

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Robert STIBILJ

**VPLIV ANTIOKSIDANTOV V EKSTRAKTIH ROŽMARINA IN
ZELENEGA ČAJA NA SENZORIČNE LASTNOSTI SOKA RDEČE
POMARANČE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS FROM ROSEMARY AND
GREEN TEA ON SENSORY PROPERTIES IN RED ORANGE JUICE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za tehnologije rastlinskih živil Oddelka za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Rajka Vidriha in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob

Mentor: doc. dr. Rajko Vidrih

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Robert Stibilj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
DK UDK 663.81:634.31:577.1(043)=863
KG sadni sokovi / sok rdeče pomaranče / naravni dodatki / naravni antioksidanti / rožmarinov ekstrakt / ekstrakt zelenega čaja / pasterizacija / senzorične lastnosti / antioksidativni potencial / DPPH / porjavenje soka / askorbinska kislina
AV STIBILJ, Robert
SA VIDRIH, Rajko (mentor) / GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN VPLIV ANTIOKSIDANTOV V EKSTRAKTIH ROŽMARINA IN ZELENEGA ČAJA NA SENZORIČNE LASTNOSTI SOKA RDEČE POMARANČE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 48 s., 12 pregl., 22 sl., 28 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI

Testiran je bil vpliv dodatka ekstrakta naravnih antioksidantov v sok rdeče pomaranče z namenom ohranjanja oksidacijske stabilnosti soka. Sok rdeče pomaranče smo pripravili iz koncentrata z dodatkom vode do 11,4 % Brix. Soku smo dodali ekstrakt zelenega čaja in rožmarina v treh različnih koncentracijah. Sok smo pasterizirali pri 90 °C, ustekleničili in skladiščili pri 37 °C. Vsak drugi teden smo merili spremembo barve (L, a, b), skupni antioksidativni potencial (DPPH metoda) ter vsebnost askorbinske kisline. Enkrat mesečno smo opravili senzorično ocenjevanje. Dodatek ekstrakta rožmarina ima močnejši antioksidativni potencial kot dodatek ekstrakta zelenega čaja, žal pa tudi močnejši priokus in negativni vpliv na senzorične lastnosti soka. Statistična analiza pridobljenih podatkov nam je pokazala, da je pri večjem antioksidacijskem potencialu vzorca soka manjša sprememba barve (L, a*, b*). Dodatek naravnih antioksidantov ni preprečil porjavenja soka, delno pa je preprečil oksidacijo askorbinske kisline. Tako vonj kot okus po rožmarinu in zelenem čaju sta premočna in neprimerna za zaščito soka rdeče pomaranče.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDK 663.81:634.31:577.1(043)=863
CX fruit juices / orange juice / additives / natural antioxidants / rosemary extracts / green tea extract / pasteurization / sensory properties / antioxidative potential / DPPH / colour / ascorbic acid
AU STIBILJ, Robert
AA VIDRIH, Rajko (supervisor) / GOLOB, Terezija (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Universty of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS FROM ROSEMARY AND GREEN TEA ON SENSORY PROPERTIES IN RED ORANGE JUICE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 48 p., 12 tab., 22 fig., 28 ref.
AL sl / en
AB

The influence of the addition of natural antioxidants to preserve the quality of red orange juice was studied. Red orange juice was prepared from concentrate which was diluted with water to reach 11,4 % Brix. Juice was then provided with green tea or rosemary extract in three different concentrations respectively. Juice was bottled, pasteurized at 90 °C and stored at 37 °C. Every second week the colour (L, a, b) was measured by means of Minolta chromameter, total antioxidative potential by means of spectrophotometric DPPH method and ascorbic acid content by means of HPLC. The sensory analyses were carried out once per month. Both natural sources of antioxidants preserved the quality. Rosemary extracts had stronger antioxidative potential but unfortunately also stronger impact on sensory properties. Results has shown that higher the antioxidative potential is, smaller are changes in color of juice (L, a*, b*). The addition of natural antioxidants did not prevent the browning of juice but preserved partially the oxidation of ascorbic acid. The impact of rosemary and green tea extracts on the sensory properties was considered as too strong and not suitable for orange juices.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 CITRUSI.....	2
2.1.1 Obarvane ali pigmentirane pomaranče.....	3
2.2 SOK RDEČE POMARANČE.....	5
2.3 AVTOOKSIDACIJA.....	7
2.4 ANTIOKSIDANTI.....	9
2.4.1 Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	12
2.4.2 Zeleni čaj (<i>Camellia sinensis</i>).....	14
3 MATERIALI IN METODE DE LA.....	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.1.1 Naravni antioksidanti.....	19
3.1.2 Reagent.....	19
3.2 METODE.....	20
3.2.1 Priprava vzorcev.....	20
3.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala.....	20
3.2.3 Instrumentalna analiza barve soka.....	21
3.2.4 Določanje vsebnosti askorbinske kisline (HPLC).....	22
3.2.5 Določanje skupnih fenolnih spojin.....	23
3.2.6 Senzorično ocenjevanje.....	23
4 REZULTATI.....	25
4.1 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA... 25	
4.1.1 Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina.....	26
4.1.2 Rezultat določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti zelenega čaja.....	27
4.1.3 Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina in zelenega čaja.....	28
4.2 REZULTATI ANALIZE BARVE.....	29
4.3 REZULTATI DOLOČANJA ASKORBINSKE KISLINE.....	31
4.4 REZULTATI ANALIZE SKUPNIH FENOLNIH SNOVI.....	32

4.5	REZULTATI SENZORIČNEGA OCENJEVANJA	33
4.6.	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV ANALIZ PO DVANAJSTIH TEDNIH SKLADIŠČENJA.....	37
4.7.	ANALIZA POVEZANOSTI SPREMENLJIVK	39
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.2	SKLEP.....	44
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI.....	46
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestavni deli rdeče pomaranče (Lanza, 2003).....	4
Preglednica 2: Kemijska sestava soka rdeče pomaranče kultivarja Moro (Macarone in sod., 1985).....	6
Preglednica 3: Mesta delovanja in učinki prostih radikalov (Korošec, 2000).....	11
Preglednica 4: Vsebnost polifenolov v črnem in zelenem čaju (Vidrih in Kač, 2000).....	15
Preglednica 5: Antioksidacijska učinkovitost nekaterih flavonoidov (Abram, 2000).....	18
Preglednica 6: Dodatki ekstraktov rožmarina in zelenega čaja ter vsebnost rožmarinske kisline in skupnih katehinov v soku rdeče pomaranče.....	19
Preglednica 7: Izmerjen antioksidacijski potencial soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti.....	25
Preglednica 8: L, a*, b* vrednosti za vzorce soka rdeče pomaranče z ekstrakti po prvem in dvanajstem tednu.....	29
Preglednica 9: Vsebnost askorbinske kisline v soku rdeče pomaranče po dvanajstih tednih staranja.....	31
Preglednica 10: Vsebnost skupnih fenolnih snovi v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti določenih ob začetku poskusa.....	32
Preglednica 11: Statistična analiza rezultatov analiz soka rdeče pomaranče z dodatki antioksidantov po dvanajstih tednih skladiščenja.....	37
Preglednica 12: Korelacijski koeficienti med analiziranimi parametri	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Rdeče pomaranče (Cortese, 2000).....	3
Slika 2: Prerez pomarančnega sadeža (Lanza, 2003).....	4
Slika 3: Vrste soka rdeče pomaranče zastopanega na evropskem tržišču (Macarone in sod., 1996).....	5
Slika 4: Struktura nekaterih antocianov (Trošt, 2004).....	7
Slika 5: Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	12
Slika 6: Kemijska struktura antioksidativnih komponent rožmarina a) karnozolna kislina, b) karnozol, c) rožmanol, d) metil karnozat, e) rožmarinska kislina (Bezjak, 2004).....	13
Slika 7: Kemijska struktura neantioksidativnih komponent rožmarina: a) ursolna kislina, b) oleanolna kislina (Rižner, 2000).....	13
Slika 8: Zeleni čaj (<i>Camellia sinensis</i>) (Bezjak, 2004).....	15
Slika 9: Osnovne strukturne formule katehinov zelenega čaja (Hadolin, 2000).....	16
Slika 10: Shema osnovne strukturne formule flavonov (Abram, 2000).....	17
Slika 11: Tridimenzionalna predstavitev a*, b*, in L* barvnih vrednosti (Žabkar, 1998).21	
Slika 12: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z dodanim ekstraktom rožmarina v dvanajst tedenskem poskusu.....	26
Slika 13: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z dodanim ekstraktom zelenega čaja v dvanajst tedenskem poskusu.....	27
Slika 14: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z različnimi dodatki ekstraktov v dvanajst tedenskem poskusu.....	28
Slika 15: L vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatkom ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.....	30
Slika 16: a* vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatki ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.....	30
Slika 17: b* vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatkom ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.....	31
Slika 18: Skupne fenolne snovi izražene v mg galne kisline/l v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti določenih ob začetku poskusa.....	32
Slika 19: Senzorične ocene soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po šestih tednih skladiščenja.....	34
Slika 20: Senzorična sprejemljivost soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po šestih tednih skladiščenja.....	35
Slika 21: Senzorične ocene soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po dvanajstih tednih skladiščenja.....	35
Slika 22: Senzorična sprejemljivost soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po dvanajstih tednih skladiščenja.....	36

1 UVOD

Temnenje sadnih sokov je naraven proces, ki se odvija med vsakim staranjem, ne glede na pogoje skladiščenja. Temnenje samo ni odločilni faktor, igra pa pomembno vlogo pri sprejemljivosti izdelka za potrošnika.

Pri sadnih sokovih uporabljamo za ohranjanje kakovosti predvsem termično obdelavo, s katero preprečujemo mikrobiološki kvar in denaturiramo encime, ki sodelujejo v encimskem porjavenju. S termično obdelavo se zmanjša prehranska vrednost soka (izguba vitaminov), poslabšajo pa se tudi senzorične lastnosti (izguba aromatskih komponent, neencimsko porjavenje).

Človeški organizem je izpostavljen različnim stresom. Že običajna presnova povzroča tvorbo znatne količine prostih radikalov, to pa je lahko še večje ob izpostavljenosti stresom, nekaterim kemikalijam, sevanju, vplivu alkohola, cigaretam, težkim kovinam, katranastim snovem izpušnih plinov, prekajeni in zapečeni hrani. V našem organizmu sta po izvoru dve vrsti antioksidantov: eksogeni in endogeni. Endogene antioksidante tvori naš organizem, eksogene pa dobimo s hrano. Ugotovljena je povezava med eksogenimi antioksidanti hrane in med zaščito pred boleznimi srca in ožilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, povezanimi z oksidativnim stresom v organizmu (Kreft in sod., 2000 b).

