dveh spremenljivk zatorej naredimo v naslednjem zaporedju:

- Podatke vnesemo v korelacijski diagram, v katerem na abscisni osi predstavimo neodvisno spremenljivko (x), na ordinatno pa odvisno spremenljivko (y).
- Nadaljujemo z metodo regresije, katere namen je določiti enačbo krivulje, ki se najbolje prilega podatkom dveh spremenljivk, prikazanih na korelacijskem diagramu. Pri tem si pomagamo z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2003, ki na osnovi najmanjše vsote kvadratov odklonov posameznih točk izračuna regresijsko enačbo premice ter koeficient determinacije (r^2).
- Ker gre v vseh primerih za linearno regresijo, vrednost korelacijskega koeficienta (r) izračunamo kot kvadratni koren koeficienta determinacije.
- Za presojanje moči povezanosti uporabimo preglednico 8.

Preglednica 8: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996)

Vrednost korelacijskega koeficienta	Stopnja povezanosti
od $\pm 0,00$ do $\pm 0,20$	povezanosti ni
nad $\pm 0,20$ do $\pm 0,40$	šibka povezanost
nad $\pm 0,40$ do $\pm 0,70$	zmerna povezanost
nad $\pm 0,70$ do $\pm 1,00$	močna povezanost

3.4 GRAFIČNI PRIKAZ – OKVIR Z ROČAJI

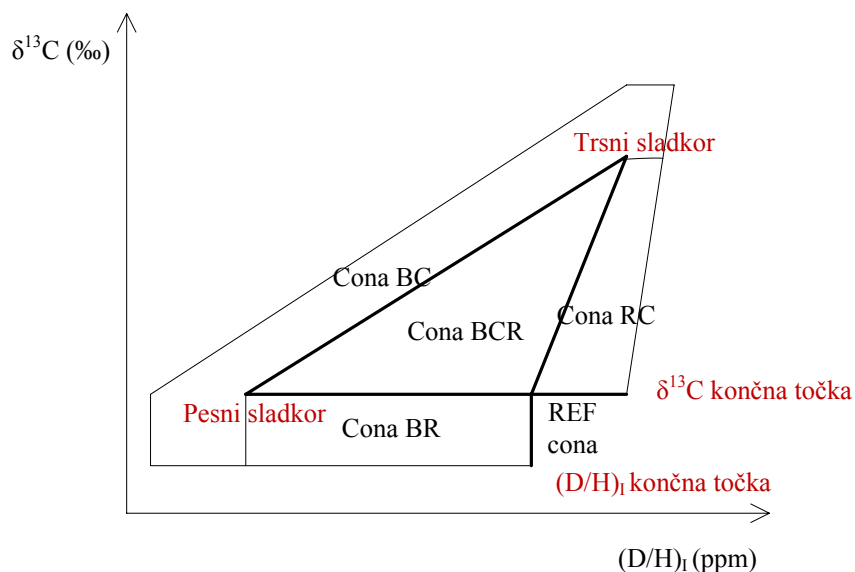
Okvir z ročaji (angl. box and whiskers plot) je zelo ilustrativen grafični prikaz podatkov številske spremenljivke. Slika namreč prikazuje pogojni minimum in pogojni maksimum, kvartile ter osamelce (Košmelj, 2001)

Osamelec je vrednost, ki bistveno odstopa od večine ostalih vrednosti. Kot osamelca opredelimo vrednost, ki je izven intervala ($Q1 - 1,5*Q$, $Q3 + 1,5*Q$), pri čemer je Q kvartilni razmik. Ekstremni osamelec pa je osamelec, ki je izven intervala ($Q1 - 3*Q$, $Q3 + 3*Q$). Pogojni minimum (min^*) je najmanjša vrednost, ki ni spodnji osamelec. Pogojni maksimum (max^*) pa je največja vrednost, ki ni zgornji osamelec. Običajno osamelca prikažemo s krožcem ($^{\circ}$), ekstremnega osamelca pa z zvezdico. Če v podatkih osamelcev ni, je pogojni minimum oz. pogojni maksimum najmanjša oz. največja vrednost (Košmelj, 2001).

Okvir z ročaji določa 5 točk: min^* , $Q1$, $Q2$, $Q3$ ter max^* . Spodnji ročaj določata vrednosti min^* in $Q1$, zgornji ročaj pa max^* in $Q3$. Okvir določata kvartila $Q1$ in $Q3$, njegovo prečko pa $Q2$ oz. mediana (Košmelj, 2001). To je vrednost, od katere je 50 % vrednosti večjih in 50 % manjših. Dolžina okvirja je enaka kvartilnemu razmiku, širina okvira nima pomena.

3.5 TRIKOTNIK POTVORB

Za ugotavljanje potvorjenosti lahko s pomočjo programa Microsoft Office Excel narišemo trikotnik potvorjenosti, v katerega vnesemo vrednosti $\delta^{13}C$ in $(D/H)_I$ v etanolu po fermentaciji čistega pesnega in trsnega sladkorja ter povprečno vrednost za sveže iztisnjene sokove. Sledi izris trikotnika. Dodati je potrebno še končne točke, ki jih dobimo tako, da vrednostim $\delta^{13}C$ in $(D/H)_I$ v etanolu po fermentaciji sveže iztisnjenih sokov prištejemo standardni odklon. Potem pa glede na položaj vrednosti komercialnih sokov ugotavljamo njihovo potvorjenost oziroma avtentičnost. Interpretacija rezultatov sledi ob skici trikotnika potvorjenosti na sliki 11.



Slika 11: Trikotnik potvorb (Jamin in sod., 2004; Martin in sod., 1996a)

Potvorjenost oziroma avtentičnost se interpretira glede na lego točk, ki smo jih dobili z vnosom vrednosti izmerjenih po fermentaciji komercialnih sokov v program Excel, v conah:

- REF cona: sok je avtentičen,
- cona BR: soku je dodan pesni sladkor,
- cona RC: soku je dodan trsni sladkor,
- cona BCR: soku je dodana mešanica pesnega in trsnega sladkorja,
- cona BC: produkt ni mešanica sladkorja in sadnega soka (Martin in sod., 1996a).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Praktični del naloge je obsegal analizo vsebnosti stabilnih izotopov ogljika v sladkorjih in kisika v vodi v vzorcih jabolčnega soka, ki smo mu dodajali vodo oziroma sladkor. Temu je sledilo ovrednotenje vsebnosti stabilnih izotopov ogljika v sladkorjih in pulpi, kisika v vodi ter ogljika in vodika v etanolu devetindvajsetih vzorcev sokov iz Slovenije in Cipra. Določena je bila tudi vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v prej omenjenih vzorcih. Vrednosti posameznih meritev so podane v prilogi. Rezultate smo poskušali predstaviti na različne načine, predvsem pa smo želeli pokazati razlike med slovenskimi in ciprskimi sokovi. Primerjali smo jih tudi z razpoložljivimi podatki iz tuje literature, slovenska namreč podatkov o vsebnosti stabilnih izotopov izmerjenih z metodami IRMS in SNIF-NMR v sadnih sokovih še ne vsebuje.

4.1 REZULTATI POSKUSA DODAJANJA RAZLIČNIH VRST SLADKORJA IN VODE RAZLIČNEGA GEOGRAFSKEGA IZVORA V 100 % JABOLČNEM SOKU

4.1.1 Spreminjanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorju vzorcev pripravljenih z dodajanjem različnih količin dveh vrst sladkorjev oziroma njihove mešanice 100 % jabolčnemu soku

S tem poskusom smo pokazali vpliv dodajanja pesnega, trsnega ter mešanice trsnega in pesnega sladkorja enkrat v razmerju 50:50, drugič pa v razmerju 30:70 na spreminjanje izotopske sestave ogljika 100 % jabolčnega soka. Rezultati meritev so podani v preglednici 9. Poleg izmerjenih vrednosti, so v preglednici predstavljene tudi izračunane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ter razlike med izmerjenimi in izračunanimi vrednostmi. Izračunane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ($\delta^{13}\text{C}_{izr}$) smo dobili na podlagi izotopske masne bilance z naslednjo enačbo:

$$\delta^{13}\text{C}_{izr} = f_{TS, PT \text{ ali } TP} \cdot \delta^{13}\text{C}_{TS, PT \text{ ali } TP} + (1 - f_{TS, PT \text{ ali } TP}) \cdot \delta^{13}\text{C}_{soka} \quad \dots(10)$$

kjer f pomeni delež dodanega trsnega sladkorja (TS), mešanice trsnega in pesnega sladkorja v razmerju 50:50 (PT) ali 30:70 (TP), $\delta^{13}\text{C}$ pa je ustrezna izotopska sestava sladkorja ali mešanice sladkorjev.

Preglednica 9: Izmerjene in izračunane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v vzorcih 100 % jabolčnega soka, kateremu so bile dodane različne vrste in mase sladkorjev

Oznaka vzorca – poskus dodajanja sladkorja	$\delta^{13}\text{C}_{\text{izm.}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{izr.}}$ (‰)	Δ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{izm.}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{izr.}}$) (‰)
sok	-25,9		
PS	-25,6		
TS	-11,4		
PT	-19,2		
TP	-21,8		
PS1	-25,8		
PS2	-25,9		
PS3	-25,8		
PS4	-25,8		
TS1	-25,5	-25,4	-0,1
TS2	-24,7	-24,7	-0,0
TS3	-21,5	-21,3	-0,2
TS4	-19,1	-18,9	-0,2
PT1	-25,6	-25,7	0,1
PT2	-25,3	-25,3	0,0
PT3	-23,6	-23,8	0,2
PT4	-22,5	-22,7	0,2
TP1	-25,8	-25,7	-0,1
TP2	-25,6	-25,5	-0,1
TP3	-24,6	-24,6	0,0
TP4	-23,6	-23,9	0,3

Oznake:

PS komercialni pesni sladkor

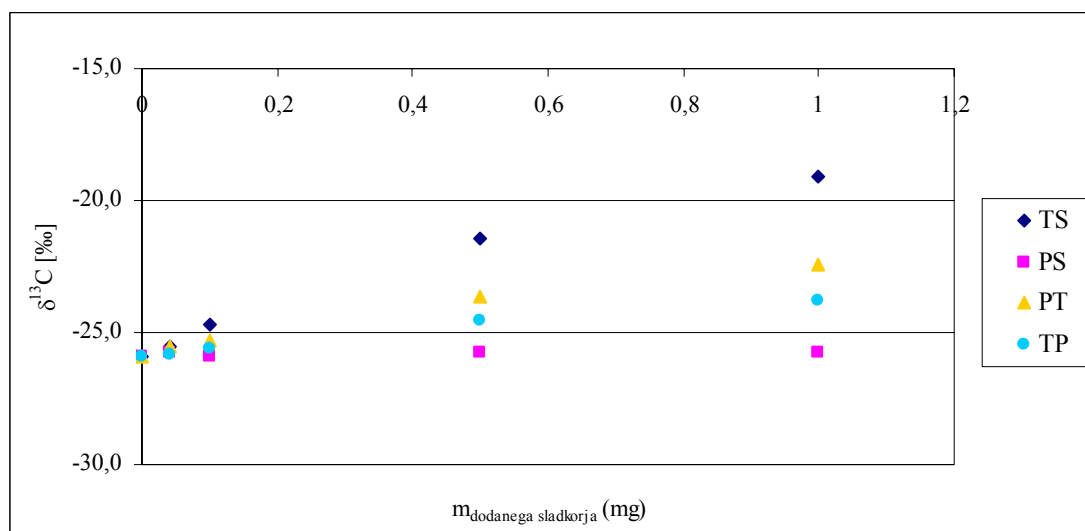
TS komercialni trsni sladkor

PT zmes pesnega in trsnega sladkorja v razmerju 50:50

TP zmes trsnega in pesnega sladkorja v razmerju 30:70

Kot lahko vidimo v preglednici 9, se izmerjene in izračunane vrednosti bistveno ne razlikujejo oziroma so v okviru eksperimentalne napake $\pm 0,2$ ‰, kar dokazuje, da je IRMS izredno natančna metoda določanja potvorjenosti s trsnim sladkorjem. Kot je bilo pričakovati pesni sladkor oziroma dodatek pesnega sladkorja ne vpliva na $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti.

Da bi dobili boljši pregled nad izmerjenimi vrednostmi, vnesemo eksperimentalne določitve v razsevni grafikon, ki ga prikazuje slika 12.

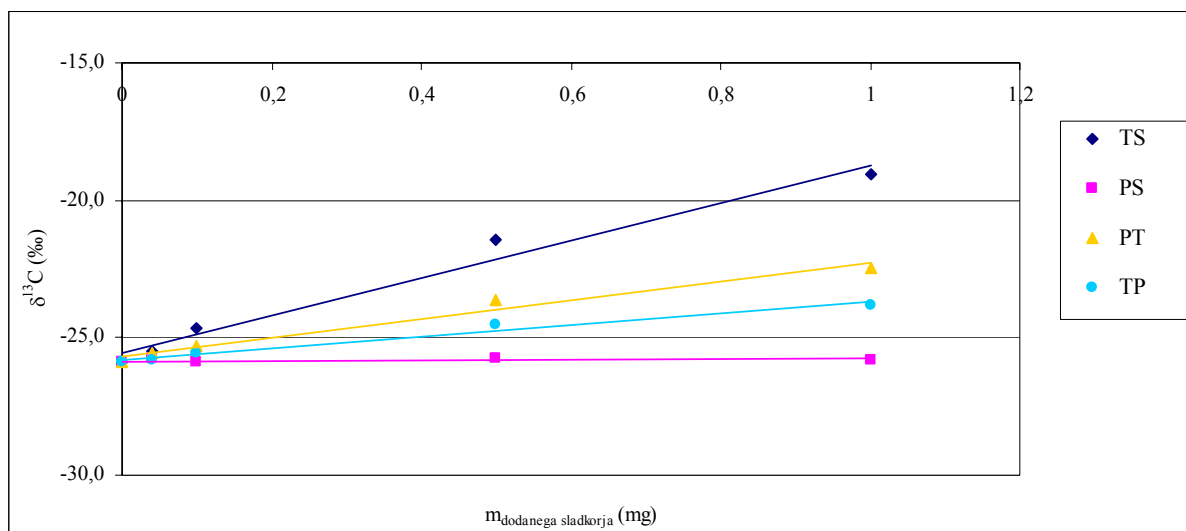


Slika 12: Odvisnost $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti od dodanega sladkorja v 100 % jabolčni sok

Kot smo predvidevali, se $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti povečujejo glede na količino dodanega sladkorja. Največje povečanje je ugotovljeno v primeru dodatka trsnega sladkorja, saj ima le ta tudi najvišjo $\delta^{13}\text{C}$ vrednost kot samostojna substanca, -11,4 ‰. V primeru dodajanja trsnega sladkorja opazimo povečanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti od -25,9 ‰, kolikor namerimo v 100 % soku na -19,1 ‰, kolikor znaša izmerjeno razmerje v soku, ki smo mu dodali 1 g trsnega sladkorja. Nekoliko manjše povečanje je ugotovljeno v primeru dodatka mešanice, ki je vsebovala 50 % trsnega sladkorja, preostali del mešanice pa je predstavljal pesni sladkor, in sicer od prej omenjenih -25,9 ‰ na -22,5 ‰. Pri dodatku mešanice trsnega in pesnega sladkorja v razmerju 30:70 pa se je $\delta^{13}\text{C}$ vrednost dvignila iz -25,9 ‰ na -23,8 ‰. Pravo nasprotje tem spremembam pa predstavlja dodatek pesnega sladkorja, kjer se $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v vzorcih praktično niso spremenile niti ob dodatku 0,04 g sladkorja niti ob dodatku 1 g le tega.

Povečanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti s povečevanjem količine dodanega sladkorja lahko opišemo s preprosto linearno zvezo. Prav to statistično povezanost dodatka sladkorja in povečanja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti bomo v nadaljevanju podrobneje preučili.

Pri regresijski analizi je potrebno definirati odvisno in neodvisno spremenljivko. V našem primeru smo izbrali za neodvisno spremenljivko (x) količino dodanega sladkorja, za odvisno (y) pa izotopsko sestavo ogljika v sladkorjih. Praktično to pomeni, da večji dodatek sladkorja doprinese k višji $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ali dodatek sladkorja na razmerje ne vpliva. Grafični prikaz regresijskih modelov je predstavljen na sliki 13.



Slika 13: Zveza med maso dodanega sladkorja in izotopsko sestavo ogljika $\delta^{13}\text{C}$

Enačbe premic, ki so se kar najboljše prilegale individualnim podatkom opazovanih spremenljivk, smo določili z metodo linearne regresije. Analize smo opravili z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2003, ki je poleg grafičnih izrisov podal tudi enačbe premic in vrednosti koeficientov determinacije (r^2), ki nam povedo, kolikšen delež variabilnosti izotopske sestave ogljika $\delta^{13}\text{C}$ pojasnjuje dodatek različnih vrst in različnih količin sladkorja. Pri korelacijski analizi smo dodani sladkor in izotopsko sestavo obravnavali kot naključni in odvisni spremenljivki. Na osnovi vrednosti koeficienta korelacije (r), ki je pri linearni zvezi enak kvadratnemu korenu determinacijskega koeficienta, smo ovrednotili stopnjo povezanosti obeh spremenljivk. V preglednici 10 so zbrane enačbe regresijskih premic ter vrednosti regresijskih in determinacijskih koeficientov.

Preglednica 10: Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti r^2 in r za posamezne vrste sladkorjev, ki smo jih dodajali 100 % soku

Vrsta sladkorja	Linearni regresijski model ($y = bx + a$)	Koeficient determinacije (r^2)	Koeficient korelacije (r)
PS	$y = 0,0831x - 25,851$	0,2623	0,51
TS	$y = 6,8444x - 25,569$	0,9772	0,99
PT	$y = 3,411x - 25,685$	0,9773	0,99
TP	$y = 2,1168x - 25,823$	0,9808	0,99

Vrednosti determinacijski koeficientov za trsni sladkor ter mešanico trsnega in pesnega sladkorja v razmerju 50:50 oziroma 30:70 se bistveno ne razlikujejo in v splošnem velja, da so zelo visoke. V soku z dodanim omenjenim sladkorjem oziroma mešanicami sladkorjev masa dodanega sladkorja pojasnjuje kar 98 % variabilnosti $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti. Glede na vrednosti koeficienta korelacije pa lahko zaključimo, da gre za močno povezanost med maso in vrsto dodanega sladkorja ter $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorjih.

Drugačno sliko pa kaže dodatek pesnega sladkorja, kjer masa dodanega sladkorja pojasnjuje le 26 % variabilnosti $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, povezanost med maso in vrsto dodanega sladkorja ter $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih pa je glede na izračunani r, zmerena.

S tem poskusom smo potrdili navedbe številnih avtorjev (Dennis, 1997; Doner in sod., 1980; Doner in sod., 1992; Guček in sod., 1998; Jamin in sod., 2004; Martin in sod., 1996a; Martin in sod., 1996c; Ogrinc in sod., 2002; Ogrinc in sod., 2003), da se izotopsko razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ bistveno razlikuje glede na to, kateri cikel uporabljajo rastline za fiksacijo CO_2 in tvorbo sladkorjev, ter da z metodo IRMS ne moremo določiti potvorbe sadnih sokov s pesnim sladkorjem, razen potvorbe ananasovega soka, ki spada med rastline s CAM ciklom. Večina sadnih rastlin in sladkorna pesa namreč spadajo med C_3 rastline, ki imajo zelo podobne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, torej se tudi če je soku dodan pesni sladkor, $\delta^{13}\text{C}$ vrednost bistveno ne spremeni. Popolnoma nasprotno pa smo dokazali z dodajanjem trsnega sladkorja, saj spada sladkorni trs med C_4 rastline, ki imajo bistveno višje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti. Dodatek le tega v sadne sokove je zelo hitro zaznaven in lahko že z meritvami z IRMS dokažemo potvorbo. Če pa je soku dodana mešanica sladkorjev, pa je dokazovanje potvrjenosti odvisno od količine trsnega sladkorja v mešanici. Dodatka koruznega sirupa v jabolčni sok nismo testirali, saj se le ta pri nas izjemno redko uporablja, vendar lahko glede na to, da koruza spada med C_4 rastline sklepamo, da bi bile spremembe $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti zelo podobne kot pri dodatku trsnega sladkorja.

4.1.2 Spreminjanje $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi vzorcev, pripravljenih z dodajanjem različnih volumnov vode z različnim geografskim poreklom v 100 % jabolčnemu soku

Podobno kot s poskusom dodajanja sladkorjev, smo tudi z dodajanjem različnih volumnov vode iz različnih geografskih področij želeli pokazati vpliv dodajanja vode ter različnega geografskega porekla vode na izotopsko sestavo tokrat kisika v vodi, ki jo vsebuje 100 % jabolčni sok. Rezultati so podani v preglednici 11.

Če poznamo izotopsko razmerje kisika v 100 % soku ($\delta^{18}\text{O}_{\text{soka}}$), ajdovski vodi in vodi iz Podgorice ter odstotek dodane vode, lahko vrednost izotopskega razmerja v vzorcih z dodano vodo tudi izračunamo, in sicer z uporabo izotopske masne bilance po enačbi:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{izr}} = f_{H \text{ ali } I} \cdot \delta^{18}\text{O}_{H \text{ ali } I} + (1 - f_{H \text{ ali } I}) \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{soka}} \quad \dots(11)$$

kjer f pomeni delež dodane ajdovske vode (H) ali vode iz Podgorice (I), $\delta^{18}\text{O}$ pa je ustrezna izotopska sestava vode. % dodane vode in izračunane vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ so prav tako podane v preglednici 11.

Preglednica 11: Izmerjene $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vzorcih z dodanimi različnim volumnom vode z različnim geografskim poreklom v 100 % jabolčni sok

Oznaka vzorca – poskus dodajanja vode	Dodatek vode (%)	$\delta^{18}\text{O}_{\text{izm.}}$ (‰)	$\delta^{18}\text{O}_{\text{izr.}}$ (‰)	Δ ($\delta^{18}\text{O}_{\text{izm.}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{izr.}}$) (‰)
H0	0	-4,8	-4,8	0,0
H4	20	-5,5	-5,5	0,0
H6	30	-5,9	-5,9	0,0
H8	40	-6,4	-6,3	-0,1
H10	50	-6,7	-6,6	-0,1
voda H	100	-8,4	-8,4	0,0
I0	0	-4,8	-4,8	0,0
I4	20	-5,7	-5,6	-0,1
I6	30	-6,2	-6,1	-0,1
I8	40	-6,6	-6,5	-0,1
I10	50	-7,0	-6,9	-0,1
voda I	100	-9,0	-9,0	0,0

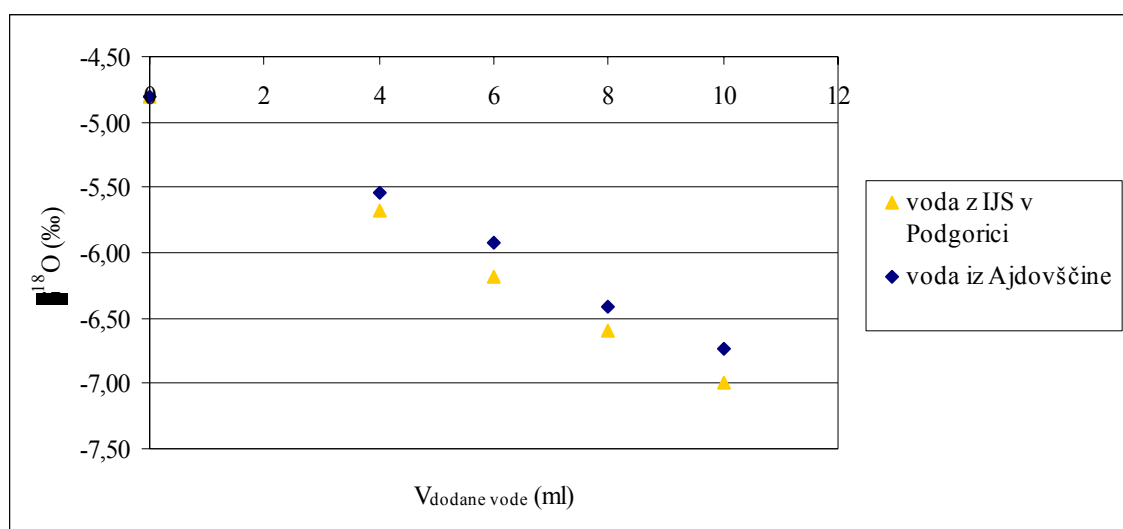
Oznake:

H voda iz Ajdovščine

I voda z Instituta Jožef Stefan v Podgorici

Kot lahko vidimo v preglednici 11, se izmerjene in izračunane vrednost bistveno ne razlikujejo oziroma so v okviru eksperimentalne napake $\pm 0,1$ ‰, s čemer smo že drugič dokazali, da je IRMS izredno natančna metoda določanja potvorjenosti tokrat z vodo.

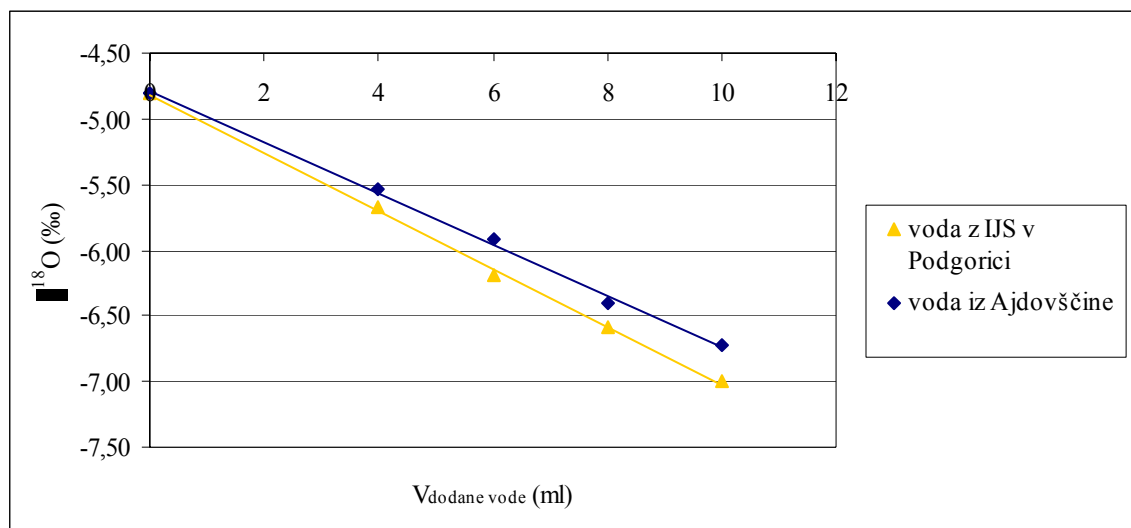
Tudi tu smo zaradi boljšega pregleda nad podatki vnesli eksperimentalne določitve v razsewni grafikon, ki ga prikazuje slika 14.



Slika 14: Odvisnost vsebnosti $\delta^{18}\text{O}$ od dodane vode 100 % jabolčnemu soku

Tudi s tem poskusom so se uresničila naša predvidevanja. $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti se zmanjšujejo s povečevanjem količine dodane vode. Glede na to, da je izotopska sestava vode na Institutu nižja ($\delta^{18}\text{O} = -9,0 \text{ ‰}$) kot voda iz Ajdovščine ($\delta^{18}\text{O} = -8,4 \text{ ‰}$), je tudi zniževanje vrednosti izotopskega razmerja večje. V primeru dodajanja vode z Instituta opazimo padec vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ od $-4,8 \text{ ‰}$, kolikor namerimo v 100 % soku na $-7,0 \text{ ‰}$, kolikor znaša izmerjena vrednost v soku, ki smo mu dodali 10 ml vode z Instituta Jožef Stefan. Medtem ko se $\delta^{18}\text{O}$ vrednost pri dodatku 10 ml vode iz Ajdovščine spremeni za $1,9 \text{ ‰}$, torej pade na $-6,7 \text{ ‰}$.

Večji volumen dodane vode torej doprinese k nižji $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti. Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk (x in y) ponovno uporabimo metodi korelacije in regresije. Izračunamo tudi koeficient korelacije in determinacije. Grafični prikaz regresijskih modelov je predstavljen na sliki 15.