Zadnja leta poudarjamo pomen zdrave hrane, to je hrane, ki je pripravljena brez konzervansov in umetnih aditivov. Tako se je tudi na področju antioksidantov pričela večati poraba naravnih antioksidantov. Vse več potrošnikov je pozornih in osveženih glede sestave hrane, ki jo zaužijejo. Oznaka antioksidanta na embalaži v obliki veliko črke E lahko preplaši potrošnika, ki zaradi tega poseže po konkurenčnem izdelku. Tega pa si proizvajalci ne smejo privoščiti.

Osnovno načelo živilske industrije je proizvodnja hrane, ki je zdrava in ima daljši čas uporabnosti. Industrija je rešitev odkrila že pred 50 leti, v obliki umetnih aditivov, ki so postali nepogrešljiva sestavina v živilski industriji. V zadnjem času pa so mnoge raziskave pokazale sum, da sintetični antioksidanti delujejo rakotvorno. Zato je v zadnjem času vse več zamenjav umetnih aditivov z naravnimi, saj so le ti neškodljivi za človeški organizem.

Kot dodatna prednost uporabe naravnih antioksidantov je tudi preprosta vpeljava v tehnologijo proizvodnje sadnih sokov, posledično znižanje temperature termične obdelave in s tem ohranjanje senzoričnih lastnosti.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ugotoviti ali dodatki naravnih ekstraktov rožmarina in zelenega čaja preprečijo porjavenje soka rdeče pomaranče ter kako ti dodatki vplivajo na senzorične lastnosti soka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CITRUSI

Citrusi so poleg jabolk najbolj razširjena skupina sadja, ki je zastopana praktično po vsem svetu. Pridelujejo jih v Sredozemlju, severni in južni Ameriki, nekaj pa tudi na Daljnem vzhodu, Avstraliji in južni Afriki.

Citrusi se delijo na naslednjih šest rodov:

- Citrusi
- Fortunella
- Poncirus
- Microcitrus
- Eremocitrus
- Clymenia

Rodova Citrus in Fortunella dajeta kultivarje, ki so komercialno pomembni. Najpomembnejše vrste citrusov so pomaranče, limone, mandarine in grenivke. Pomaranče izvirajo iz severovzhodne Indije in so v Sredozemlje prišle v 14. ali 15. stoletju.

Pomaranče so zelo občutljive rastline. Njihova rast je močno odvisna od klimatskih pogojev. Dobro uspevajo v toplejših krajih, tropskih, subtropskih in sredozemskih klimatskih podnebnih pasovih. Do poškodb rastlin pride že pri temperaturah pod $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dobaja, 1991).

Ločimo dve vrsti pomaranč:

a.) Kisle ali grenke pomaranče. Navadno so neužitne, ker je meso le teh preкисло in pregrenko. Uporabljajo se za predelavo v marmelado in eterična olja.

Značilne sorte so: Sevilla, Chinoto, Castanago, Femminello.

b.) Sladke pomaranče. Uporabljajo se za konzum, za predelavo v sok ali zgoščeni sok. Poznanih je 160 vrst.

Delimo jih v tri skupine:

- Navadne ali običajne pomaranče (blond): Glavni kultivar Valencia rodi od poletja do jeseni, odvisno od klimatskih razmer in je primerna tako za svež konzum kot za predelavo. Poznani so številni kultivarji (Pera, Hamlin, Pineapple), ki se uporabljajo izključno za predelavo v sok ali zgoščeni sok.
- Navel pomaranče: se največ uporabljajo za zimski konzum. Najvažnejši kultivar je Washington Navel. Izolirani so številni kloni, ki se razlikujejo po času zorenja.
- Obarvane ali pigmentirane pomaranče: Popularne so v sredozemskih državah, zaradi svojega okusa in rdečega pigmenta. Glavni kultivarji so Tarocco, Moro, Sanguinello (Forsyth in Damian, 2003).

2.1.1 Obarvane ali pigmentirane pomaranče

Letna produkcija pomaranč je okrog 50 mio. ton/leto. Vodilne države v predelavi pomaranč so Brazilija in ZDA, Mehika, Španija in Kitajska (Caballero, 2003).

Nam najbližja država, ki prideluje in predeluje pomaranče, je Italija, kjer znaša pridelava približno 2 mio. ton/leto, od tega je 70 % rdeče pomaranče. Rdeče pomaranče ali krvave - blood pomaranče (*Citrus sinensis*) so na tržišču zastopane v majhnih količinah. 20 % rdeče pomaranče se industrijsko predela v sok in koncentrat, 80 % pa je namenjenih za prodajo svežih plodov (Maccaroni in sod., 1996).



Slika 1: Rdeče pomaranče (Cortese, 2000)

Rdeče pomaranče lahko konzumiramo v dveh oblikah:

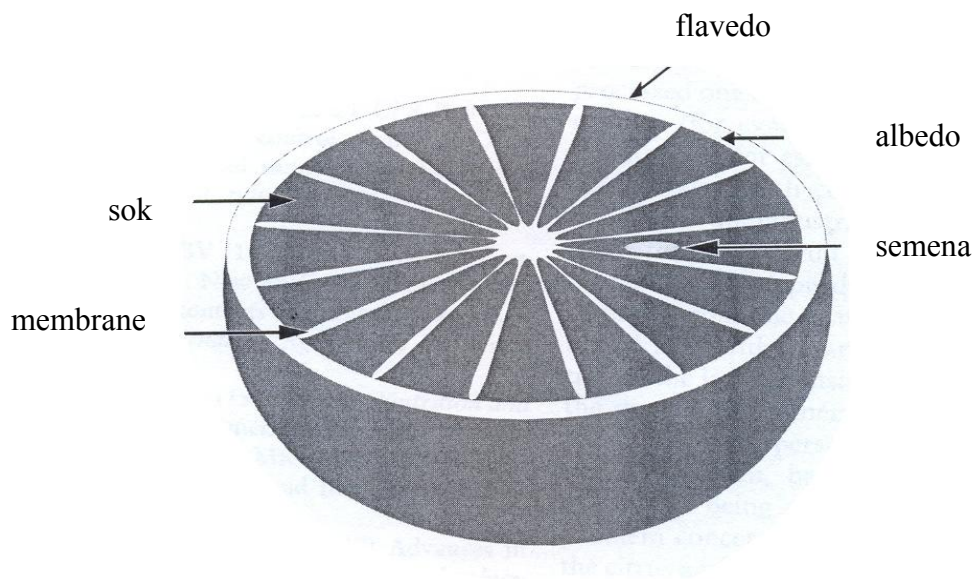
- kot sveže ali desertno (konzumno) sadje
- kot sok, ki je lahko svež, ohlajen, zmrznjen, konzerviran, koncentriran ali mešan z drugimi sokovi

Zrelostni kriteriji in kultivar rdeče pomaranče sta edina faktorja, ki določata, kdaj se bo sadje uporabilo kot sveže in kdaj za predelavo. Eksterni standardi zajemajo barvo lupine, obarvanost in teksturo sadnega mesa ter napake v lupini in čvrstosti plodov.

Ločimo več različnih kultivarjev obarvanih - rdečih pomaranč: Tarocco, Moro, Spanish Sanguinelli, Shamouti Mawardi, Sanguino, Mawardi, Beledi (Trifiro in sod., 1995).

Lupina ali perikarp je sestavljena iz dveh delov:

- flavedo: ima sorazmerno tanek epikarp in oranžno - rdeče meso, ki vsebuje pigmente, spojine antociane in karotene. Je tudi vir eteričnih olj, zunanja plast je poveščena, kar preprečuje izgubo vode in varuje sadež pred vdorom mikroorganizmov.
- albedo: sestavljajo ga dolge prepletene celice z velikimi medceličnimi prostori. Meji na notranji užitni del sadeža in vsebuje veliko pektina.



Slika 2: Prerez pomarančnega sadeža (Lanza, 2003)

Sadno meso ali endokarp je sestavljeno iz kožnih segmentov ovitih z membrano. Membrana obdaja številne vrečke s sokom, ki so povezani med seboj. V notranjosti vrečk so semena ali njihove zasnove. Dovodni kanali, ki potekajo skozi pecelj v sadež, preskrbujejo s hrano užitni del plodu, lupino, semena in semenske zasnove.

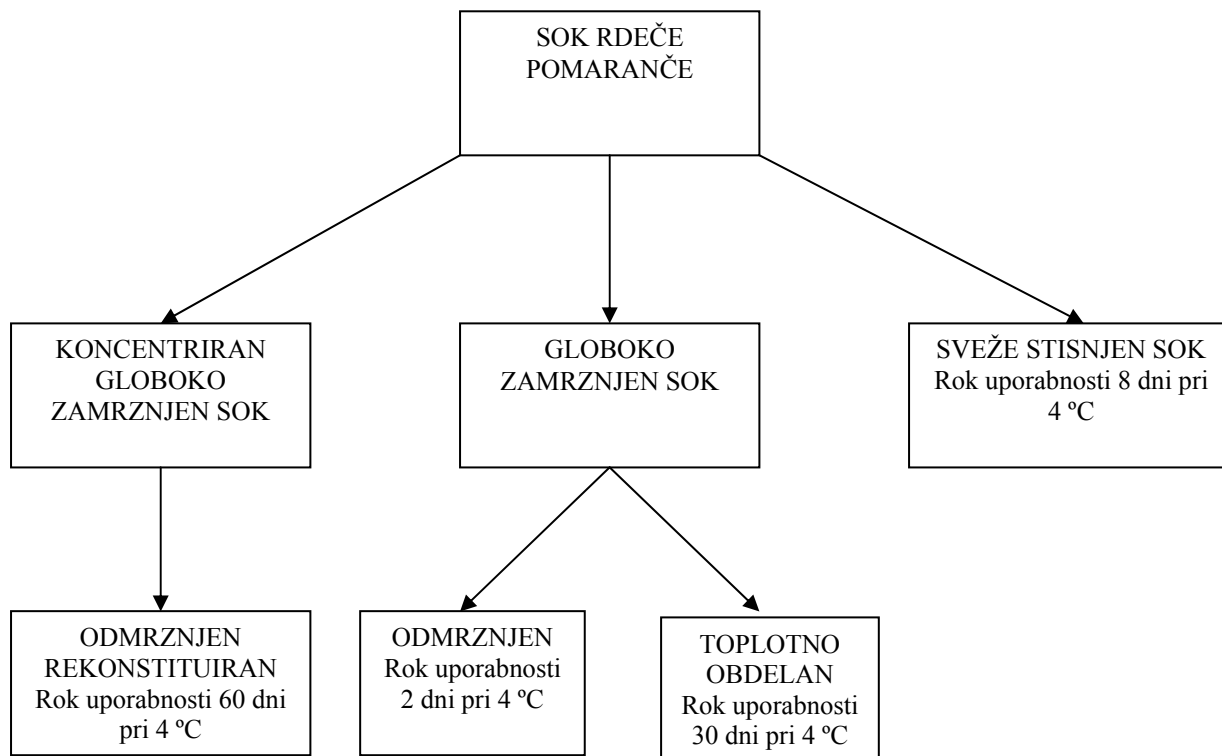
Preglednica 1: Sestavni deli rdeče pomaranče (Lanza, 2003)

Sestavni deli plodu rdeče pomaranče	(%)
sok	40-50
flavedo	8-10
albedo	15-25
semena, membrane, meso brez soka	Ostalo

Sveže pomaranče v prodaji so zrele toliko, kolikor zrele so jih pobrali. Spadajo med neklimakterijsko sadje. Pomaranče po obiranju ne dozorevajo več. Pri nakupu pomaranč moramo biti pozorni na težo. Velike in lahke pomaranče skrivajo debelo lupino in izsušeno sredico (Cortese, 2000).