Slika 15: Zveza med volumnom dodane vode in izotopsko sestavo kisika $\delta^{18}\text{O}$

Preglednica 12: Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti r^2 in r za posamezne izvore vod, ki smo jih dodajali 100 % soku

Izvor vode	Linearni regresijski model ($y = bx + a$)	Koeficient determinacije (r^2)	Koeficient korelacije (r)
Ajdovščina	$y = -0,1953x - 4,7881$	0,9971	-1,00
IJS Podgorica	$y = -0,2207x - 4,8178$	0,9988	-1,00

Vrednosti determinacijskih koeficientov za vodo iz Ajdovščine in Podgorice se bistveno ne razlikujejo in v splošnem velja, da so zelo visoke. V soku z dodano ajdovsko vodo oziroma soku z dodano vodo iz Podgorice volumen dodane vode pojasnjuje skoraj 100 % variabilnosti izotopske sestave kisika. Glede na vrednosti koeficienta korelacije (r je v obeh primerih enak $-1,00$) pa lahko zaključimo, da gre za izredno močno povezanost med volumnom dodane vode ter $\delta^{18}\text{O}$ vrednostjo.

Potvorbe sadnih sokov z vodo lahko z metodo IRMS hitro in enostavno dokažemo, saj lahko že iz našega poskusa sklepamo, da so $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v sokovih bistveno višje kot v pitni oziroma industrijsko neoporečni vodi. Temu pritrujejo tudi zapisi številnih avtorjev. Košir (2001), Calderone in Guillou (2008), Doner in sodelavci (1992), Martin in sodelavci (1996a), Rossman in sodelavci (1999) ter Bréas in sodelavci (1994) namreč navajajo, da prihaja pri prehodu vode od vodnih virov do rastline oziroma do samega plodu zaradi različnih vplivov do izotopske frakcionacije kisika, posledica katere je z devterijem bogatejša voda, ki potem med stiskanjem sadja prehaja v sok. To pa se potem odrazi v višjih $\delta^{18}\text{O}$ vrednostih v soku, ki je bil izdelan iz sveže iztisnjenega sadja. Z IRMS lahko torej tudi potrdimo ali ovržemo trditev, da je bil sok pripravljen iz koncentriranega soka oziroma iz sveže iztisnjenega sadja. To mora namreč biti po veljavnem pravilniku o kakovosti sadnih sokov in določenih istovrstnih izdelkov (2004) jasno označeno na deklaraciji.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SLADKORJEV Z METODO HPLC

Vsebnosti treh glavnih sladkorjev: glukoze, fruktoze in saharoze v izbranih sadnih sokovih iz Slovenije in s Cipra so bile določene z metodo HPLC. Poleg vsebnosti sladkorjev je bila določena tudi sladkorna stopnja v vzorcih, in sicer s saharimetrom. Rezultati meritev so zbrani v preglednici 13.

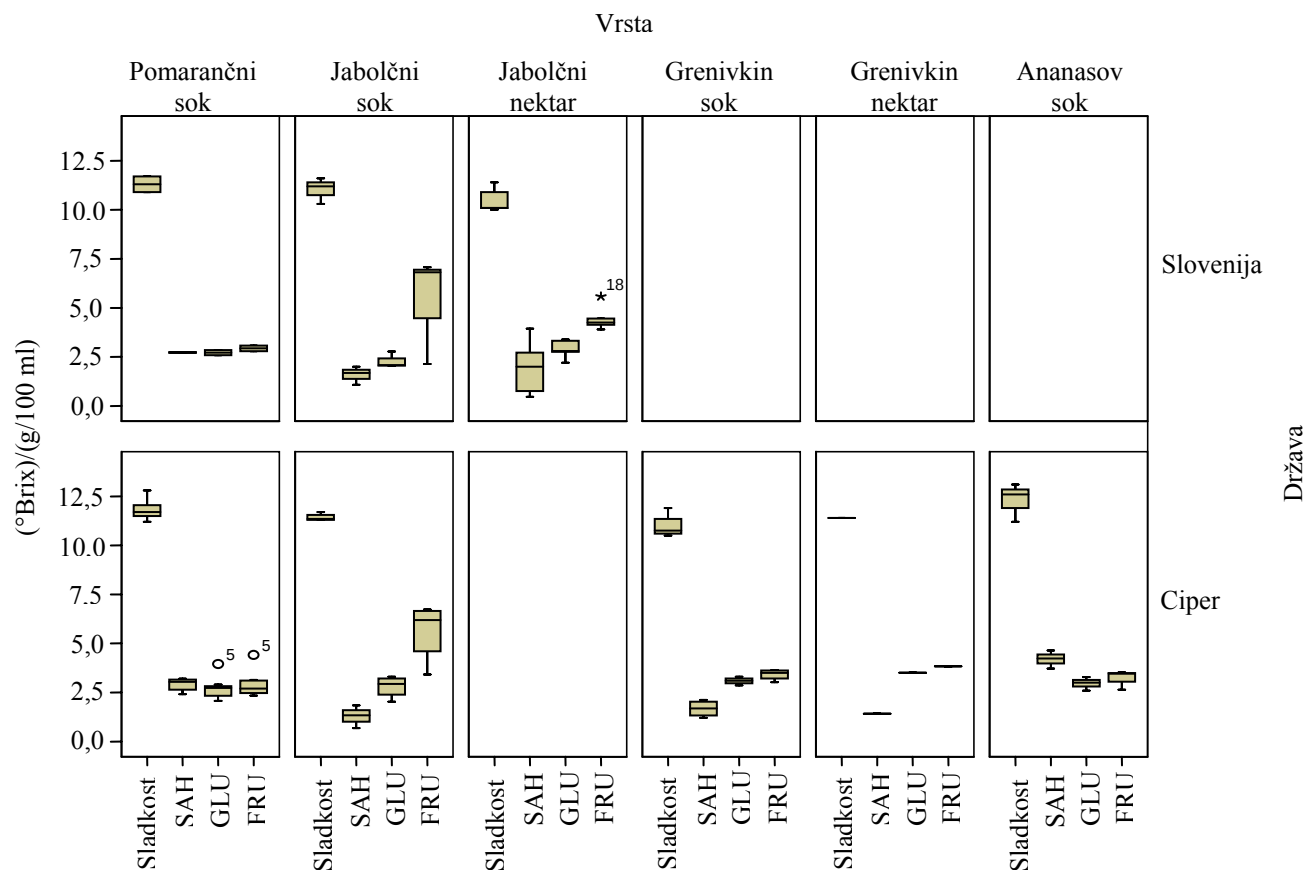
Preglednica 13: Sladkorna stopnja in vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v izbranih sadnih sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra

Oznaka komercialnega vzorca	Sladkorna st. (°Brix)	Glukoza (g/100ml)	Fruktoza (g/100ml)	Saharoza (g/100 ml)	Vsota (SA+GL+FR) (g/100 ml)
Psc1	11,6	2,07	2,34	2,86	7,27
Psc2	11,2	2,17	2,44	2,42	7,03
Psc3	11,7	2,73	3,07	3,04	8,84
Psc4	11,8	2,74	3,14	3,20	9,08
Psc5	12,8	3,95	4,41	2,41	10,77
Psc6	11,4	2,90	2,70	3,20	8,80
Psc7	12,3	2,49	2,49	3,10	8,08
Pss8	10,9	2,85	3,08	2,71	8,64
Pss9	11,7	2,58	2,79	2,74	8,11
Jsc1	11,7	2,75	6,58	1,35	10,68
Jsc2	11,3	3,30	3,41	1,84	8,55
Jsc3	11,4	2,02	6,73	1,32	10,07
Jsc4	11,3	3,12	5,79	0,68	9,59
Jss5	11,6	2,08	2,14	2,00	6,22
Jss6	11,2	2,77	6,81	1,07	10,65
Jss7	10,3	2,04	7,07	1,68	10,79
Jns8	11,4	2,76	4,14	3,94	10,84
Jns9	10,1	3,32	5,58	0,76	9,66
Jns10	10,9	2,80	3,90	2,00	8,70
Jns11	10,1	3,38	4,45	0,46	8,29
Jns12	10,0	2,20	4,25	2,72	9,17
Gsc1	10,7	2,86	3,02	1,20	7,08
Gsc2	11,9	3,07	3,64	2,12	8,83
Gsc3	10,5	3,12	3,40	1,92	8,44
Gsc5	10,8	3,30	3,60	1,45	8,35
Gnc6	11,4	3,51	3,83	1,42	8,76
Asc1	12,6	3,28	3,45	3,72	10,45
Asc2	11,2	2,59	2,64	4,64	9,87
Asc3	13,1	3,00	3,52	4,23	10,75

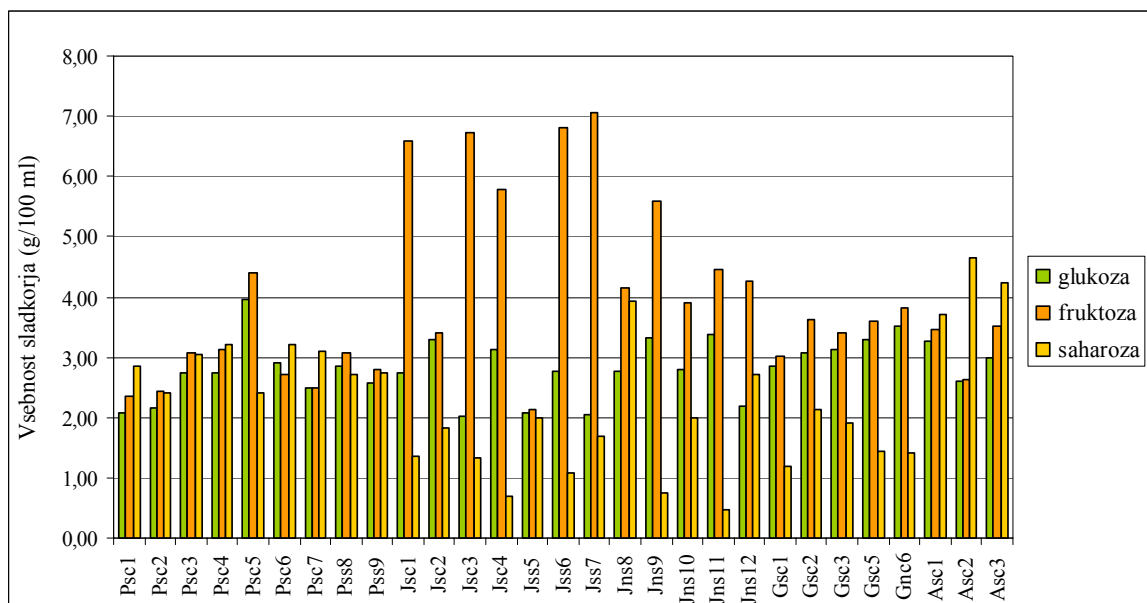
Kot lahko opazimo se sladkorna stopnja sadnih sokov, najsi bodo to 100 % sokovi ali nektarji giblje med 10,3 °Brix, kolikor smo namerili v slovenskem jabolčnem soku, in 13,1 °Brix, kolikor je znašala meritev v ciprskem ananasovem soku. Sladkorna stopnja je nekoliko višja le v ananasovih sokovih, pri ostalih sokovih in nektarjih pa se giblje okrog

11 °Brix. To nazorno prikazuje tudi slika 16. Iz tega lahko zaključimo, da v sladkorni stopnji ne opazimo razlike niti med sladkorji in nektarji niti med slovenskimi in ciprskimi proizvodi.

Za nazornejši pregled rezultatov smo s pomočjo programa SPSS izrisali graf okvirjev z ročaji, ki ga predstavlja slika 16 ter stolpični grafikoni, ki je bil izdelan s programom Microsoft Office Excel 2003 in ga predstavlja slika 17.



Slika 16: Prikaz sladkorne stopnje ter vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v sadnih sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra



Slika 17: Vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v sokovih in nektarjih iz Slovenije in s Cipra

Vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze se v slovenskih in ciprskih pomarančnih sokovih bistveno ne razlikujejo in ustrezajo tudi vrednostim, ki so zapisane v prehranskih tabelah Soucija in sodelavcev (2008, 2000) in so predstavljene tudi pod točko 2.4.1. Glede na ostala sladkorja je v ciprskih, predvsem pa v slovenskih sokovih višja le vsebnost saharoze, ki se giblje okrog 2,70 g/100 ml v slovenskih ter med 2,41 in 3,20 g/100 ml v ciprskih sokovih. V prehranskih tabelah zapisane vsebnosti saharoze se gibljejo med 2,70 in 4,80 g/100 ml. Izjema pa je z oznako Psc5, ki je na sliki 16 predstavljen kot osamelec in ima izjemno povišano vsebnost glukoze, predvsem pa fruktoze, kar za pomarančne sokove ni značilno.

Za jabolčne sokove je značilna zelo visoka vsebnost fruktoze, ki naj bi po navedbah Soucija in sodelavcev (2008, 2000), znašala med 5,10 in 7,70 g/100 ml. To smo potrdili tudi z našimi izbranimi proizvodi, saj imajo vzorci Jsc1, Jsc3, Jsc4, Jss6 in Jss7 bistveno večjo vsebnost fruktoze, kot ostalih dveh sladkorjev. Vsebnosti fruktoze se v teh vzorcih gibljejo med 5,79 in 7,07 g/100 ml. Najvišjo vsebnost fruktoze smo namerili v vzorcu Jss7 (slika 17). Vendar je tudi v primeru jabolčnih sokov opaziti nekatere izjeme, in sicer je to ciprski vzorec z oznako Jsc2 in slovenski z oznako Jss5, v katerih je vsebnost fruktoze bistveno nižja kot v ostalih, povečana pa vsebnost glukoze oziroma saharoze. V jabolčnih sokovih je moč opaziti tudi zelo nizke vsebnosti saharoze, najnižja izmerjena je bila namreč samo 0,68 g/100 ml, v prehranskih tabelah pa so za vsebnost saharoze predvidene vrednosti med 1,30 do 2,30 g/100 ml (Souci in sod., 2008; Souci in sod., 2000).

Razlike med vsebnostmi glukoze, fruktoze in saharoze se v nektarjih zabrišejo, saj so le ti lahko po pravilniku dosladkani, domena proizvajalca pa je s kakšnim sladkorjem bo to izvršil, najsi bo to trsni, pesni, koruzni sladkor ali glukozno fruktozni sirup. To je tudi najverjetnejši razlog, da v prehranskih tabelah ne najdemo podatkov o vsebnosti glavnih

sladkorjev. Vseeno pa je pri vseh proizvodih, ki smo jih izbrali, še vedno najvišja vsebnost fruktoze. Najbolj je to vidno pri vzorcu jabolčnega nektarja Jns9, ki je na sliki 16 predstavljen kot ekstremni osamelec, z vsebnostjo fruktoze 5,58 g/100 ml.