2.2 SOK RDEČE POMARANČE

Na evropskem tržišču se nahajajo sokovi rdečih pomaranč, pridobljenih z različnimi tehnološkimi postopki. Od postopka samega je tudi odvisen rok uporabnosti soka. Kemijska sestava soka rdeče pomaranče je podobna sestavi soka rumene pomaranče. Razlikuje se le v večji vsebnosti rdečih barvil – antocianov, ki dajejo pomaranči rdečo barvo.



Slika 3: Vrste soka rdeče pomaranče zastopanega na evropskem tržišču (Macarone in sod., 1996)

Preglednica 2: Kemijska sestava soka rdeče pomaranče kultivarja Moro (Maccarone in sod., 1985)

Kemijski parametri	Vrednost oz. vsebnost
pH	3,23
pepel (g/100 ml)	10,5
skupne kisline izražene kot citronska kislina (g/100 ml)	1,43
reducirajoči sladkorji (g/100 ml)	3,70
skupni sladkorji (g/100 ml)	7,36
saharoza (g/100 ml)	3,47
askorbinska kislina (mg/100 ml)	43
formolno število	1,85
antocianin (mg/l)	52,1

Polifenoli so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Delimo jih na dve veliki skupini:

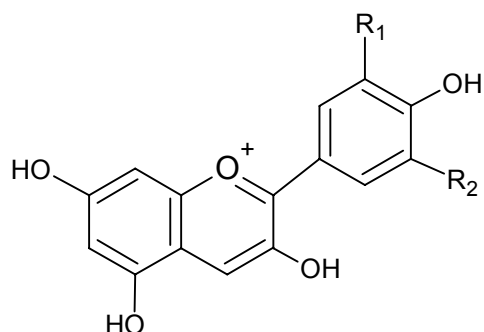
- flavonoide
- neflavonoide

Flavonoidi prispevajo 2/3 in neflavonoidi (predvsem fenolne kisline) 1/3 dnevnega vnosa polifenolov. Flavonoidi se tako kot vsi drugi polifenoli nahajajo samo v živilih rastlinskega izvora. Številne epidemiološke študije kažejo povezavo med uživanjem hrane in pijač, ki vsebujejo visoke vsebnosti flavonoidov in zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja (Vrhovšek, 2001).

Antociani so ena glavnih skupin flavonoidov, ki se nahajajo v prehrani ljudi. Antociani so v vodi topni pigmenti, ki dajejo rastlinam rdečo modro in vijolično barvo. Barva je odvisna od pH, tako so antociani pri pH 3,5 obarvani rdeče, z naraščajočim pH barva prehaja v modro. Količina teh snovi v sadju in zelenjavi je odvisna od agronomskih faktorjev, svetlobe in toplote. Stabilnost antocianov med tehnološkim postopkom je odvisna od ostalih komponent v hrani (npr. encimski sistemi), temperature, svetlobe, prisotnosti kovinskih ionov in različnih organskih kislin.

Med antociane spadajo delfinidin, cianidin, petunidin, peonidin in malvidin. Večina teh se v sadju in zelenjavi nahaja v obliki mono- in diglukozidov. V rdeči pomaranči prevladuje antocian cianidin-3-glukozid. Vsebnost antocianov v soku se razlikuje. V svežem soku je vsebnost antocianov 52,1 mg/l, v soku pridobljenem iz koncentrata pa 48,4 mg/l.

Antociani so občutljivi na višje temperature, zato se priporočajo temperature obdelave soka pod 80 °C. Antociani, izolirani iz rastlin, se lahko uporabljajo kot barvila raznim živilom, kar je s pravilniki dovoljeno povsod po Evropi (Trošt, 2004).



Petunidin	R ₁ =H	R ₂ =H
Cianidin	R ₁ =OH	R ₂ =H
Delfinidin	R ₁ =OH	R ₂ =OH
Peonidin	R ₁ =Ome	R ₂ =H
Malvidin	R ₁ =Ome	R ₂ =Ome

Slika 4: Struktura nekaterih antocianov (Trošt, 2004)

Askorbinska kislina ali vitamin C je naravni antioksidant, ki se nahaja v svežem sadju citrusov, črnega ribeza, jagodah, guavi, mangu itd. Nahaja se tudi v zelenjavi (papriki, brokoliju, brstičnem ohrovu...) in poljščinah (krompir).

Askorbinska kislina je občutljiva na visoke temperature, svetlobo in kisik. V hrani se lahko delno ali pa popolnoma oksidira med dolgotrajnim skladiščenjem. V krompirju se med skladiščenem na sobni temperaturi vsak mesec razgradi ca. 15 % vitamina C (Machlin in sod., 1994).

Askorbinska kislina je naravni antioksidant, ki ga sadje vsebuje za zaščito pred oksidacijo. Vsebnost askorbinske kisline v soku rdeče pomaranče se giblje od 40 do 90 mg/100 ml. in je odvisna od kultivarja in zrelosti plodov. V soku, pridobljenem s stiskanjem svežega sadja, je vsebnost askorbinske kisline 75,6 mg/100 ml, v soku iz koncentrata pa 66,4 mg/100 ml. Razlog za manjšo vsebnost askorbinske kisline je v termičnem postopku predelave rdečih pomaranč v koncentrat (Macarone, 1996).

Zmanjšanje vsebnosti askorbinske kisline je v korelaciji z zmanjšanjem vsebnosti antocianov v staranem soku rdeče pomaranče. To nakazuje na možnost interakcij med tema dvema komponentama. Oba antioksidanta tako antociani kot askorbinska kislina sta zelo reaktivna in slabo stabilna (Choi in sod., 2002).

2.3 AVTOOKSIDACIJA

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni. Nastajajo pri cepitvi kovalentnih vezi, so rezultat normalne celične presnove in posledica dejavnikov okolja (UV in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaženega okolja itd).

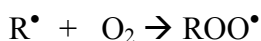
Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so superoksidni anion (O_2^-), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik ($1O_2$), hidrosilni radikal (OH), kisikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida (NO), peroksilni radikal (ROO) (Korošec, 2000 b).

Avtooksidacija je verižna reakcija prostih radikalov, ki jo povzročajo svetloba, toplota, ionizirajoče sevanje in kovinski ioni. Povzročitelji oksidacije (encimska oksidacija) so tudi encimi (lipoksigenaze). Avtooksidacija poteka v štirih stopnjah in obsega:

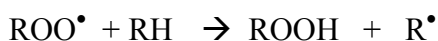
Iniciacija ali začetek - dobimo prosti radikal, odcepi se vodik.



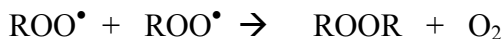
Propagacija ali razvoj - prosti radikal reagira z molekularnim kisikom, dobimo peroksidni radikal.



Peroksidni radikal reagira z novo molekulo maščobne kisline, dobimo hidroperoksid in nov prost radikal.



Terminacija ali konec - nastanek stabilnih spojin (neradikalni produkti).



Avtooksidacijo med skladiščenjem zmanjšamo, tako da skladiščimo živila pri čim nižji temperaturi (hlajenje ali zamrzovanje), živila pakiramo v temno embalažo in v inertni plin, saj je za začetek oksidacijskih procesov potrebno malo kisika.

Kovinske ione, ki so katalizatorji, inaktiviramo z dodatkom citronske kisline, ki tvori z njimi kompleksne ione. Dodajamo lahko tudi antioksidante, ki imajo to sposobnost, da lahko preprečijo ali zavirajo oksidacijske procese in s tem podaljšajo obstojnost živil, ne morejo pa izboljšati kakovosti že oksidirane živila (Trošt, 2004).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidante prištevamo med inhibitorje oksidacije, ki preprečujejo ali zadržujejo oksidacijo posameznih komponent v živilu. Po pravilniku o aditivih za živila mora biti deklarirana njihova vrsta in količina. Antioksidanti so spojine, ki so v živilih naravno prisotne, ali pa jih dodajamo, ker se med predelavo izgubijo ali uničijo.

Vloga antioksidantov je preprečevanje oksidacije in s tem ohranjanje senzoričnih lastnosti (videza, vonja, okusa, barve) ter ohranjanje prehranske vrednosti kot tudi obstojnosti živila.

Antioksidante lahko delimo v tri skupine:

- **Primarni antioksidanti**
Nastajajo v organizmu, ali pa jih tvorijo mikroorganizmi, predvsem encimi. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije.
- **Sekundarni antioksidanti**
Nevtralizirajo novonastale proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo.

Delujejo lahko kot:

- **odjemalci kisika:** z reakcijo odvzemanja kisika preprečijo neželjeno oksidacijo živil. Te spojine reagirajo s prostim kisikom in ga kot takšnega odstranijo iz reakcije. Prost kisik reagira z odjemalci kisika, ki jih tudi oksidira. Med najpogostejše odjemalce kisika spadajo: askorbinska kislina, flavonoidi, karatenoidi, polifenoli, sulfiti.
- **odjemalci radikalov:** te snovi preprečujejo prostim radikalom reagiranje pri verižnih reakcijah s tem, da preprečijo tvorbo hidroperoksidov. Med najpogostejše lovilce radikalov spadajo: flavonoidi, polifenoli, karatenoidi, tokoferoli.
- **sinergisti:** so snovi, ki po načinu delovanja niso antioksidanti, vendar znatno povečajo njihovo delovanje. Tako je citronska kislina aktivna s primarnimi antioksidanti in odjemalci kisika. Glavni princip reakcije je v tem, da elektronski par v strukturi sinergista pospešuje tvorbo kelatov. S tem se tvorijo stabilne oblike s kovinskimi ioni, kot sta železo in baker. Med najpogostejše sinergiste spadajo: estri citronske kisline, citronska kislina, lecitin, polifosfati, vinska kislina.

- Terciarni antioksidanti
So snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročijo prosti radikali v strukturi celice. Največkrat so to encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000).

Smotri uporabe antioksidantov so:

- podaljšanje obstojnosti živil
- zmanjšanje izgube hranilnih snovi
- znižanje stroškov

Lastnosti idealnega antioksidanta

- varen za uporabo
- ne prizadene željenih okusov in barv
- učinkovit pri nizkih koncentracijah
- enostavna vključitev v izdelek
- odporen na postopke toplotne obdelave
- dostopen po nizkih cenah.

Antioksidanti se v živila lahko dodajajo direktno z vmešavanjem, s pomočjo razprševanja ali pa so vgrajeni v embalažne materiale.

Uporaba antioksidanta v obliki prahu ima dokazano večjo antioksidativno učinkovitost kot raztopina istega antioksidanta (Bernot - Sotenšek, 2001).

Ločimo dve veliki skupini antioksidantov:

- naravni (askorbinska kislina, vitamin A, ekstrakti nekaterih začimb)
- sintetični (butilhidroksianizol- BHA, butilhidrositoluen- BHT, propil galat – PG...)

Sintetični antioksidanti so mnogo cenejši, vendar je zaradi toksičnosti nekaterih pri uporabi potrebna pazljivost. Butil hidroksi toluen (BHT) in butil hidroksi anizol (BHA) sta močna sintetična antioksidanta, vendar obstaja sum, da vsebujeta določene substance ki povzročajo raka (Skvarča, 2000).

V današnjem času prihajajo v ospredje naravni antioksidanti, predvsem zaradi zdravstvene oporečnosti in toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov.

Glavni viri naravnih antioksidantov so: alge, citrusi, razne trave, produkti mikroorganizmov, ovsena moka, oljna semena, olive, hidrolizati proteinov, razne smole in soja ter sojini produkti.

Med najbolj znanimi naravnimi antioksidanti so ekstrakti rastlin (rožmarin, zeleni čaj, žajbelj). Ekstrakti naravnih antioksidantov so lahko topni v maščobah ali vodi.

Večino naravnih in sintetičnih prehranskih antioksidantov spada v fenolno skupino.

Fenoli so splošno uporabni antioksidanti predvsem takrat, ko zahtevamo da je antioksidant brezbarven ali slabo obarvan, da ni toksičen oziroma je malo toksičen.

Tokoferoli so topni v maščobah, olju in etanolu. Antioksidanti, ki spadajo v skupino aminov, so močno obarvani in razmeroma toksični. Ti antioksidanti imajo amino in diamino skupino na nenasičenem benzenovem obroču. Antioksidanti, ki spadajo med aminofenole imajo –OH in –NH skupini, ki kažeta antioksidativno delovanje.

V telesu so prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti. Kadar se ravnotežje poruši, kar imenujemo oksidativni stres, pride do poškodb celičnih struktur, ki so najpogostejši vzrok za staranje, degenerativne bolezni, rakava obolenja in druge bolezni. S spoznavanjem vloge in delovanja antioksidantov lahko uspešneje preprečujemo in zdravimo te posledice (Bernot – Sotenšek, 2001).

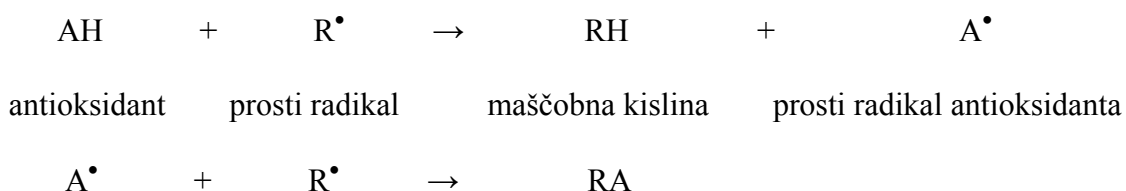
Vir prostih radikalov v celici je celično mitohondrialno dihanje, flavoproteini, lipooksigenaze, hemoglobin, ciklooksigenaze, ksantinska oksidaza, peroksisomi, citokromi, dvovalentne kovine, sevanje (Korošec, 2000).

Preglednica 3: Mesta delovanja in učinki prostih radikalov (Korošec, 2000)

Mesto delovanja	Učinek
lipidi	peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena propustnost membran
proteini	oksidacija SH skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 -antitripsina)
DNK	cepljenje verige, povečana poraba NAD, motena sinteza ATP

Smatra se, da antioksidant preprečuje oksidacijo na osnovi dveh reakcij.

V prvi reakciji antioksidant odda vodik. Ta se veže na prosti radikal hidroperoksida ali na radikal maščobne kisline. Pri drugi reakciji pa se prosti radikal antioksidanta veže na prosti radikal.



Antioksidant ne veže kisika, temveč proste radikale ter tako preprečuje avtooksidacijo. Prosti radikali izginejo in ponovno se tvori molekula antioksidanta. Antioksidant je učinkovit, v kolikor ga dodamo v začetni fazi oksidacije. Če je oksidacija že v teku, so že prisotni peroksidi, s katerimi se antioksidant veže. Antioksidanti preprečujejo oksidacijo dokler se ne porabijo. Koliko časa bo antioksidant deloval, je odvisno od vrste antioksidanta, dodane koncentracije, komponent živila in razmer med skladiščenjem. (Pipan, 1990).

2.4.1 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)

Rožmarin je gost, zelen sredozemski grm. Nasprotni listi so sledeči, na robovih zavihani, zgoraj so temno zeleni, po spodnji strani pa belo dlakavi. Bledo modri ali belkasti cvetovi so na kratkih pecljih, v zalistjih. Listi rožmarina imajo prijeten vonj, oster ter nekoliko trpek okus.

Rožmarin cveti od marca do maja, doma pa je v južni Evropi.

Rožmarin že od nekdaj cenijo zaradi krepilnih in vsestransko spodbujevalnih lastnosti. Sveže ali posušene liste ponavadi uporabljajo kot začimbo ali dišavo (Bernot – Sotenšek, 2001).



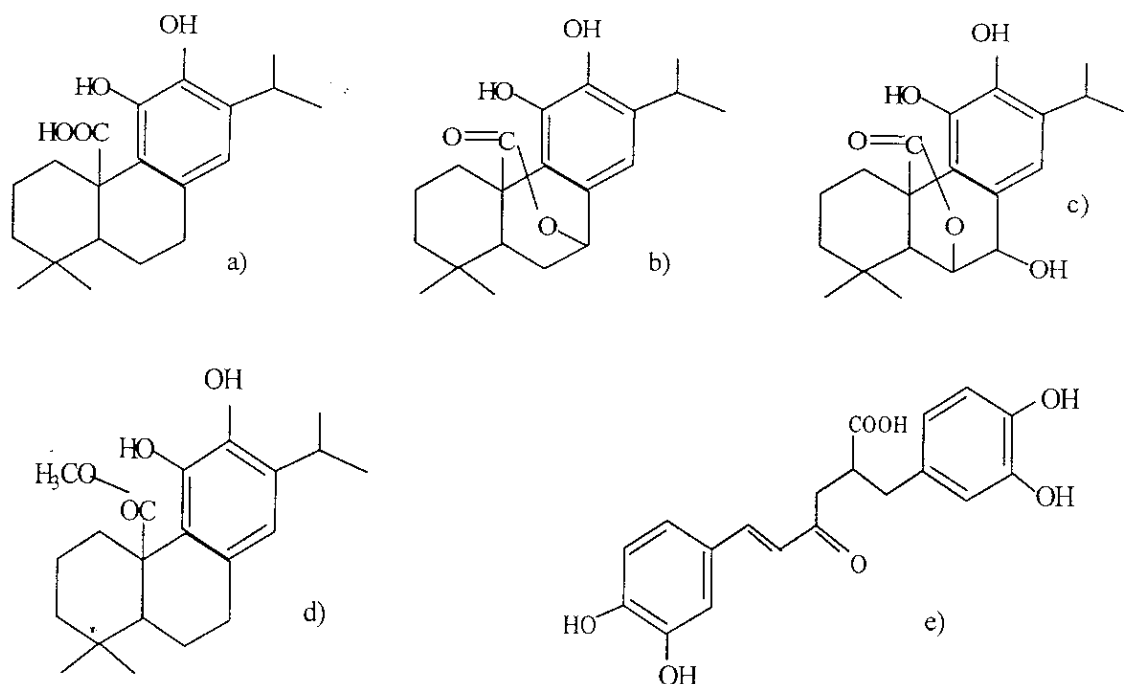
Slika 5: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)

Ekstrakt rožmarina, pridobljen s superkrično tekočinsko ekstrakcijo (SFE), pri kateri se uporabi ogljikov dioksid kot topilo, je zelo učinkovit že pri nizkih koncentracijah in lahko zlahka nadomesti uporabo sintetičnih antioksidantov. S takim postopkom ekstrakcije uspemo pridobiti ekstrakt, ki ima šibek vonj in okus po rožmarinu (Quirin, 2003).

V rožmarinu se nahajajo številne komponente, ki imajo antioksidativno delovanje.