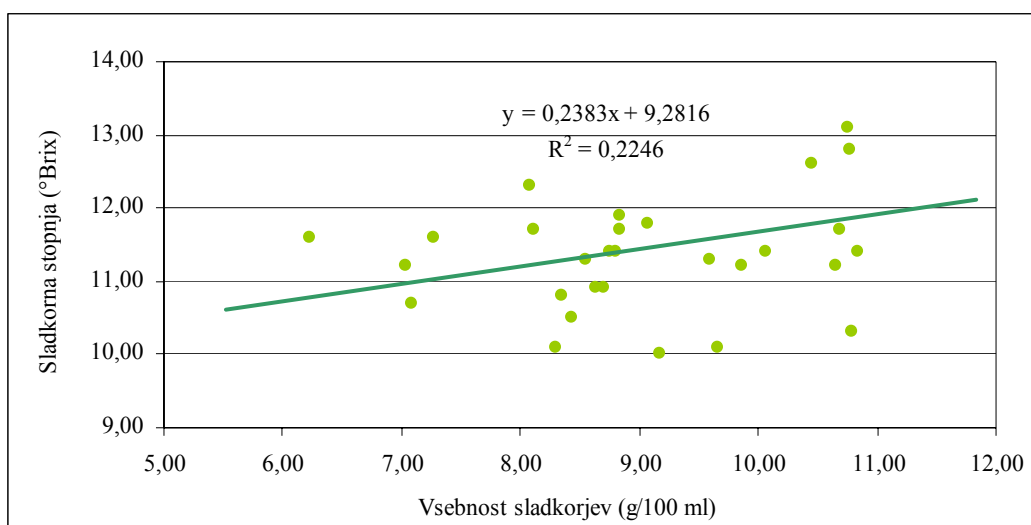
Pri sokovih in nektarju iz grenivke lahko opazimo, da sta vsebnost glukoze in fruktoze približno enaki in se gibljeta okrog 3,00 mg/100 ml, medtem ko je vsebnost saharaže približno dvakrat manjša. Te značilnosti potrjujejo tudi prehranske tabele Soucija in sodelavcev (2008, 2000).

Ciprski vzorci ananasovih sokov kažejo tendenco k višji vsebnosti saharaže, ki se giblje med 3,72 in 4,64 g/100 ml, kar se nekoliko razlikuje od variacije vsebnosti, ki so jih predvideli Souci in sodelavci (2008, 2000). Vsebnosti glukoze in fruktoze so tako v literarnih podatkih kot tudi v izbranih vzorcih nekoliko nižje od vsebnosti saharaže.

Če izvezamo nektarje, se torej izmerjene vsebnosti glukoze, fruktoze in saharaže ujemajo s podatki v prehranskih tabelah Soucija in sodelavcev (2008, 2000). Izjema so le vzorec pomarančnega soka z oznako Psc5 ter jabolčnega z oznakama Jsc2 in Jss5. Glede na te rezultate se nam že porajajo prvi dvomi o avtentičnosti slednjih, za kar pa je potreba potrditev z bolj specifičnimi analizami, med katere zagotovo spadata tudi IRMS in SNIF-NMR.

4.2.1 Zveza med vsebnostjo sladkorjev in sladkorno stopnjo

Poleg same vsebnosti glukoze, fruktoze in saharaže, nas je zanimalo tudi, ali obstaja povezanost med vsebnostjo omenjenih sladkorjev in sladkorno stopnjo. Zato smo vrednosti vnesli v razsevni diagram in s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003 izračunali tudi enačbo premice in koeficient determinacije. Rezultat je predstavljen na sliki 18.



Slika 18: Zveza med vsebnostjo glukoze, fruktoze in saharaže ter sladkorno stopnjo v izbranih komercialnih sokovih iz Slovenije in s Cipra

Slika 18 torej prikazuje odvisnost sladkorne stopnje od vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v analizirani sokovih in nektarjih, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vrst sokov in nektarjev opisuje regresijski model $y = 0,2383x + 9,2816$. Regresijski koeficient znaša 0,2383. To je vrednost, za katero se spremeni sladkorna stopnja (podana v °Brix), če se vsota vsebnosti sladkorjev spremeni za 1 g/100 ml ali drugače, da bi se sladkorna stopnja povečala za 23,83 % se mora vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze povečati za 1 g/ 100 ml.

Koeficient determinacije (r^2) znaša 0,22, kar pomeni, da vsebnost sladkorjev (neodvisna spremenljivka) pojasnjuje le 22 % variance sladkorne stopnje. Vrednost korelacijskega koeficienta (r) v primeru linearne regresije izračunamo kot kvadratni koren regresijskega koeficienta in v danem primeru znaša 0,47. R se nahaja med 0,4 in 0,7, kar kaže na zmerno povezanost med vsebnostjo glukoze, fruktoze in saharoze ter sladkorno stopnjo.

4.3 REZULTATI MERJENJA $\delta^{13}\text{C}$ PULPE, SLADKORJA, ETANOLA IN $\delta^{18}\text{O}$ VODE Z METODO IRMS TER $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ IN $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ V ETANOLU Z METODO SNIF-NMR V KOMERCIALNIH SOKOVH IZ SLOVENIJE IN CIPRA

V izbranih komercialnih vzorcih smo najprej določili izotopsko razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v pulpi in sladkorjih sadnih sokov ter $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ v vodi. Vse z metodo IRMS. Vzorce smo nato fermentirali, etanol pa predestilirali. Sledilo je še določanje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v etanolu z metodo IRMS ter $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ v etanolu z metodo SNIF-NMR. Glede na to, da se vsi fermentabilni sladkorji med procesom fermentacije pretvorijo v etanol, pa smo poiskali tudi povezavo med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorjih in etanolu.

4.3.1 Rezultati določanja avtentičnosti oziroma potvorb sadnih sokov s sladkorji

Trdili smo, da si bodo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v 100 % sadnih sokovih, tako za pulpo kot tudi sladkor in etanol, zelo podobne. Ta trditev velja za komercialne sokove s Cipra in iz Slovenije.

Z uporabo meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ v etanolu smo izrisali trikotnik potvorb za pomarančni in grenivkin sok, s pomočjo katerega lahko določimo potvorjenost s specifičnimi sladkorji – pesnim, trsnim ali mešanico obeh (slika 11).

Izmerjeni rezultati so zbrani v preglednici 14. Za lažjo primerjavo izmerjenih vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu, pa smo vrednosti za posamezne komercialne sokove in nektarje vnesli v Microsoft Office Excel 2003 in izrisali stolpčne grafikone, ki jih predstavljajo slike 19, 21 in 22.

Preglednica 14: Rezultati merjenja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti pulpe, sladkorja in etanola v izbranih komercialnih sokovih in nektarjih z metodo IRMS

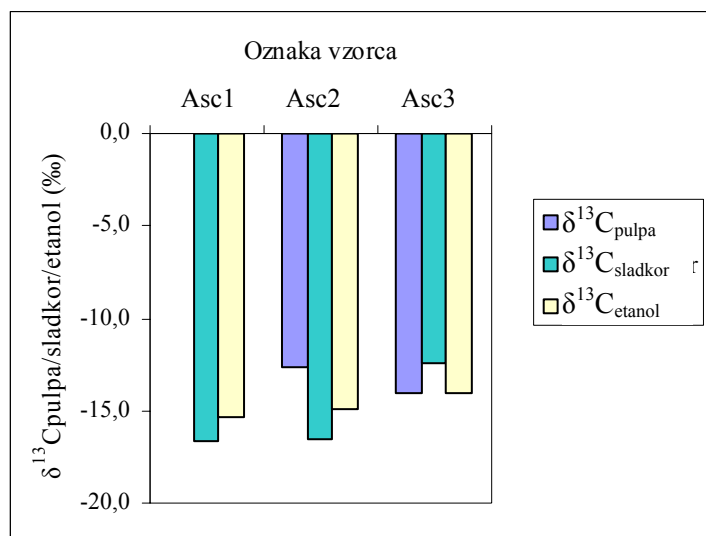
Oznake vzorcev komercialnih sokov	$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ sladkor (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ etanol (‰)	(D/H) ₁ etanol (ppm)
Psc1	-25,9	-16,5	-23,7	104,3
Psc2	-26,1	-23,2	-27,5	99,7
Psc3	-25,9	-25,7	-27,2	104,0
Psc4	-25,9	-25,7	-26,1	104,6
Psc5	-26,6	-25,3	-26,6	97,9
Psc6	-25,2	-23,0	-24,1	102,2
Psc7	-25,8	-23,5	-24,0	103,5
Pss8	-26,0	-23,2	-23,8	101,0
Pss9	-25,8	-25,5	-26,1	102,4
Jsc1		-25,5	-27,2	99,4
Jsc2		-21,2	-23,0	98,5
Jsc3		-25,1		97,0
Jsc4		-26,5	-27,5	97,9
Jss5		-26,6	-27,6	97,7
Jss6		-24,3	-28,2	96,2
Jss7		-26,8		96,6
Jns8		-25,8	-26,9	91,4
Jns9		-18,0	-18,6	101,9
Jns10		-26,0	-27,8	92,5
Jns11		-18,1	-18,3	102,6
Jns12		-26,4	-28,1	93,5
Gsc1	-25,5	-19,4	-27,3	107,4
Gsc2	-25,2	-24,5	-25,2	99,2
Gsc3	-25,5	-26,1	-26,6	102,1
Gsc4	-24,7	-25,3	-27,0	95,3
Gsc5	-25,5	-26,0	-27,4	102,0
Gnc6	-25,3	-16,0	-16,5	107,8
Asc1		-16,6	-15,4	96,6
Asc2	-12,7	-16,5	-14,9	105,0
Asc3	-14,0	-12,4	-14,0	106,6

$\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih izbranih sadnih sokovih se gibljejo med -26,8 in -12,4 ‰. Kot je bilo pričakovati, smo najvišje vrednost določili v ananasovem soku, in sicer med -16,6 in -12,4 ‰, medtem ko se odgovarjajoče vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v etanolu gibljejo med -15,4 in -14,0 ‰. Ananas namreč pripada skupini C_4 rastlin, za katere vemo, da imajo bistveno višje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti kot C_3 rastline.

V primeru ananasovih sokov, razen pri vzorcu Asc3, opazimo slabo ujemanje z literaturnimi podatki. Jamin in sodelavci (1997a) so namreč v veliko večjem številu ananasovih sokov določili vrednosti med -13,2 in -11,5 ‰. Evropske smernice, ki zajemajo tudi status ananasovega soka, pa trdijo celo, da $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih manjše od -15 ‰ kažejo na dodatek produktov C_3 rastlin (AIJN, 1993).

Na prisotnost produktov C_3 rastlin v vzorcu Asc2 pa kaže tudi razlika v $\delta^{13}\text{C}$ vrednostih v sladkorjih in pulpi, kar prikazuje tudi stolpični grafikon na sliki 19. Ta sok je bil deklariran

kot 100 % ananasov sok, brez dodanega sladkorja. V vzorcu številka 1 pulpe nismo določili.



Slika 19: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za ananasove sokove

Kot lahko razberemo iz preglednice 14, se $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v pomarančnih sokovih gibljejo med -25,7 in -16,5 ‰, čeprav menimo, da je pri vrednosti -16,5 ‰ prišlo do napake v analizi, ker sta si sicer $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v pulpi in etanolu precej podobni. V jabolčnih sokovih smo namerili $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti med -26,6 in -21,2 ‰, v jabolčnih nektarjih pa med -26,4 in -18,0 ‰. V sokovih iz grenivke se vrednosti gibljejo med -26,1 in -19,4 ‰. Podobno je z $\delta^{13}\text{C}$ vsebnostjo v etanolu, čeprav so izmerjene vrednosti v splošnem nekoliko višje, kot so pri sladkorju in pulpi, ker se med destilacijo ne moremo popolnoma izogniti izotopski frakcionaciji. Tako se vrednosti za pomarančne sokove gibljejo med -27,5 in -23,7 ‰, za jabolčne sokove med -28,2 in -23,0 ‰, za jabolčne nektarje pa med -28,1 in -18,3 ‰. V grenivkinih sokovih smo izmerili vrednosti med -27,4 in -25,2 ‰. $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi pomarančnih sokov se gibljejo med -26,6 in -25,1 ‰, v pulpi sokov iz grenivke med -25,5 in -24,7 ‰, v grenivkinem nektarju pa znaša izmerjena vrednost -25,3 ‰. V bistrih jabolčnih sokovih pulpe ni, saj se delci sadja odstranjujejo z različnimi postopki bistenja.

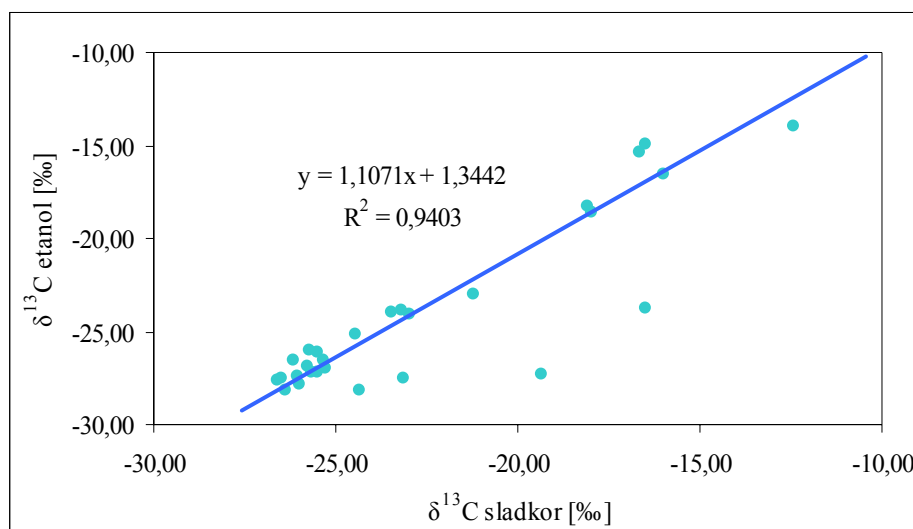
Tako citrusi, kot tudi jabolko, spadajo med produkte rastlin, ki za nastanek sladkorjev uporabljajo Calvinov ali C_3 cikel in torej spadajo med C_3 rastline. Bricout in Koziat (1987) trdita, da so pričakovane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih C_3 rastlin med -28,0 in -23,5 ‰. V literaturi pa najdemo tudi podatke za posamezne vrste sokov. V AOAC metodah je navedeno, da je povprečna $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v pomarančnih sokovih -24,5 ‰ (AOAC official method 982,21), v jabolčnih pa -25,3 ‰ (AOAC official method 981,09). Jamin in sodelavci (1998) so v 12 vzorcih pomaranč iz Argentine določili povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v sladkorjih -26,3 ‰, medtem je znašala določena vrednost v 11 pomarančnih vzorcih iz mediteranskih držav -24,4 ‰. Simpkins in sodelavci (2000) pa so v številnih vzorcih pomarančnih sokov določili povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost -24,8 ‰. V jabolčnih sokovih so

tako Doner in sodelavci (1980), kot tudi Jamin in sodelavci (1997b), določili povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost -25,4 ‰. Po podatkih prvega se vrednosti gibljejo med -27,9 in -22,5 ‰, vrednost pri drugem pa med -26,8 in -23,6 ‰. Na drugi strani pa Brause in Raterman (1982) podajata nekoliko širše območje gibanja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v jabolčnih sokovih, in sicer med -28 in -22 ‰.