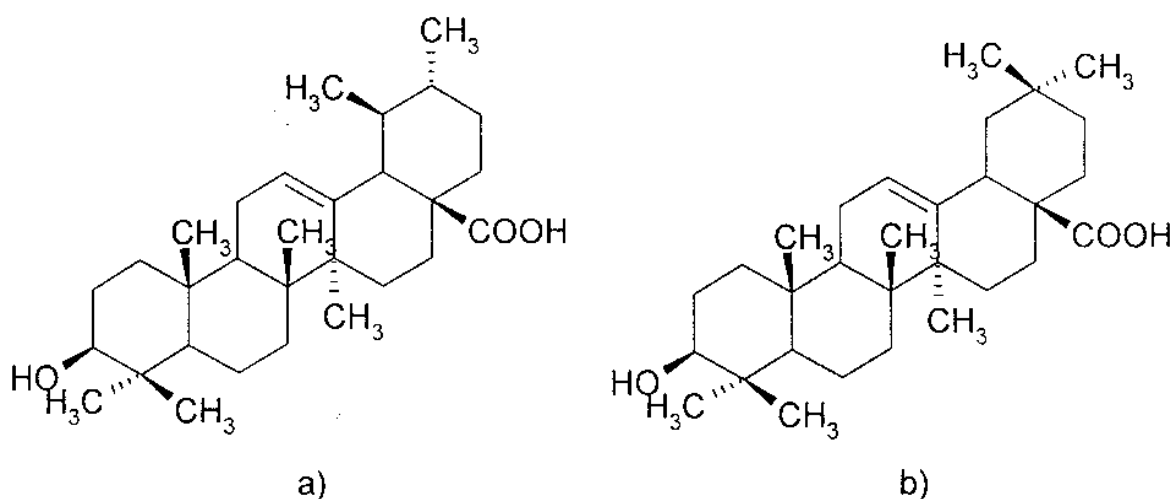
Glavne antioksidativne sestavine v rožmarinu so:

- karnozol (fenolni diterpen brez vonja in okusa);
 - karnozolna kislina;
 - rožmarinska kislina;
- rožmanol, izorožmanol in epirožmanol;
 - rožmarin difenol in rožmarin dikinon (Bernot - Sotenšek, 2001).



Slika 6: Kemijska struktura antioksidativnih komponent rožmarina a) karnozolna kislina, b) karnozol, c) rožmanol, d) metil karnozat, e) rožmarinska kislina (Bezjak, 2004)

Z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti je bilo ugotovljeno, da se v rožmarinu nahajajo največje koncentracije rožmanola in rožmarinske kisline. Rožmarinska kislina je depsid kofeinske kisline in α -hidroksihidro kofeinske kisline. Je drugi najpogostejši ester kofeinske kisline. Čista rožmarinska kislina je v obliki belega prahu in je topna v vodi, zato deluje antioksidativno predvsem v vodnih medijih in emulzijah.



Slika 7: Kemijska struktura neantioksidativnih komponent rožmarina: a) ursolna kislina, b) oleanolna kislina (Rižner, 2000)

Karnozolna kislina, fenolni diterpen, je glavna antioksidativna komponenta v svežem rožmarinu, pod vplivom vlage, temperature, svetlobe in kisika se spremeni v karnozol. Antioksidativni potencial karnozola je znatno nižji od karnozolne kisline (Bezjak, 2004).

Sveže obrani listi rožmarina ne vsebujejo karnozola. Glede na to je mogoče sklepati, da rožmanol, rozmaridifenol in ostali fenolni diterpeni, ki se nahajajo v rožmarinu, nastanejo iz karnozolne kisline pod vplivom oksidacijskih razmer (Bernot – Sotenšek, 2001).

Karnozolna kislina, karnozol, rožmanol in epirožmanol spadajo v skupino diterpenov in so bili izolirani iz listov rožmarina. Ti fenolni diterpeni ščitijo biološke sisteme pred oksidativnim stresom. V bioloških membranah se nahaja veliko nenasičenih maščobnih kislin, katerih oksidacija vodi v uničenje in nepravilno delovanje bioloških sistemov. Za te 4 diterpene je dokazano, da preprečujejo oksidacijo lipidov v mikrosomih in mitohondrijih. Karnozolna kislina preprečuje oksidativno hemolizo eritrocitov. Lipidi v eritrocitih so močno nenasičeni, zato so le-ti podvrženi hitri oksidaciji. Rdeče krvničke vsebujejo tudi hemoglobin, ki pospešuje oksidacijo eritrocitov (Bezjak, 2004).

2.4.2 Zeleni čaj (*Camellia sinensis*)

Čajevec raste v obliki grma ali drevesa in je zimzelena rastlina. Ima svetlo do temno zelene podolgovate, nazobčane, usnjate lističe in praviloma bele oziroma rožnate dišeče cvetove. Plodovi, glavice z enim do štirimi semeni imajo trdo lupino in so podobni lešnikom, le da so bolj okrogli. V naravi doseže čajevec od 12 do 20 metrov višine.

Čajevec danes razmnožujejo predvsem s podtaknjenci in s tem ohranjajo lastnosti matične rastline.

Čajevci uspevajo v tropskih in subtropskih razmerah, od morske gladine pa do 2400 metrov nadmorske višine. Idealno je, če imajo 5 ur sonca na dan (skozi vse leto) in vsaj 200 milimetrov dežja na mesec. Torej potrebujejo veliko vlage in toplote, ne marajo pa blatnih in ilovnatih tal ter direktnega močnega sonca.

Sama aroma, okus in kakovost čaja niso odvisni le od rastline čajevca, temveč tudi od območja, podnebja, lege, nadmorske višine, sestave ter obdelave tal in končne predelave. Iz listov čajevca lahko pridobimo 1500 vrst čaja. Pri vsaki vrsti pa so možna velika odstopanja kakovosti, ki so odvisna od vseh navedenih pogojev. Poleg tega pa so velike razlike tudi med letinami. Trenutno največ čaja pridelujejo v Indiji, Šri Lanki in Kitajski (Zore, 1996).



Slika 8: Zeleni čaj (*Camellia sinensis*) (Bezjak, 2004)

Listi vsebujejo 1-5 % kofeina (teina), ter teobromin, teofilin, adenin, ksantin, teanin, 0,5-1 % eteričnega olja, 5-30 % čreslovin, 3-12 % vode, 14-25 % beljakovin, do 6 % maščob, 4-17 % škroba, 4-8 % gume in dekstrina, 15-20 % celuloze, 0,4-1,5 % oksalne kisline, vitamine B1, B2, C in 4-8 % rudninskih snovi.

Ekstrakt zelenega čaja vsebuje polifenole z visokim antioksidacijskim potencialom. Največji del polifenolov v zelenem čaju predstavljajo katehini. Katehini spadajo med flavonoide, ki imajo C6-C3-C6 ogljikovo strukturo in so sestavljeni iz dveh aromatičnih obročev (Bezjak, 2004).

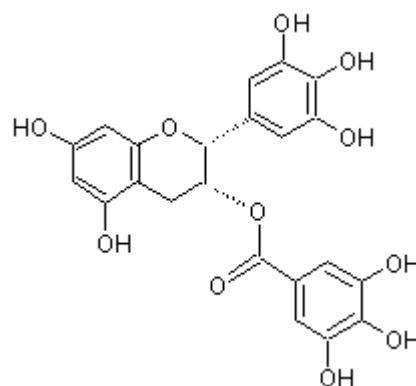
Preglednica 4: Vsebnost polifenolov v črnem in zelenem čaju (Vidrih in Kač, 2000)

Vzorec	Vsebnost polifenolov (mg/l)
črni čaj	801,2
zeleni čaj	953,8

Poznamo več vrst katehinov:

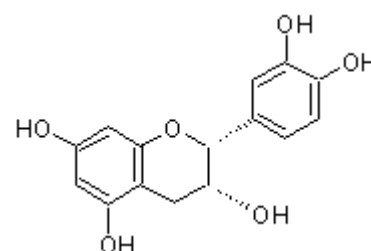
EGCG (Epigallocatechin gallate)

Komponenta, ki se nahaja v zelenem čaju, pridelanem na kitajskem. Je osnovna vodotopna komponenta zelenega čaja.

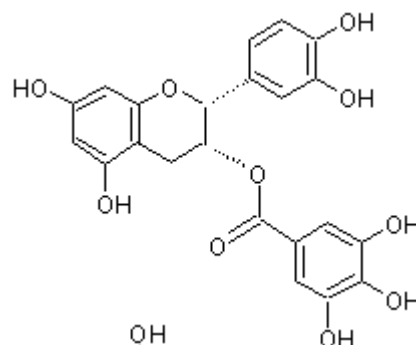


EC (Epicatechin)

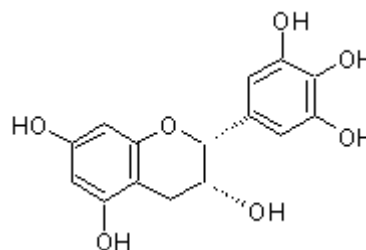
Komponenta zelenega čaja, katere antioksidacijski potencial je nekoliko nižji od EGCG



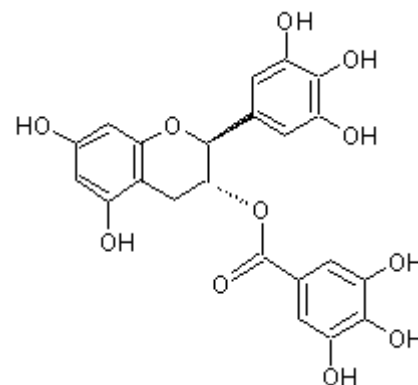
ECG (Epicatechin gallate)



EGC (Epigallocatechin)



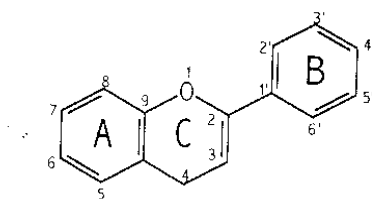
GCG (Gallocatechin gallate)



Slika 9: Osnovne strukturne formule katehinov zelenega čaja (Hadolin, 2000)

Antioksidativni učinki katehinov v zelenem čaju si sledijo: EGCG > EGC > ECG > EC. EGC in EGCG sta trikrat močnejša antioksidanta kakor EC in ECG, zaradi pirogalolne strukture (prisotna hidrosilna skupina na 5' mestu poveča antioksidativnost). EGCG deluje sinergistično z nekaterimi organskimi kislinami in vitamini, ki imajo antioksidativno sposobnost in jim poveča antioksidativno učinkovitost (npr. askorbinska, citronska, vinska kislina, tokoferol,...).

Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča.



Slika 10: Shema osnovne strukturne formule flavonov (Abram, 2000)

Zelo velik vpliv na antioksidacijski potencial ima tudi razporeditev –OH skupin v strukturi antioksidanta. Za dober antioksidant je potrebna –OH skupina na mestu C₃, dvojna vez na C_{2,3}, keto skupina na C₄, ter *o*-položaj dveh –OH na B obroču.

Če samo –OH skupine na C₅ ni, ostale skupine pa so, se antioksidacijska učinkovitost spojine zelo zmanjša. Če pa ni ne –OH na C₃ niti dveh –OH skupin v *o*- položaju na B obroču, se antioksidacijska učinkovitost še bolj zmanjša. Pri teh spojinah je pomembna prisotnost –OH skupine na C₃ atomu.

Pomembnost prostih –OH skupin na C₅ in C₇ se je pokazala, ko so primerjali antioksidacijsko učinkovitost glikozidov in aglikonov. OH skupina na mestu C₇ je zmanjšala antioksidacijsko učinkovitost in prispevek proste –OH skupine na C₅ v obroču A je bil 55-70 % prvotne vrednosti.

Pri antocianidinih pripisujejo antioksidacijsko učinkovitost *o*-dihidroksi razporeditvi –OH skupin na B obroču in iz tega izvirajoči redukcijski moči. Če –OH skupine na 3' mestu ni, pade antioksidacijska učinkovitost, ki se zmanjša tudi, če je ta skupina metilirana.

Preglednica 5: Antioksidacijska učinkovitost nekaterih flavonoidov (Abram, 2000)

Spojina	Proste –OH skupine	Antioksidacijska učinkovitost (mM)	Položaj sladkorja
<i>Flavonol</i>			
epikatehin galat	3,5,7,3',4',3'',4'',5''	4,90±0,02	
epigalokatehin galat	3,5,7,3',4',5',3'',4'',5''	4,80±0,06	
epigalokatehin	3,5,7,3',4',5'	3,80±0,06	
epikatehin	3,5,7,3',4'	2,50±0,02	
katehin	3,5,7,3',4'	2,40±0,05	
<i>Flavonol</i>			
kvercetin	3,5,7,3',4'	4,70±0,1	
kamferol	3,5,7,4'	1,34±0,08	
rutin	5,7,3',4'	2,40±0,06	3-rutinozid
<i>Flavon</i>			
luteolin	5,7,3',4'	2,10±0,05	
luteolin-4-glikozid	5,7,3'	1,74±0,09	4'-glukozid
Flavanon			
naringenin	5,7,4'	1,53±0,05	
<i>Antocianidin</i>			
delfinidin	3,5,7,3',4',5'	4,44±0,11	
cianidin	3,5,7,3',4'	4,40±0,12	
malvidin	3,5,7,4'	2,06±0,1	
pelargonidin	3,5,7,4'	1,30±0,1	
<i>Izoflavon</i>			
genistein	5,7,4'	2,90±0,10	
genistin	5,4'	1,24±0,02	7-glikozid
daidzein	7,4'	1,25±0,02	
daidzin	4'	1,15±0,01	

Če pogledamo flavonoide, ki imajo nasičen C obroč, tako kot flavoni in sorodne spojine, vidimo, da je za antioksidacijsko učinkovitost pomembno število vseh –OH skupin v molekuli. Zato estri z galno kislino vezano na C₃ atomu močno povečajo antioksidacijsko učinkovitost takih spojin. Na flavonoidnem skeletu so –OH skupine na mestih C₃, C₅, in v *o*- položaju na B obroču mesta vezave (Abram, 2000).

Katehini zelenega čaja uspešno zavirajo foto-oksidacijo, oksidacijo v oljih (sončnično, repično, ribje olje), odporni so na višje temperature, zato v maščobah in oljih obdržijo antioksidativno učinkovitost, uspešno inhibirajo barvne diskoloracije pri nekaterih naravnih barvilih (klorofil, riboflavin, β-karoten, ...) in naravnih aromah.

Katehini zelenega čaja imajo zelo velik potencial za praktično uporabo v živilski industriji. Vplivajo na zdravje, saj dodatek katehinov zelenega čaja zniža koncentracijo P-COOH (oksidiran fosfatidil holin v membrani celice) v krvni plazmi, zmanjša se nevarnost kardiovaskularnih bolezni, ter inhibira hidrolitične in oksidativne encime (fosfolipaze, ciklooksigenaze in lipooksigenaze) (Yukihiko, 2001).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

Pri poskusu smo uporabljali sok rdeče pomaranče po poreklu iz Italije (Sicilije). Sok je bil v obliki koncentrata zamrznjen na temperaturo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pakiran v plastični posodi 20 kg.

3.1.1 Naravni antioksidanti

Ekstrakte naravnih antioksidantov pridobiva podjetje Vitiva iz Markovcev. V sok rdeče pomaranče smo dodali naslednje ekstrakte:

- ROS.wse – vodotopni ekstrakt rožmarina s 5 % rožmarinske kisline
- ekstrakt zelenega čaja, ki vsebuje 25 % skupnih katehinov

Preglednica 6: Dodatki ekstraktov rožmarina in zelenega čaja ter vsebnost rožmarinske kisline in skupnih katehinov v soku rdeče pomaranče

Dodatki ekstraktov rožmarina (%)	Vsebnost rožmarinske kisline v soku (ppm)
0,025	12,5
0,05	25
0,1	50
0,15	75
Dodatki ekstraktov zelenega čaja (%)	Vsebnost skupnih katehinov v soku (ppm)
0,01	25
0,02	50
0,03	75

3.1.2 Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste kemikalije:

- 96 % etanol (Merck),
- DPPH- 1,1 diphenil-2-picryl-hydrazil,
- destilirana voda,
- galna kislina (Merck),
- 100 % absolutni etanol (Merck),
- Folin-Ciocalteujev reagent,
- natrijev karbonat,
- deionizirana voda,
- askorbinska kislina (Merck $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ čistost: min. 99,7 %, Nemčija),
- očetna kislina 5 % (Merck),
- m-fosforna kislina (Merck).

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev

Koncentratu rdeče pomaranče smo dodali vodo do 11,4 % Brix-a, nato pa rožmarinov ekstrakt v treh različnih koncentracijah (0,05 %, 0,1 %, 0,15 %) oziroma ekstrakt zelenega čaja v treh različnih koncentracijah (0,01 %, 0,02 %, 0,03 %). Vzorce z različnimi koncentracijami ekstraktov smo analizirali v treh paralelkah. Vzoredno smo analizirali tudi sok brez dodanih ekstraktov. Za senzorično ocenjevanje smo pripravili sok z dodatkom četrte koncentracije rožmarinovega ekstrakta (0,025 %). Vzorce soka smo ustekleničili, pasterizirali pri 90 °C in termostatirali pri 37 °C za dobo dvanajstih tednov. Kemijske analize smo opravljali vsakih štirinajst dni. Skupno smo opravili šest analiz.

3.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala

Za spremljanje antioksidacijskega potenciala smo uporabili metodo DPPH. Radikal DPPH absorbira svetlobo pri 517 nm. V reakciji z antioksidantom (redukcija) DPPH razpada in posledično se zmanjša absorpcija. Zmanjševanje absorbance pa je proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu (Vidrih in Kač, 2000).

DPPH pripravimo vsakič svež, tako da raztopimo 4 mg DPPH-ja v 20 ml etanola, ter mešamo, dokler se reagent ne raztopi. Pozorni moramo biti, da se ves reagent raztopi, saj zaradi neraztopljenih delcev reagenta dobimo manj intenzivne barvne reakcije. Sok razredčimo z vodo, in sicer 1:10, dobro premešamo, odvezamo 90 µl razredčenega soka, kateremu dodamo 500 µl etanola in 250 µl predhodno pripravljene raztopine etanola in DPPH-ja. Zmes dobro premešamo, počakamo 15 minut, da pride do redukcije DPPH in s tem zmanjšanje intenzitete barve. Absorbanco vzorca izmerimo v kvarčni kivetki širine 10 mm pri valovni dolžini 517 nm proti slepemu vzorcu, ki ga pripravimo po istem postopku, le da v mešanico namesto soka dodamo destilirano vodo.

Antioksidacijski potencial (AOP) smo izračunali po sledečih enačbah:

$$\Delta A = A_{\text{DPPH}} - A_{\text{VZORCA}} + A_{\text{SLEPE PROBE}}$$

$$n \text{ (mol)} = (\Delta A / 12000) * V * r$$

$$\text{AOP} = (n * 1 * 10^3 * 10^6) / V_{\text{SOKA}}$$

ΔA – razlike v izmerjenih absorbancah

A_{DPPH} – absorbanca reagenta DPPH z etanolom brez vzorca soka

A_{VZORCA} – absorbanca vzorca soka z dodanimi ekstrakti po reakciji z reagentom DPPH

$A_{\text{SLEPA PROBA}}$ – absorbanca etanola

$n \text{ (mol)}$ – množina antioksidanta

V – volumen reagentov in vzorca soka

$r \text{ (cm)}$ – širina kivete

AOP (nmol / l) – antioksidacijski potencial

3.2.3 Instrumentalna analiza barve soka

Za merjenje barve smo uporabili kromometer Minolta CR-200b, povezan z DATA DP 100 za obdelavo podatkov. Sistem temelji na CIE (Commission Internationale l'Eclairage) L*, a*, b* načinu določanja barve.

Kromometer je sestavljen iz dveh delov: merilne glave in mikroprocesorja za obdelavo podatkov. Merilna glava ima vir svetlobe, ki osvetljuje predmet pod kotom 45°. Pravokotno na predmet so normirani spektralni filtri X, Y, Z, skozi katere gre odbita svetloba, ki jo preko fotopomnoževalk ojačamo in pretvorimo v digitalni zapis. Ker je sistem x, y, z težko predstavljaljiv, so kasneje nastali enostavnejši sistemi (Žabkar, 1998).

L*, a*, b* sistem deluje podobno kot človeško oko: Vsako barvilo zazna kot kombinacijo rdeče, rumene in modre barve. Merjeni predmet osvetli z belo svetlobo konstantne temperature (v našem primeru 6740 °K). Odbito barvo vzorca s pomočjo senzorjev razdeli na tri vrednosti, ki jih predstavi s pomočjo točke v tridimenzionalnem sistemu.