Glede na izmerjene vrednosti v komercialnih sokovih in primerjavo z vrednostmi Bricouta in Kozieta (1987), ki podajata pričakovane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih C_3 rastlin, lahko sklepamo, da je bil vzorec Psc1, Psc2, Psc6, Jsc2, Jns9 in Jsc11 ter Gsc1 in Gnc6 dodan trsni sladkor. Vrednosti izmerjene v teh sokovih se gibljejo med -23,2 in -16,0 ‰, kar je bistveno nižje od pričakovanih za naravne sadne sokove. Dodatek sladkorja je deklariran samo v vzorcih Jns9 in Jns11 ter Gnc6, saj gre v teh primerih za nektarje, v katere je dodatek sladkorja dovoljen s pravilnikom. V vzorcu Gsc1 pa je izmerjena $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v etanolu precej višja kot v sladkorjih, -27,3 ‰, kar lahko kaže na to, da izolacija sladkorjev ni bila izvedena pravilno in je vzorec avtentičen. Glede na dobljene rezultate lahko tudi opazimo, da je bil dvema slovenskima jabolčnima nektarjema (Jns9 in Jns11) dodan trsni sladkor, čeprav je v Sloveniji najpogosteje uporabljen pesni sladkor. Dodatek trsnega sladkorja je prav tako dokazan tudi v nekaterih komercialno dostopnih slovenskih pomarančnih sokovih (Ogrinc in sod., 2003).

Analize $\delta^{13}\text{C}$ se pogosto izvršijo tudi na etanolu, ker je to bistveno lažje izvesti kot na prekurzorjih sladkorjev. Predlagane so bile tudi kot prva metoda pri AOAC Official Methods za določanje potvorjenosti sadnih sokov in tudi javorjevega sirupa. Ena od bistvenih prednosti je čistost samega etanola, ki ga analiziramo. Ko sta procesa fermentacije in destilacije izvedena natančno in pod kontroliranimi pogoji, dobimo izredno dobro povezavo med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi v sladkorjih in etanolu. Martin in sodelavci (1996a) pa trdijo, da so $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti določene v sladkorjih lahko višje tudi za 1 ‰, glede na vrednosti določene v etanolu, kar je posledica izotopske frakcionacije nastalega CO_2 v procesu fermentacije. Ta trend lahko opazimo tudi v meritvah opravljenih v izbranih komercialnih sadnih sokovih. Razlika med $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih in etanolu je prisotna pri vseh pretvorbah sladkorja v etanol in so zato rezultati med seboj primerljivi.

Tudi v naših raziskavah smo poskušali z uporabo linearne regresije preveriti, kakšno je dejansko ujemanje opravljenih meritev. Rezultat je predstavljen na sliki 20.

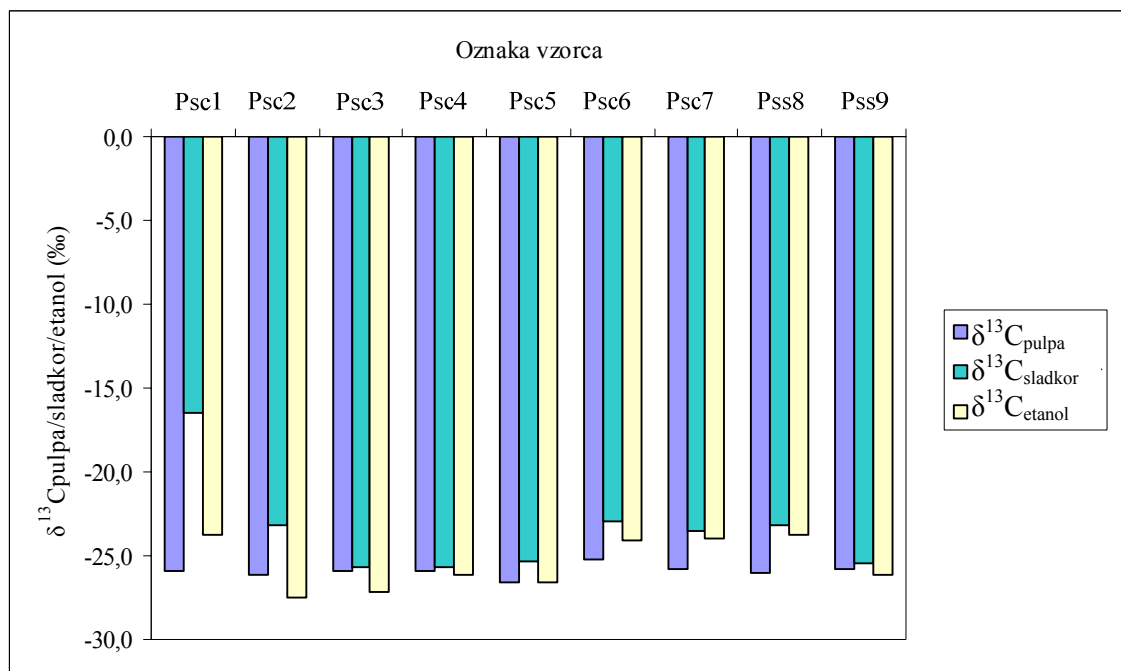


Slika 20: Zveza med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorju in etanolu izbranih komercialnih sokov

Zveza med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorju in etanolu opisuje regresijski model $y = 1,1071x + 1,3422$, koeficient determinacije za ta regresijski model pa znaša 0,94. Kar pa nas je najbolj zanimalo, je korelacijski koeficient, ki nam daje neposredni podatek o povezanosti obeh vrednosti. V primeru linearne regresije ga izračunamo kot kvadratni koren regresijskega koeficienta in v danem primeru znaša 0,97, kar potrjuje našo domnevo, da gre za močno povezanost med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorjih in etanolu. Razvidno je, da so razlike med $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih in etanolu nekoliko višje, vendar še vedno v sprejemljivem območju, in znašajo 1,34 ‰.

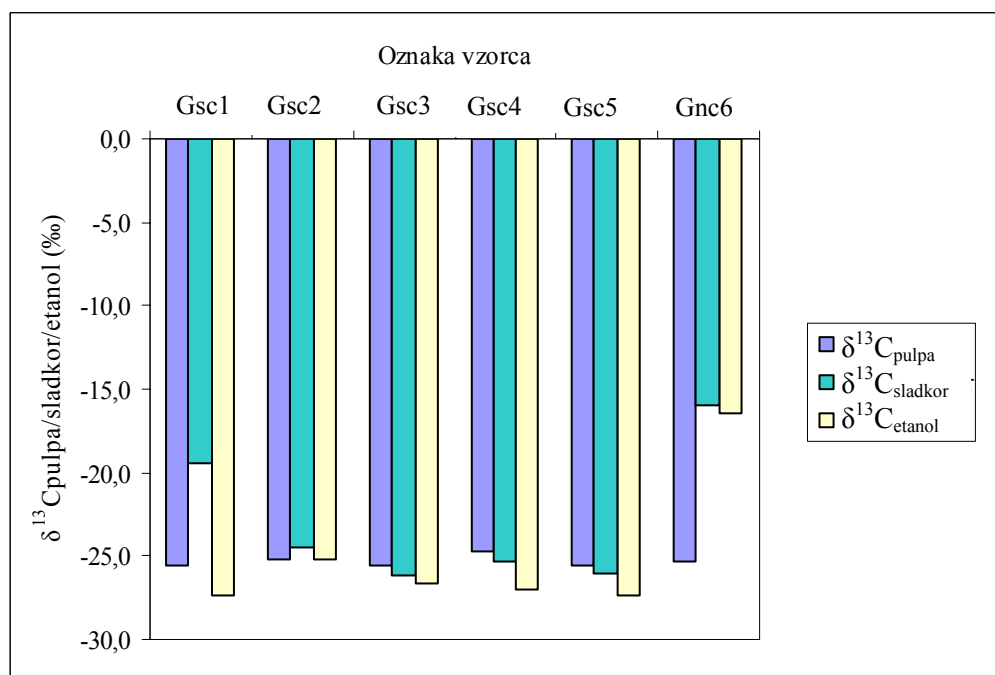
Kot dopolnilno metodo za potrjevanje avtentičnosti smo izbrali določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi. Obstaja namreč velika verjetnost, da so $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi in sladkorjih v stalnem razmerju. To dokazujejo podatki, ki jih podajajo Rossman in sodelavci (1997), ki so z notranjim referenčnim postopkom z omenjenimi meritvami dokazali že rlativno majhne količine dodanega sladkorja. Trdijo tudi, da je za pomarančne sokove mejna vrednost razlikovanja med sladkorjem in pulpo za detekcijo dodanega trsnega slakorja 1,25 ‰, medtem ko je uporabna vrednost za sok iz grenivke 1,04 ‰. Če torej primerjamo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih in pulpi, je v pomarančnih sokovih razlika med njima večja kot 1,25 ‰ v dveh ciprskih vzorcih z oznakama Psc6 in Psc7 ter v enem slovenskem, ki ima oznako Pss8. Razlika se v teh vzorcih giblje med -2,8 in -2,2 ‰. Te vrednosti nakazujejo, da je bila sokom dodana manjša količina trsnega sladkorja, kar proizvajalec ni zapisal na deklaracijski nalepki.

Za lažje primerjanje v pulpi, sladkorjih in etanolu določenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, smo tudi za pomarančni sok in sok iz grenivke izrisali stolpični diagram v programu Microsoft office Excel 2003.



Slika 21: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za pomarančne sokove

Kot lahko vidimo na sliki 21, se vrednosti najbolj ujemajo pri vzorcih z oznakami Psc3, Psc4, Psc5 in Pss9, ostali pa nekoliko manj. Pri vzorcu Psc1 sklepamo na to, da je pri pripravi vzorca ali določanju izotopskega razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v sladkorjih prišlo do napake, saj sta vrednosti zmerjeni v pulpi in etanolu precej podobni.



Slika 22: Primerjava izmerjenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za sokove in nektar iz grenivke

Grafikon na sliki 22 prikazuje, da se izmerjene $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu za sokove iz grenivke dobro ujemajo pri vseh vzorcih, razen pri vzorcih z oznakama Gsc1 in Gnc6. Pri vzorcu Gsc1 lahko sklepamo, da je ponovno prišlo do napake, ker se razlikuje meritev le pri $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorju, medtem ko je vzorec Gnc6 nektar iz grenivke, v katerem je lahko dodana katerakoli vrsta sladkorja.

4.3.1.1 Trikotnik potvorb za pomarančne in grenivkine sokove

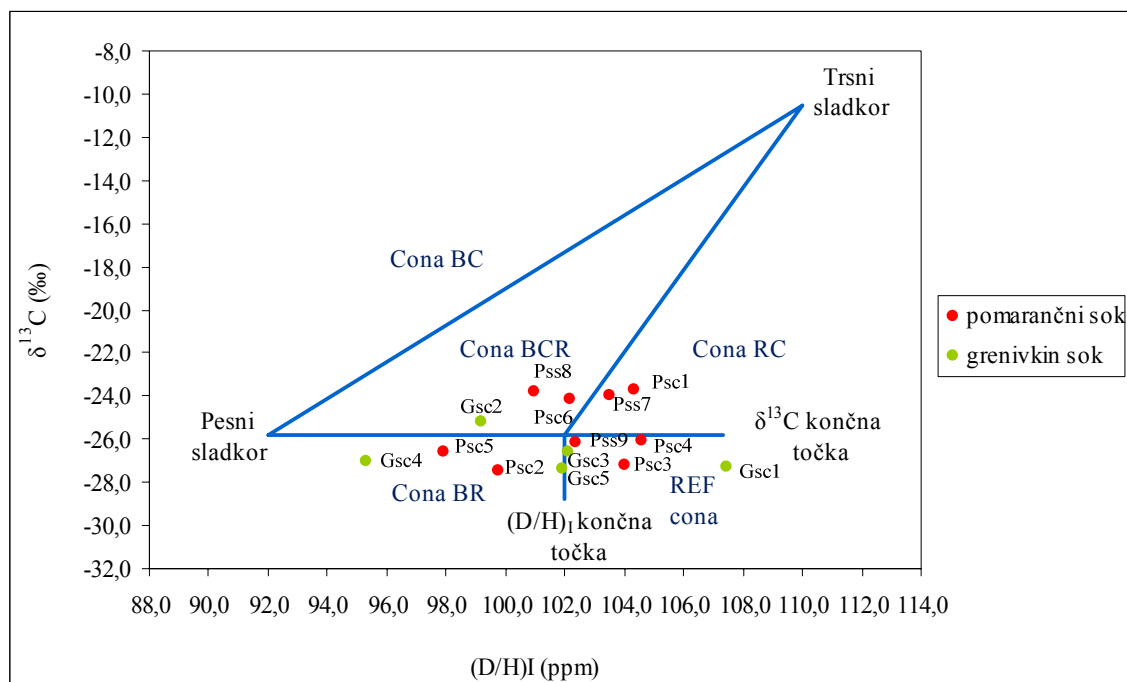
Ko poleg $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v etanolu z metodo SNIF-NMR določimo še vrednosti $(\text{D}/\text{H})_I$, lahko izrišemo trikotnik potvorb, s katerim lahko z gotovostjo potrdimo ali ovržemo deklarirano avtentičnost 100 % sokov.

Za izris trikotnika potvorb pa potrebujemo tudi rezultate meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $(\text{D}/\text{H})_I$ v etanolu, ki smo ga pridobili z destilacijo fermentiranih sveže iztisnjenih sokov.