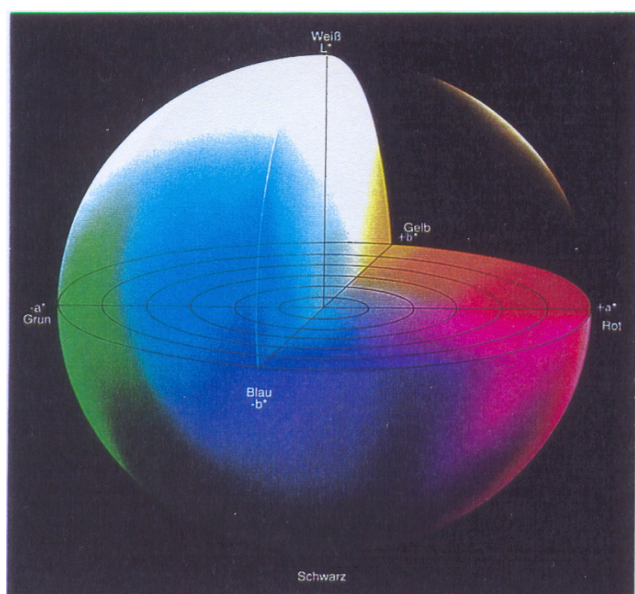
Rezultat nam poda v L*, a*, b* koordinatah, ki so v neposredni odvisnosti od normnih barvnih vrednosti X, Y, Z.

$$L^* = 116 (Y/Y_n)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 50 ((X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3})$$

$$b^* = 200 ((Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3})$$

X, Y, Z so vrednosti za normalni beli standard. Ta sistem je enostaven, ker nam vsako barvo predstavi v tridimenzionalnem koordinatnem sistemu, možna pa so tudi enostavna preračunavanja razlik v barvah med vzorcema (Žabkar, 1998).



Slika 11: Tridimenzionalna predstavitev a*, b*, in L* barvnih vrednosti (Žabkar, 1998)

Razlike posameznih komponent pomenijo:

- +L* ⇒ svetlejši
- L* ⇒ temnejši
- +a* ⇒ bolj rdeč (manj zelen)
- a* ⇒ bolj zelen (manj rdeč)
- +b* ⇒ bolj rumen (manj moder)
- b* ⇒ bolj moder (manj rumen)

Vsak vzorec soka smo prelili v manjšo posodico. To posodico smo uporabljali pri vseh meritvah. Kromometer smo potopili v posodico s sokom do višine, ko je prišlo do stika sok - kromometer, zaradi površinske napetosti soka. Računalnik DATA DP 100 nam za vsak komplet meritev poda povprečne, minimalne in maksimalne vrednosti za L*, a*, b* ter standardne deviacije. Za vsak vzorec soka z dodatkom ekstrakta smo opravili tri meritve. Zanimalo nas je, kako se vrednosti L*, a*, b* spreminjajo s staranjem soka.

Pri merjenju barve s kromometrom Minolta smo uporabljali nastavek, namenjen merjenju barve plodov.

3.2.4 Določanje vsebnosti askorbinske kisline (HPLC)

Vsebnost askorbinske kisline smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC po metodi IFJU Nr. 17).

Posamezne komponente vzorca se ločijo med seboj na osnovi različnih fizikalno – kemijskih interakcij med mobilno in stacionarno fazo, kar se na kromatogramu pokaže kot različni retencijski časi.

Sok rdeče pomaranče smo centrifugirali pri 14000 vrtljaji/minuto, 6 minut. Vzorce smo filtrirali skozi 0,45 µm filtrom ter jih inicirali v HPLC sistem.

Vzorce smo desetkrat razredčili z 2 % metafosforno kislino, ki stabilizira askorbinsko kislino. Standarde za umeritveno krivuljo smo pripravljali v paralelkah koncentracij 10 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l. Standarde smo pripravili tako, da smo kristalinično askorbinsko kislino raztopili v 2 % m-fosforno kislino do koncentracije 1 g/l in potem z redčenjem dosegli ustrezne koncentracije za umeritveno krivuljo. Pred iniciranjem smo jih prefiltrirali skozi 0,45 µm filter.

Pogoji ločitve pri analizi askorbinske kisline:

- mobilna faza: 20 mM NH₂PO₄ (pH: 2,9)
- kolona: C18, 5 µm SYNERGI (4 µ HYDRO- RP 80A)
- pretok: 1.0 ml/min
- valovna dolžina UV spektrofotometra: 245 nm
- volumen iniciranega vzorca: 20 µl
- HPLC z UV detektorjem Knauer (Nemčija)
- separacijska kolona Knauer Eurospher 100, C18; 5 µm; 25 cm (Nemčija)
- membranski filter (Millipore 0,45 µm) (ZDA)
- avtomatski podajalnik vzorcev

3.2.5 Določanje skupnih fenolnih spojin

Fenolne snovi v soku rdeče pomaranče so pomembne, saj prispevajo k barvi, okusu in oksidacijski stabilnosti soka. V prisotnosti kisika se hitro oksidirajo, kar povzroči porjavenje soka.

Znano je, da fenolne spojine soka absorbirajo svetlobo v UV in vidnem območju. Zato lahko odčitano vrednost absorbance uporabimo za oceno vsebnosti fenolov, skupnih antocianov in deleža antocianov v obarvani obliki. Za določitev koncentracije skupnih fenolnih snovi smo dodali Folin – Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini reducira fenolne snovi.

Vzorec soka smo centrifugirali 10 minut pri 300 obratih/minuto. Supernatant smo razredčili v razmerju 1:10 z deionizirano vodo in dobro premešali. 1 ml tako pripravljene vzorca smo odpipetirali v 100 ml merilno bučko in dodali 60 ml deionizirane vode. Raztopino smo dobro premešali, in dodali 5 ml razredčenega Folin – Ciocalteujevega reagenta v razmerju 1:2 z deionizirano vodo. Ponovno smo jo dobro premešali in po 30 sekundah (najkasneje 8 minutah) dodali 15 ml 20 % raztopine natrijevega karbonata. Raztopino smo premešali in dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Po dveh urah temperiranja (20 °C) smo raztopino ponovno premešali, prenesli v 10 mm kivete in izmerili absorbenco proti slepemu vzorcu pri 765 nm.

Masno koncentracijo skupnih spojin smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo predhodno pripravili iz standardne referenčne raztopine različnih koncentracij galne kisline (Košmerl, 2000).

3.2.6 Senzorično ocenjevanje

Vzorci soka smo senzorično ocenili dvakrat: prvič na polovici poskusa (po 6 tednih) in drugič ob koncu (po dvanajstih tednih).

Ker smo že v predposkusu ugotovili, da dodatek ekstrakta rožmarina daje močan priokus po rožmarinu, smo za senzorično ocenjevanje pripravili četrti, še nižji dodatek ekstrakta rožmarina. Za oba ekstrakta, rožmarina in zelenega čaja je namreč značilno, da v večjih koncentracijah puščata močan priokus. Koncentracije dodanih ekstraktov smo določili skupaj s proizvajalcem ekstraktov, podjetjem Vitiva.

S senzorično analizo smo ocenjevali okus, vonj, barvo in bistrost soka rdeče pomaranče.

Senzorično ocenjevanje je izvedel panel izkušenih preizkuševalcev z oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, sprejemljivost soka pri potrošnikih pa ocenjevalci – potrošniki, zaposleni v tovarni Fructal.

Ocenjevali smo osem vzorcev soka z različnimi dodatki ekstraktov, ki smo jih starali dvanajst tednov pri temperaturi 37 °C. Štirje vzorci soka so imeli dodan ekstrakt rožmarina, trije vzorci so bili z dodatkom zelenega čaja, en vzorec soka pa je bil brez dodatkov.

Ocenjevali so okus s točkami od 0 – 8, vonj, barvo in bistrost pa s točkami 0 – 4. Vzorec soka je tako lahko dosegel največ 20 točk. Vsak ocenjevalec je bil naprošen, da poda svoje mnenje o soku.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA

Rezultati v preglednici 6 podajajo vrednosti antioksidacijskega potenciala (AOP), določenih s spektrofotometrično analizo. Rezultati so povprečja treh meritev.

Preglednica 7: Izmerjen antioksidacijski potencial soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti

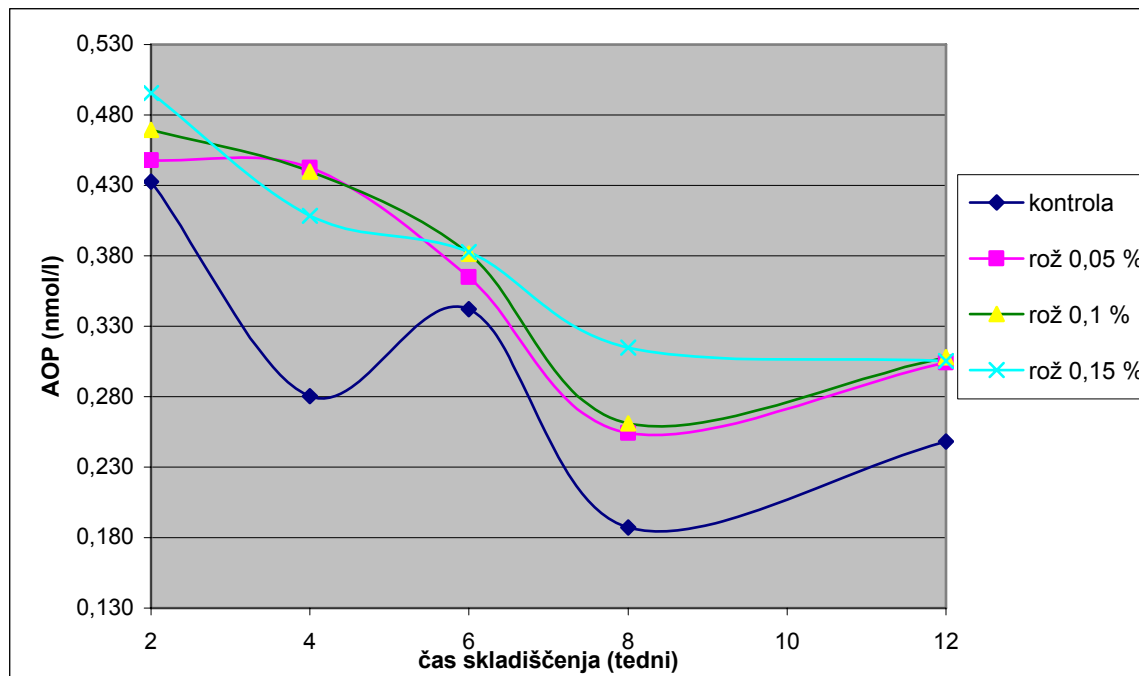
Sok z dodanimi ekstrakti	Antioksidacijski potencial (nmol/l)						
	kontrola	rožmarin			zeleni čaj		
	1	0,05 %	0,10 %	0,15 %	0,01 %	0,02 %	0,03 %
Čas skladiščenja (teden)							
1	0,822	0,812	0,810	0,746	0,829	0,768	0,833
2	0,433	0,448	0,469	0,495	0,515	0,471	0,521
3	0,280	0,442	0,440	0,408	0,427	0,412	0,427
4	0,342	0,365	0,381	0,382	0,359	0,377	0,364
5	0,187	0,254	0,261	0,315	0,218	0,261	0,275
6	/	/	/	/	/	/	/
7	0,248	0,304	0,308	0,305	0,252	0,255	0,258

Vzorec, ki smo ga analizirali ob času skladiščenja 1, je sok, ki so mu bile dodane različne koncentracije ekstraktov antioksidantov, vendar sok še ni bil pasteriziran, zato so tudi vrednosti antioksidacijskega potenciala višje kot pri pasteriziranem soku. Razlog za višje vrednosti antioksidacijskega potenciala nepasteriziranega soka je v tem, da termična obdelava zmanjša vsebnost antioksidacijskih snovi soka, saj povišana temperatura pospeši oksidacijo nekaterih antioksidantov, kot so npr. askorbinska kislina in polifenoli.