Preglednica 15: Izmerjene vrednosti $(\text{D}/\text{H})_I$ in $\delta^{13}\text{C}$ v etanolu, pridobljenim iz sladkorjev sveže iztisnjenih sokov

Botanični izvor	$(\text{D}/\text{H})_I$ etanol (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ etanol (‰)
pomaranča	105,6	-26,0
pomaranča	107,7	-28,1
pomaranča	105,8	-26,6
pomaranča	104,5	-26,9
pomaranča	104,0	-25,8
mandarina	101,0	
mandarina	109,2	-29,4
mandarina	106,0	-29,0
mandarina	106,5	-27,5
grenivka	101,7	-27,8
grenivka	104,9	
grenivka	103,7	-28,3
grenivka	105,1	
Povprečje	105,0	-27,5
Povprečni standardni odklon	$\pm 2,2$	$\pm 1,2$

Trikotnik potvorb za pomarančni sok in sok iz grenivke, ki imata isti botanični izvor predstavlja slika 23. Za jabolčni in ananasov sok tega načina interpretacije rezultatov ne moremo narediti, saj nimamo podatkov za avtentične sokove.



Slika 23: Trikotnik potvorb za pomarančne in grenivkine sokove

Glede na lego točk v trikotniku potvorb lahko zaključimo, da trditev, ki so jo proizvajalci zapisali na deklaracijski nalepki, torej da je sok 100 %, drži le za vzorce pomarančnih sokov z oznakami Psc3 in Psc4 ter Pss9, med sokovi iz grenivke pa za tiste z oznakami Gsc1, Gsc3 in Gsc5. Na dodatek trsnega sladkorja lahko sklepamo pri dveh pomarančnih sokovih, in sicer Psc1 in Pss7, medtem ko lahko za vzorce Psc2 in Psc5 ter Gsc4 sumimo na dodatek pesnega sladkorja. Cona BCR, v kateri ležijo izmerjene vrednosti vzorcev Psc6, Pss8 in Gsc2 pa pomeni, da je bil vzorcem dodan mešani sladkor, torej pesni in trsni.

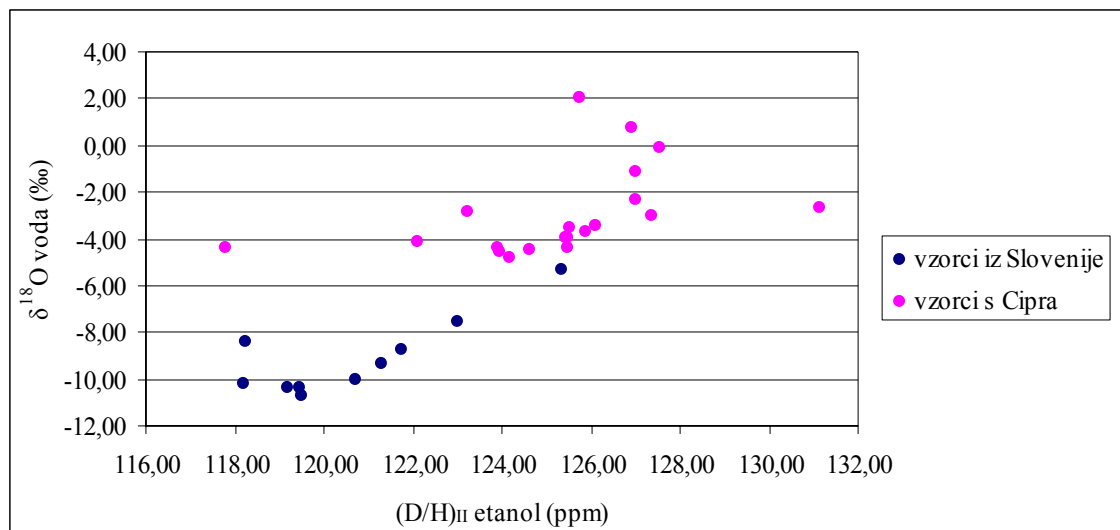
4.3.2 Rezultati določanja potvorb z vodo in geografskega porekla sadnih sokov

Za določanje avtentičnosti oziroma potvorb pa niso pomembne samo $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorju in etanolu ter $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ v etanolu, temveč tudi $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ v etanolu. Ti dve vrednosti nam namreč kažeta na geografsko poreklo analiziranih vzorcev. S primerjanjem $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi pa določimo tudi potvorbe sokov z vodo, sklepamo pa lahko tudi na to ali je bil sok pripravljen iz sveže iztisnjenega sadja ali iz zgoščenega sadnega soka. Rezultati meritev $\delta^{18}\text{O}$ v vodi in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ v etanolu so podani v preglednici 13.

Preglednica 16: Izmerjene vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ v vodi in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ v etanolu izbranih komercialnih sokovih iz Slovenije in s Cipra

Oznake vzorcev komercialnih sokov	$\delta^{18}\text{O}$ voda (‰)	$(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ etanol (ppm)
Psc1	-0,1	127,6
Psc2	-2,9	123,3
Psc3	-3,1	127,4
Psc4	-3,9	125,5
Psc5	-4,4	125,5
Psc6	-4,2	122,1
Psc7	2,0	125,8
Pss8	-8,4	118,2
Pss9	-7,5	123,0
Jsc1	-3,6	125,5
Jsc2	-4,4	123,9
Jsc3	-2,4	127,0
Jsc4	-4,8	124,2
Jss5	-8,7	121,7
Jss6	-10,0	120,7
Jss7	-5,3	125,4
Jns8	-10,2	118,2
Jns9	-10,4	119,2
Jns10	-10,7	119,5
Jns11	-10,4	119,5
Jns12	-9,4	121,3
Gsc1	-2,7	131,2
Gsc2	-3,5	126,1
Gsc3	-4,6	123,9
Gsc4	-4,0	125,5
Gsc5	-3,7	125,9
Gnc6	0,7	126,9
Asc1	-4,4	117,8
Asc2	-4,5	124,6
Asc3	-1,1	127,0

Da bi lažje predstavili razlike med slovenskimi in ciprskimi sadnimi sokovi smo s pomočjo Microsoftovega programa Excel izrisali razsewni grafikon, ki je predstavljen na sliki 24.



Slika 24: Vpliv geografskega porekla na vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ v vodi in $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ v etanolu

Kot lahko opazimo na sliki 21, se izmerjene $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi v slovenskih in ciprskih sadnih sokovih in nektarjih kar precej razlikujejo. Razlog za povprečno višje vrednosti v ciprskih sokovih je iskati predvsem v višjih povprečnih letnih temperaturah ter bolj sušnih klimatskih razmerah, ki so značilne za otok Ciper. Torej se padavine in posledično voda, ki jo rastline črpajo, bogati s težjim izotopom kisika.

V slovenskih sokovih in nektarjih se izmerjene vrednosti sicer gibljejo med -10,7 in -5,3 ‰, v povprečju pa nekje okrog -9,0 ‰. Vrednost -5,3 ‰, ki smo jo določili v jabolčnem soku z oznako Jss7, skupaj z $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo, določeno v sladkorjih tega komercialno dostopnega soka, dokazujeta, da je to zagotovo avtentični sok, izdelan iz jabolk.

V ciprskih sokovih in nektarjih pa smo najnižjo vrednost namerili v jabolčnem soku in sicer -4,8 ‰, najvišjo pa v pomarančnem, kar 2,0 ‰. V povprečju pa se v ciprskih sokovih vrednosti gibljejo med -2,0 in -4,0 ‰.

5 SKLEPI

Iz rezultatov analiz za ugotavljanje karakterizacije oziroma pristnosti sadnih sokov, lahko povzamemo naslednje sklepe:

- V primeru dodanega trsnega sladkorja ali mešanice sladkorjev, ki trsni sladkor vsebujejo, je obstajala močna povezanost med maso in vrsto dodanega sladkorja ter izotopsko sestavo ogljika v sladkorjih. V primeru dodanega pesnega sladkorja pa je bila povezanost med maso in vrsto dodanega sladkorja ter $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo v sladkorjih le zmerna. Iz tega lahko sklepamo, da potvorb s pesnim sladkorjem, razen potvorbe ananasovega soka, ki spada med rastline s CAM ciklom z metodo IRMS, ne moremo določiti, lahko pa določimo potvorbe, pri katerih je bil dodan trsni sladkor ali mešanica, ki je le tega vsebovala.
- Dodatek vode v avtentični sok je vplival na spremembo $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi, ki jo sok vsebuje, in sicer tako, da se je $\delta^{18}\text{O}$ vrednost znižala. Ugotovili smo, da je povezanost med volumnom dodane vode ter izotopsko sestavo kisika v vodi $\delta^{18}\text{O}$ izredno močna.
- Med slovenskimi in ciprskimi sadnimi sokovi in nektarji nismo opazili razlik v sladkorni stopnji. Vrednosti, določene v analiziranih sokovih, so se gibale med 10,3 in 13,1 °Brix.
- Vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze se v slovenskih in ciprskih pomarančnih sokovih niso bistveno razlikovale in so ustrezale vrednostim, ki so zapisane v prehranskih tabelah Soucija in sodelavcev (2000, 2008). V jabolčnih sokovih smo določili bistveno večjo vsebnost fruktoze, kot ostalih dveh sladkorjev, zelo majhna je bila vsebnost saharoze. V analiziranih vzorcih se je vsebnost fruktoze gibala med 5,79 g/100 ml in 7,07 g/100 ml, vsebnost saharoze pa med 0,68 g/100 ml in 2,00 g/100 ml. Glede na primerjavo izmerjenih in literaturnih podatkov o vsebnosti sladkorjev sklepamo, da sta bila med ciprskimi jabolčnimi sokovi potvorjena dva vzorca (Jsc2 in Jss5). Razlike med vsebnostmi glukoze, fruktoze in saharoze v nektarjih niso več značilne, saj so le ti lahko po pravilniku dosladkani, domena proizvajalca pa je, s kakšnim sladkorjem bo to izvršil. V soku iz grenivke je bila vsebnost glukoze in fruktoze približno enaka, okrog 3,00 mg/100 ml, medtem ko je bila vsebnost saharoze približno za pol manjša. Vsebnosti saharoze v vzorcih ananasovih sokov so se gibale med 3,72 in 4,64 g/100 ml, vsebnosti glukoze in fruktoze pa so bile nekoliko manjše od vsebnosti saharoze.
- Skupna vsebnost sladkorjev je pojasnila le 22 % variance sladkorne stopnje. Zveza med vsebnostjo glukoze, fruktoze in saharoze ter sladkorno stopnjo pa je bila zmerna.
- Glede na izmerjene $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih v izbranih komercialnih sokovih sklepamo, da je bil šestim vzorcem (Psc1, Psc6, Jsc2, Jns9, Jsc11, Gnc6) dodan trsni sladkor, pri čemer so bili med njimi trije vzorci (Psc1, Psc6, Jsc2) deklarirani kot 100 % naravni oziroma čisti sok.

- Na podlagi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi in v sladkorjih sadnih sokov smo ugotovili, da je razlika med njima v pomarančnih sokovih večja kot 1,25 ‰ v dveh ciprskih vzorcih (Psc6 in Psc7) ter v enem slovenskem (Pss8). Razlika se je v teh vzorcih gibala med -2,8 in -2,2 ‰, kar nakazuje na dodatek manjše količine trsnega sladkorja, česar pa proizvajalec ni zapisal na deklaraciji.
- Med ciprskimi ananasovimi sokovi je bil, glede na meritve $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in etanolu ter njihovo primerjavo z navedbami v literaturi, avtentičen le en sok (Asc3). Pri ostalih lahko sklepamo na dodatek pesnega sladkorja, kar pa ni bilo označeno na deklaraciji.
- Na podlagi kombinacije meritev, ki vključujejo $\delta^{13}\text{C}$ in $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ v etanolu, smo dokazali, da trditev, da je sok 100 %, drži le za tri vzorce pomarančnih sokov (Psc3 in Psc4 ter Pss9) in tri vzorce sokov iz grenivke (Gsc1, Gsc3 in Gsc5). Na dodatek trsnega sladkorja smo lahko sklepali pri dveh vzorcih pomarančnih sokov (Psc1 in Psc7), na dodatek pesnega sladkorja pri dveh vzorcih pomarančnih sokov (Psc2 in Psc5) in enem vzorcu soka iz grenivke (Gsc4), na dodatek mešanega sladkorja pa pri dveh vzorcih pomarančnih sokov (Psc6 in Pss8) in enem granivkinem soku (Gsc2).
- Izmerjene $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi v slovenskih in ciprskih sadnih sokovih in nektarjih so se kar precej razlikovale. V slovenskih sokovih in nektarjih so bile izmerjene vrednosti med -10,7 in -5,3 ‰ (povprečno okrog -9,0 ‰), medtem ko so bile v ciprskih sokovih omenjene vrednosti med -2,0 in -4,0 ‰. Vzporedno z višjimi $\delta^{18}\text{O}$ vrednostmi smo opazili v ciprskih sokovih tudi višje vrednosti razmerij $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$.

6 POVZETEK

Potvorjenost prehrabnih izdelkov predstavlja pereč problem na tržišču tako v Evropski Uniji kot tudi v svetu. Poleg ostalih prehrabnih izdelkov je tudi potvorjenost sadnih sokov pomembna iz ekonomskega vidika, saj je potrošnja sadnih sokov velika. Najbolj obsežne potvorbe sadnih sokov so: redčenje z vodo, dodatek sladkorjev, dodajanje citronske in vinske kisline ter različnih barvil in nenazadnje dodajanje cenejših sokov, kot na primer sok grenivk, čistemu soku. Za določanje potvorb se uporabljajo različne metode, med katerimi je še posebej učinkovita uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov.

V našo raziskavo je bilo vključenih 29 vzorcev sokov in nektarjev, od katerih je bilo iz Slovenije 5 sokov in 5 nektarjev, s Cipra pa 18 sokov in 1 nektar. Med vzorci so bili pomarančni in jabolčni sokovi iz obeh držav, iz Slovenije pa tudi jabolčni nektarji. Poleg tega pa so bili med izbranimi vzorci s Cipra še sokovi in nektar iz grenivke ter ananasovi sokovi. Vzorci ciprskih sokov/nektarjev so bili izbrani zaradi proučevanja vpliva različnega tržišča in podnebnih značilnosti, predvsem pa zato, ker je diplomatska naloga del mednarodnega, bilateralnega projekta med Ciprom in Slovenijo. Tako smo poleg ugotavljanja pristnosti/potvorjenosti iskali tudi značilnosti slovenskih oziroma ciprskih sadnih sokov.

Za potrditev postavljene hipoteze, da z izbranimi metodami lahko uspešno dokažemo pristnost/potvorjenost sadnih sokov, smo najprej izvedli dva ločena poizkusa s 100 % jabolčnim sokom, v katerega smo ločeno dodajali vodo in sladkor. Z metodo masne spektrometrije smo opazovali spreminjanje izotopske sestave ogljika $\delta^{13}\text{C}$ sladkorjev izoliranih iz sadnega soka in spreminjanje izotopske sestave kisika $\delta^{18}\text{O}$ v vodi. Kot smo predvidevali, se je izotopsko razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ povečalo glede na količino in vrsto dodanega sladkorja, kar lahko opišemo s preprostimi linearnimi zvezami. Na osnovi vrednosti koeficienta korelacije (r), ki je pri linearni zvezi enak kvadratnemu korenu determinacijskega koeficienta, smo ovrednotili stopnjo povezanosti obeh spremenljivk, ki je v primeru trsnega sladkorja ter mešanice trsnega in pesnega razmerja enkrat v razmerju 50:50, drugič pa 30:70, zelo visoka, v primeru pesnega sladkorja pa le zmerna. Glede na dobljene rezultate lahko tudi potrdimo, da potvorb sadnih sokov, razen ananasovega soka, s pesnim sladkorjem, ne moremo določiti, saj tako sladkorna pesa kot večina sadnih rastlin spada v skupino C_3 rastlin. Z meritvami $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi iz Ajdovščine in vodi iz Instituta Jožefa Stefana v Podgorici smo pokazali vpliv geografskega porekla na izotopsko sestavo kisika v vodi. Z dodajanjem vode avtentičnemu soku smo pokazali, da se izotopsko razmerje $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ zmanjšuje s povečevanjem količine dodane vode. Zveza med $\delta^{18}\text{O}$ vrednostjo in volumnom dodane vode je bila zelo tesna. Poleg merjenja smo $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti in $\delta^{13}\text{C}$ tudi izračunali in ugotovili, da so izmerjene vrednosti v okviru eksperimentalne napake, s čemer smo potrdili, da IRMS ni samo hitra, temveč tudi zelo natančna metoda.

V analiziranih sokovih in nektarjih je bila najprej izmerjena vsebnost sladkorjev z metodo HPLC. Nato smo z metodo IRMS določili $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih, izoliranih iz sadnih sokov, in kjer je bilo mogoče, tudi v pulpi ter $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v vodi. Vzorci so bili nato fermentirani in destilirani. V etanolu, ki smo ga dobili po destilaciji, smo določili izotopsko sestavo ogljika $\delta^{13}\text{C}$ z metodo IRMS ter vodika (D/H) z metodo SNIF-NMR. Zaradi primerjave s komercialnimi sokovi smo pripravili tudi sokove iz svežih pomaranč in grenivk. Tudi te vzorce smo fermentirali in destilirali. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in NMR parametre pa smo določili le v etanolu.

Z določanjem vsebnosti sladkorjev in primerjavo z rezultati v prehranski tabeli smo pokazali na tipične značilnosti posameznih vrst sokov. V ciprskih, predvsem pa v slovenskih pomarančnih sokovih, je bilo med sladkorji največ saharoze (v slovenskih okrog 2,70 g /100 ml, v ciprskih med 2,41 in 3,20 g/100 ml). Za jabolčne sokove je bila značilna zelo velika vsebnost fruktoze, med 5,79 in 7,07 g/100 ml. Razlike med vsebnostmi glukoze, fruktoze in saharoze se v nektarjih zabrišejo, saj so le ti lahko po pravilniku dosladkani. V sokovih in nektarju iz grenivke je bila vsebnost glukoze in fruktoze približno enaka, okrog 3,00 mg/100 ml, vsebnost saharoze pa približno pol manjša. V ciprskih vzorcih ananasovih sokov je bila vsebnost saharoze med 3,72 in 4,64 g/100 ml, opazno večja kot vsebnost glukoze in fruktoze; enako navedbo smo zasledili tudi v literaturi. Če izvezemo nektarje, so se torej izmerjene vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze ujemale s podatki v prehranskih tabelah Soucija in sodelavcev (2008, 2000). Izjema so bili: vzorec pomarančnega soka z oznako Psc5 ter vzorca jabolčnega soka Jsc2 in Jss5, pri čemer lahko trdimo, da je bil v vzorce z oznakami Jsc2 ter Jns9 in Jns11 dodan trdni sladkor.

Odvisnost sladkorne stopnje od vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v analiziranih sokovih in nektarjih, ne glede na vrsto, smo opisali z regresijskim modelom $y = 0,2383x + 9,2816$. Določeni koeficient determinacije (r^2) je bil v tem primeru 0,22, vrednost korelacijskega koeficienta (r) pa je bila 0,47, kar kaže na zmerno povezanost med vsebnostjo glukoze, fruktoze in saharoze ter sladkorno stopnjo.

Po primerjavi izmerjenih vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in etanolu, lahko sklepamo, da je bil med ananasovimi sokovi avtentičen samo vzorec z oznako Asc3, v ostala dva pa je bil dodan pesni sladkor. Za pomarančne in grenivkine sokove smo izrisali tudi trikotnik potvorb, s pomočjo katerega smo pokazali, da so bili med analiziranimi vzorci 100 % sokovi (kot je pisalo na deklaraciji) le po 3 vzorci pomarančnih in grenivkinih sokov. Na dodatek trsnega sladkorja smo sklepali pri dveh vzorcih pomarančnih sokov, medtem ko smo pri dveh vzorcih pomarančnih sokov in enem vzorcu grenivkinih sokov pokazali na dodatek pesnega sladkorja in prav tako pri dveh vzorcih pomarančnih sokov in enem vzorcu grenivkinih sokov pokazali na dodatek mešanega sladkorja.

Izmerjene vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ v vodi so se v slovenskih in ciprskih sadnih sokovih in nektarjih kar precej razlikovale. V slovenskih sokovih in nektarjih so bile izmerjene vrednosti med -

10,7 in -5,3 ‰, v povprečju okrog -9,0 ‰, medtem ko so bile v ciprskih sokovih $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti višje, med -2,0 in -4,0 ‰. To si razlagamo predvsem v višjih povprečnih letnih temperaturah ter bolj sušnih klimatskih razmerah, ki so značilne za otok Ciper, zaradi česar se padavine in posledično voda, ki jo rastline črpajo, bogati s težjim izotopom kisika.

Na podlagi rezultatov predstavljenih v diplomski nalogi lahko vidimo, da komercialno dostopni sadni sokovi ne ustrezajo vedno označbam oziroma deklaracijam na embalaži. Potvorjenost sadnih sokov ne moremo vedno določiti samo na podlagi pravilnikov, ki trenutno obstajajo in vključujejo standardne analitske metode. Z rezultati analiz smo ugotovili, da potvarjanje sadnih sokov z dodajanjem sladkorja ali vode lahko z gotovostjo potrdimo le s kombinacijo meritev izotopske sestave in vključujejo IRMS in SNIF-NMR metode. Tovrstne meritve niso pomembne samo za določanje potvorjenosti, temveč tudi za določitev geografskega porekla prehrabnega izdelka in s tem za zaščito države kot proizvajalke. Nadalje je treba poskrbeti, da se zakoni in pravilniki stalno dopolnjujejo in razširjajo z novimi metodami in tako omogočiti zaščito potrošnika in njegovega zdravja.

7 VIRI

Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 27-39, 44-48, 113-122, 157

AIJN – Association of the Industry of Juices and Nectars. 1993. Individual reference guidelines – pineapple. V: Code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices. Brussels, Association of the Industry of Juices and Nectars from fruits and vegetables of the European Community: 14-16

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

AOAC official method 982.21. Carbon stable isotop ratio of orange juice. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International.. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gainthersburg, AOAC International, Chapter 37: 20-21

Bartol T., Bradač J., Hočevar I., Koler-Povh T. Siard N., Stopar K. 2001. Navodila za oblikovanje pisnih diplomskih in podiplomskih izdelkov na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-21

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 405, 478-480

Brause A. R., Ratermab J. M. 1982. Verification of authenticity of apple juice. Journal of AOAC, 65, 4: 846-849

Bréas O., Reniero F., Serrini G. 1994. Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different european countries. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 8: 967-970

Bricout J., Koziat J. 1987. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 758-760

Calderone G., Guillou C. 2008. Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. Food Chemistry, 106: 1399-1405

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

Day M. P., Correia P., Hammond D. A. 2001. ¹³C-IRIS: An improvement method to detect the addition of low levels of C₄-derived sugars to juices. Journal of AOAC International, 84, 3: 957-963

Dennis M. J. 1997. Establishing food authenticity. *Chemistry & Industry*: 997-1000

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

Doner L. W., Brause A. R., Petrus D. R. 1992. $\delta^{18}\text{O}$ measurements in water for detection of sugar beet-derived syrups in frozen concentrated orange juice: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 6: 1107-1111

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

Epstein S., Mayeda T. K. 1953. Variation of ^{18}O content of waters from natural sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 213-224

Farquhar G. D., Ehleringer J. R., Hubick K. T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 504-505

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

Guček M., Marsel J., Ogrinc N., Lojen S. 1998. Stable isotopes determinations in some fruit juices to detect added sugar. *Acta Chimica Slovenica*, 45, 3: 217-228

Gvozdenović D. 1989. Od obiranja sadja do prodaje. Ljubljana, Kmečki glas: 10-11

Hall D. O., Rao K. K. 1999. *Photosynthesis*. 6th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 113-115

Jamin E., Gonzalez J., Bengoechea I., Kerneur G., Remaud G., Naulet N., Martin G. G. 1998. Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of sugars, malic acid, and citric acid as authenticity probes of citrus juices and concentrates. *Journal of AOAC International*, 81, 3: 604-609

Jamin E., Gonzalez J., Remaud G., Naulet N., Martin G. G. 1997a. Detection of exogenous sugars or organic acids addition in pineapple juice and concentrates by ^{13}C IRMS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3961-3967

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

Jamin E., Martin F., Martin G. G. 2004. Determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of ethanol derived from fruit juices and maple syrup by isotope ratio mass spectrometry: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 87, 3: 621-631

Kelly S. D., Rhodes C. 2002. Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 53, 1: 34-44

Kerin D. 1988. Sadje v naši prehrani. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 5 str.

Kodele M. 1989. Hranoslovje. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 61-62

Košir I. J. 2001. Karakterizacija vin z NMR spektroskopijo visoke ločljivosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 17-30

Košir I. J. 2005. Ugotavljanje avtentičnosti vina s pomočjo NMR spektroskopije in kemometričnih metod. V: Sledljivost živil. 23. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 31. marec in 1. april 2005. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-192

Košir I. J., Kocjančič M., Ogrinc N., Kidrič J. 2001. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (The example of Slovenian wines). *Analytica Chimica Acta*, 429, 2: 195-206

Kordiš Krapež M., Štrancar A. 2005. Določanje kemijskih markerjev za sledenje živil s HPLC. V: Sledljivost živil. 23. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 31. marec in 1. april 2005. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51-60

Koren I. 1989. Določanje prvin kakovosti jabolčnih koncentratov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, VTOZD za živilko tehnologijo: 4-7

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 48 str.

Koziet J., Rossman A., Martin G. J., Ashurst P. R. 1993. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices: A European inter-laboratory comparison. *Analytica Chimica Acta*, 271: 31-38

Koziet J., Rossman A., Martin G. J., Johanson P. 1995. Determination of the oxygen-18 and deuterium content of fruit and vegetable juice water: An European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta*, 302: 29-37

Kreger I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 615-616

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

Larcher W. 2001. Physiological plant ecology. 4th ed. Berlin, Springer: 77-78, 83-84

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

Lovrić T., Piližota V. 1994. Konzerviranje i prerada voća i povrća. Zagreb, Nakladni zavod Globus: 83-99

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

Martin G. G., Hanote V., Lees M., Martin Y.-L. 1996a. Interpretation of combined ²H SNIF/NMR and ¹³C SIRA/MS analyses of fruit juices to detect added sugar. Journal of AOAC International, 79, 1: 62-72

Martin, G. J., Kozić, A., Rossman, A., Dennis, J. 1996b. Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determination by deuterium NMR. An European inter-laboratory comparison study. Analytica Chimica Acta, 321: 137-146

Martin G. G., Wood R., Martin G. J. 1996c. Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juice by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR method): Colaborative study. Journal of AOAC International, 79, 4: 917-928

Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. 2003. High-performance liquid chromatography. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 2. Caballero B, Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). 2nd ed. Amsterdam, Academic Press: 1274-1275

Ogrinc N., Košir I. J., Kidrič J. 2002. Use of modern NMR and MS methods in the analysis of beverages. Research Advances in Agricultural and Food Chemistry, 3: 1-15

Ogrinc N., Košir I. J., Spangenberg J. E., Kidrič J. 2003. The application of NMR and MS methods to detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 376: 424-430

Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in določenih istovrstnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 31: 3608-3610

Pravilnik o kakovosti sadnih sokov in podobnih sadnih izdelkov. 2001. Uradni list Republike Slovenije, 11, 9: 844-849

Rossman A., Koziat J. Martin G. J., Dennis M. J. 1997. Determination of the carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method). A European interlaboratory comparison. *Analytica Chimica Acta*, 340: 21-29

Rossman A., Reniero F., Moussa I., Schmidt H.-L., Versini G., Merle H. M. 1999. Stable oxygen isotope content of water of EU data-bank wines from Italy, France and Germany. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 208: 400-407

Seljak J. 1996. Statistične metode. Ljubljana, Visoka upravna šola univerze v Ljubljani: 197-199

Simpkins W. A., Patel G., Harrison M., Goldberg D. 2000. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. *Food Chemistry*, 70: 385-390

Souci S. W., Fachmann W., Kraut H., Scherz H., Senser F. 2000. Food composition and nutrition tables. 6th ed. Stuttgart, Medpharm scientific publ.: 1032-1042

Souci S. W., Fachmann W., Kraut H., Kirchhoff E. 2008. Food composition and nutrition tables. 7th ed. Stuttgart, Medpharm scientific publ.: 1197-1208

SPSS software for windows. Version 11.0.0.2001. Chicago, SPSS: software

Suwa Stanojević M. 1995. Tehnologija sadja in vrtnin. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo in šport: 14-15, 134-136

Šafar F., Snoj J. 1973. Mala splošna enciklopedija. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 661 str.

Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Massachusetts, Sinauer Associates, Publishers: 215 - 216

Uno G., Storey R., Moore R. 2001. Principles of botany. New York, The McGraw Hill Companies: 240-241, 245-249

Versini G., Monetti A., Reniero F. 1997. Monitoring authenticity and regional origin of wines by natural stable isotope ratios analysis. V: Wine: nutritional and therapeutic benefits: developed from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry, at the 210th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, August 20-24, 1995. Watkins T. R. (ed.). Washington, American Chemical Society: 113 - 130

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 65-67

ZAHVALA

Najprej gre zahvala mentorici prof. dr. Tereziji Golob strokovno pomoč, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela

Še posebej hvala somentorici doc. dr. Nives Ogrinc. Poleg izjemnega strokovnega dela, ki ga je opravila, je med nastajanjem te diplomske naloge postala moja iskrena svetovalka in zaupnica.

Za opravljeno recenzetsko delo se zahvaljujem doc. dr. Rajku Vidrihu.

Hvala tudi celotnemu osebju Odseka za znanosti o okolju, Reaktorskega centra Instituta Jožefa Stefana v Podgorici, ki me je že prvi dan mojega raziskovalnega dela sprejelo medse. Še posebej hvala g. Stojanu Žigonu in gđč. Nini Ogrinc za vso pomoč pri mojem delu.

Za raziskovalno delo, ki je postalo del te diplomske naloge se zahvaljujem tudi dr. Iztoku Jožetu Koširju in celotnemu Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu ter dr. Rebeci Kokkinofa in njenim sodelavcem Državnega centralnega laboratorija Ministrstva za zdravje na Cipru.

Za pomoč in koristne nasvete gre zahvala tudi asistentkama Mojci Jamnik in mag. Petri Grošelj ter mag. Irmi Koren.

Knjižnično – informacijskemu osebju knjižnice na Oddelku za živilstvo za pomoč pri zbiranju in urejanju literature, prav tako hvala.

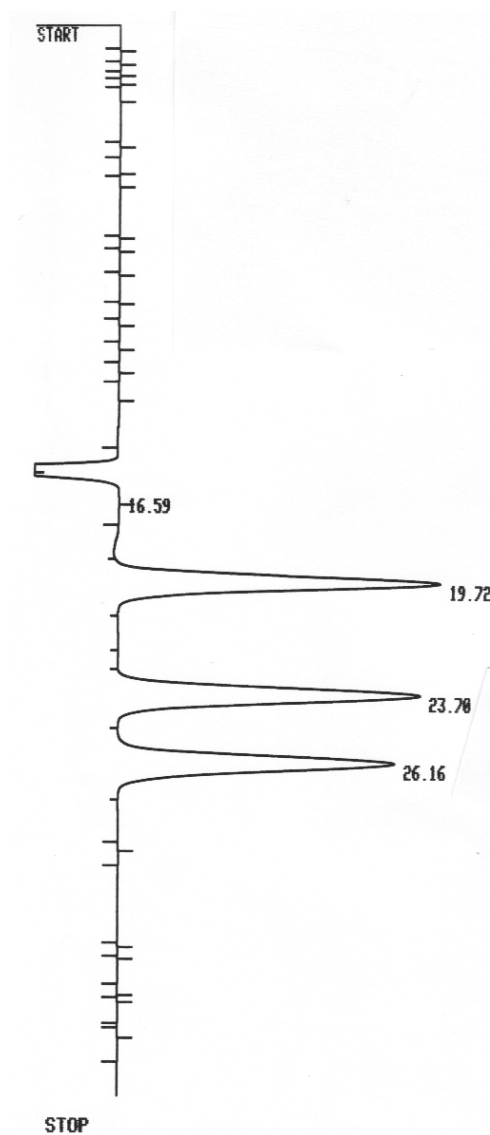
Zahvala gre tudi Pavlini Bizjak za opravljen natančen lektorski pregled.

Hvala Anici in Marjanu Bat za gostoljubje in prijaznost ter izredno pomoč v času mojega študija in bivanja v Ljubljani.

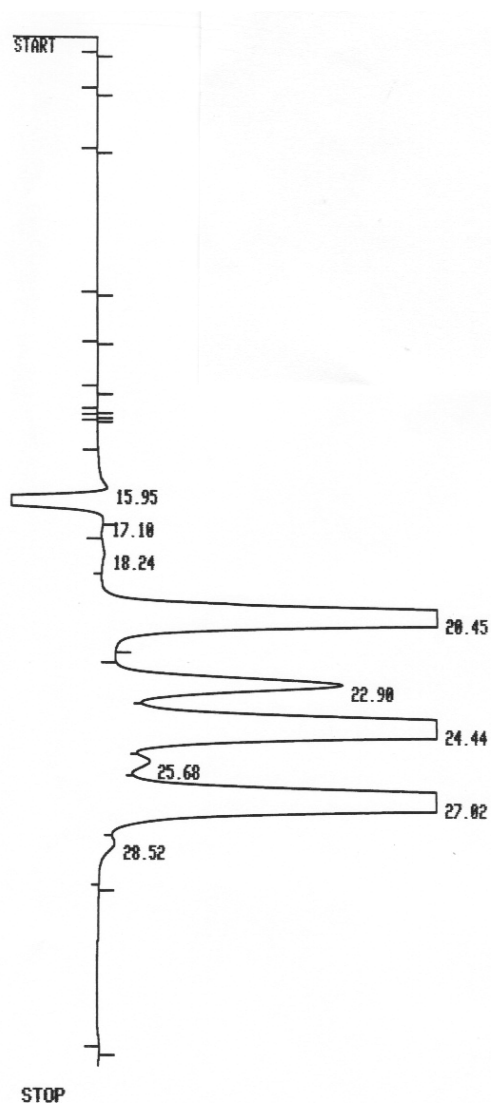
Mojim staršem, mami Dragici in očetu Franju, sestri Klementini in bratu Matjažu ter noni Silvi hvala, ker ste mi stali ob strani, ne samo v času študija, ampak že vse življenje. Vaša prisotnost v njem je neprecenljiva. Hvala tudi vsem ostalim sorodnikom in prijateljem za vse spodbudne besede brez katerih bi bilo zagotovo veliko težje.

Nazadnje hvala tudi tebi Blaž, ker me sprejemaš tako kot sem in ob meni vztrajaš že 9 let. V vseh mojih vzponih in padcih si verjel vame, me optimistično spodbujal ter mi nesebično pomagal.

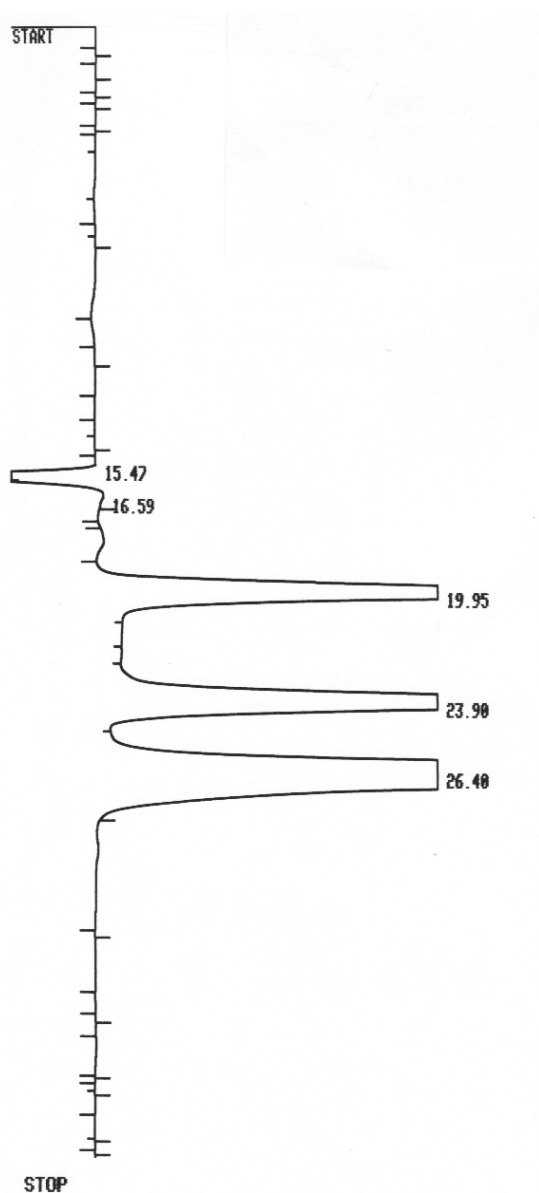
PRILOGE



Priloga A1: Kromatogram standardi



Priloga A2: Kromatogram vzorca z oznako Pss8



Priloga A3: Kromatogram vzorca z oznako Jss5

Priloga B1: Zbrani rezultati meritev opravljenih z metodo HPLC v izbranih komercialnih slovenskih in ciprskih sadnih sokovih

Lab. št. komercialnega vzorca	Oznaka komercialnega vzorca	Sladkorna stopnja (°Brix)	Glukoza (g/100 ml)	Fruktoza (g/100 ml)	Saharoza (g/100 ml)	Vsota (SA+GL+FR) (g/100 ml)
8137	Psc1	11,6	2,07	2,34	2,86	7,27
8139	Psc2	11,2	2,17	2,44	2,42	7,03
8141	Psc3	11,7	2,73	3,07	3,04	8,84
8150	Psc4	11,8	2,74	3,14	3,20	9,08
8152	Psc5	12,8	3,95	4,41	2,41	10,77
8158	Psc6	11,4	2,90	2,70	3,20	8,80
8160	Psc7	12,3	2,49	2,49	3,10	8,08
8164	Pss8	10,9	2,85	3,08	2,71	8,64
8172	Pss9	11,7	2,58	2,79	2,74	8,11
8142	Jsc1	11,7	2,75	6,58	1,35	10,68
8149	Jsc2	11,3	3,30	3,41	1,84	8,55
8154	Jsc3	11,4	2,02	6,73	1,32	10,07
8159	Jsc4	11,3	3,12	5,79	0,68	9,59
8163	Jss5	11,6	2,08	2,14	2,00	6,22
8166	Jss6	11,2	2,77	6,81	1,07	10,65
8173	Jss7	10,3	2,04	7,07	1,68	10,79
8167	Jns8	11,4	2,76	4,14	3,94	10,84
8168	Jns9	10,1	3,32	5,58	0,76	9,66
8169	Jns10	10,9	2,80	3,90	2,00	8,70
8170	Jns11	10,1	3,38	4,45	0,46	8,29
8165	Jns12	10,0	2,20	4,25	2,72	9,17
8138	Gsc1	10,7	2,86	3,02	1,20	7,08
8140	Gsc2	11,9	3,07	3,64	2,12	8,83
8146	Gsc3	10,5	3,12	3,40	1,92	8,44
8151	Gsc4					
8156	Gsc5	10,8	3,30	3,60	1,45	8,35
8135	Gnc6	11,4	3,51	3,83	1,42	8,76
8144	Asc1	12,6	3,28	3,45	3,72	10,45
8148	Asc2	11,2	2,59	2,64	4,64	9,87
8153	Asc3	13,1	3,00	3,52	4,23	10,75

Priloga B2: Zbrani rezultati meritev opravljenih z metodama IRMS in SNIF-NMR v izbranih komercialnih slovenskih in ciprskih sadnih sokovih

Lab. št. komercialnega vzorca	Oznaka komercialnega vzorca	$\delta^{18}\text{O}_{\text{voda}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{pulpa}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{sladkor}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{etanol}}$ (‰)	(D/H) _I (ppm)	(D/H) _{II} (ppm)	R
8137	Psc1	-0,1	-25,9	-16,5	-23,7	104,3	127,6	2,5
8139	Psc2	-2,9	-25,9	-23,2	-27,5	99,7	123,3	2,4
8141	Psc3	-3,1	-26,1	-25,7	-27,2	104,0	127,4	2,5
8150	Psc4	-3,9	-25,9	-25,7	-26,1	104,6	125,5	2,4
8152	Psc5	-4,4	-25,9	-25,3	-26,6	97,9	125,5	2,6
8158	Psc6	-4,2	-26,6	-23,0	-24,1	102,2	122,1	2,4
8160	Psc7	2,0	-25,2	-23,5	-24,0	103,5	125,8	2,4
8164	Pss8	-8,4	-25,8	-23,2	-23,8	101,0	118,2	2,3
8172	Pss9	-7,3	-26,0	-25,5	-26,1	102,4	123,0	2,4
8142	Jsc1	-3,6	-25,8	-25,5	-27,2	99,4	125,5	2,5
8149	Jsc2	-4,4		-21,2	-23,0	98,5	123,9	2,5
8154	Jsc3	-2,4		-25,1		97,0	127,0	2,6
8159	Jsc4	-4,8		-26,5	-27,5	97,9	124,2	2,5
8163	Jss5	-8,7		-26,6	-27,6	97,7	121,7	2,5
8166	Jss6	-10,0		-24,3	-28,2	96,2	120,7	2,5
8173	Jss7	-5,3		-26,8		96,6	125,4	2,6
8167	Jns8	-10,2		-25,8	-26,9	91,4	118,2	2,6
8168	Jns9	-10,4		-18,0	-18,6	101,9	119,2	2,3
8169	Jns10	-10,7		-26,0	-27,8	92,5	119,5	2,6
8170	Jns11	-10,4		-18,1	-18,3	102,6	119,5	2,3
8165	Jns12	-9,4		-26,4	-28,1	93,5	121,3	2,6
8138	Gsc1	-2,7	-25,5	-19,4	-27,3	107,4	131,2	2,4
8140	Gsc2	-3,5	-25,2	-24,5	-25,2	99,2	126,1	2,5
8146	Gsc3	-4,6	-25,5	-26,1	-26,6	102,1	123,9	2,4
8151	Gsc4	-4,0	-24,7	-25,3	-27,0	95,3	125,5	2,6
8156	Gsc5	-3,7	-25,5	-26,0	-27,4	102,0	125,9	2,5
8135	Gnc6	0,7	-25,3	-16,0	-16,5	107,8	126,9	2,4
8144	Asc1	-4,4		-16,6	-15,4	96,6	117,8	2,5
8148	Asc2	-4,5	-12,7	-16,5	-14,9	105,0	124,6	2,4
8153	Asc3	-1,1	-14,0	-12,4	-14,0	106,6	127,0	2,4