Pri ostalih merjenjih smo iz vzorcev soka previdno odvzeli sok iz vrha steklenice, saj ta ni vseboval večjih sadnih delcev, ker so se ti s časom (staranjem) posedli na dno.

Antioksidacijski potencial soka rdeče pomaranče z dodatki različnih koncentracij ekstraktov rožmarina se v pasteriziranem soku giblje pri največjem dodatku ekstrakta od 0,495 nmol/l do 0,254 nmol/l pri najmanjšem dodatku rožmarinovega ekstrakta vzorcu soka, kar je razvidno iz preglednice 7. Antioksidacijski potenciali z dodatki različnih koncentracij ekstrakta zelenega čaja pasteriziranega soka se gibljejo od 0,521 do 0,218.

4.1.1. Rezultat določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina



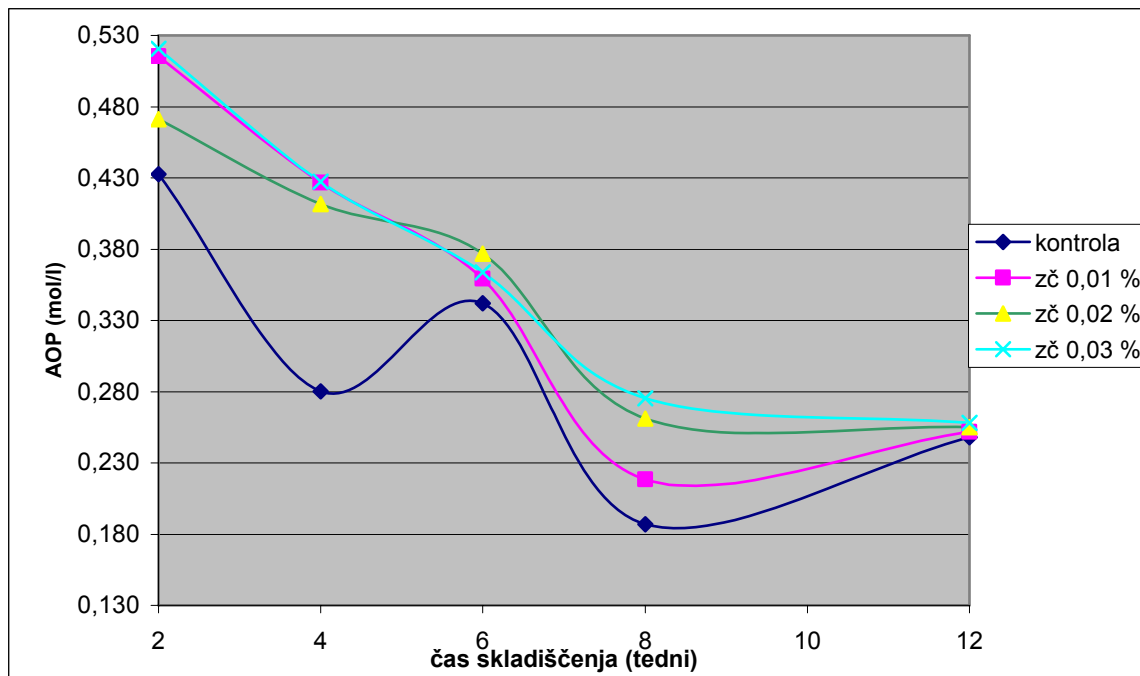
Slika 12: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z dodanim ekstraktom rožmarina v dvanajst tedenskem poskusu.

Iz slike 12 je razvidno, da je imel kontrolni vzorec soka ob začetnem merjenju nižji antioksidacijski potencial kot vzorci soka z dodatki ekstrakta rožmarina. Najvišji antioksidacijski potencial je imel vzorec soka z največjim dodatkom rožmarina.

Med dvanajst tedenskim poskusom je imel kontrolni vzorec soka brez dodanih ekstraktov pri vseh meritvah najnižji antioksidacijski potencial. Slika 12 nam prikaže občutno zmanjšanje antioksidativnih snovi v kontrolnem vzorcu soka rdeče pomaranče po prvih štirinajstih dneh staranja pri 37 °C.

V vzorcih soka z dodanimi ekstrakti je bilo zaznati nekoliko manjše zmanjšanje antioksidacijskega potenciala.

4.1.2. Rezultat določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti zelenega čaja

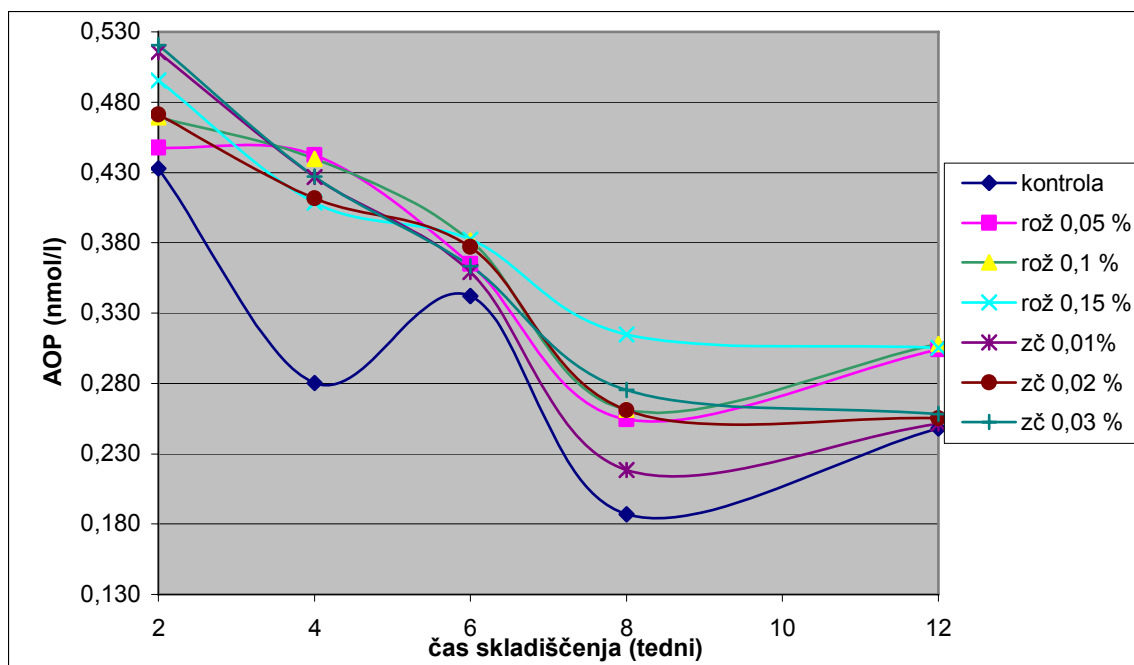


Slika 13: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z dodanim ekstraktom zelenega čaja v dvanajst tedenskem poskusu.

Iz slike 13 je razvidno, da ima kontrolni vzorec soka ob prvem merjenju nižji antioksidacijski potencial kot vzorci soka z dodanimi ekstrakti zelenega čaja. Najvišji antioksidacijski potencial ima vzorec soka z največjim dodatkom ekstrakta zelenega čaja.

Tudi tukaj je zmanjšanje antioksidativnih snovi v kontrolnem vzorcu soka rdeče pomaranče po štirinajstih dneh staranja pri 37 °C največje. V vzorcih soka z dodanimi ekstrakti je bilo zaznati nekoliko manjši padec antioksidacijskega potenciala.

4.1.3. Rezultat določanja antioksidacijskega potenciala v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina in zelenega čaja



Slika 14: Spremljanje antioksidacijskega potenciala vzorca soka rdeče pomaranče z različnimi dodatki ekstraktov v dvanajst tedenskem poskusu.

Na sliki 14 je razvidno, kako se zmanjšuje antioksidacijski potencial sokov rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina in zelenega čaja.

Iz slike 14 težko razberemo, kateri od ekstraktov ima močnejši antioksidacijski potencial. Razberemo lahko le stanje, ki je bilo na začetku in ob koncu poskusa. Pri meritvah, ki so bile opravljene med staranjem soka se vrednosti spreminjajo.

Ob začetku poskusa ima sok rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti zelenega čaja višji antioksidacijski potencial kot sok rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina.

Ob začetku merjenja je imel najvišji antioksidacijski potencial vzorec soka rdeče pomaranče z 0,03 % dodatkom ekstrakta zelenega čaja. Največje zmanjšanje antioksidacijskega potenciala v prvih štirinajstih dneh staranja je doživel kontrolni vzorec soka, ki je imel že na začetku najnižji antioksidacijski potencial.

Vrednosti antioksidacijskega potenciala, so za vzorce soka z dodanimi ekstrakti rožmarina ob koncu poskusa višje od vrednosti vzorcev soka z dodanimi ekstrakti zelenega čaja.

4.2 REZULTATI ANALIZE BARVE

Preglednica 8: L, a*, b* vrednosti za vzorce soka rdeče pomaranče z ekstrakti po prvem in dvanajstem tednu.

Čas(tedni) Sok z ekstrakti	L vrednost		a* vrednost		b* vrednost	
	Prvi teden	Dvanajsti teden	Prvi teden	Dvanajsti teden	Prvi teden	Dvanajsti teden
kontrola	21,90	24,22	19,15	15,91	10,17	21,43
rož 0,05 %	22,17	26,34	21,93	17,02	12,70	25,13
rož 0,1 %	20,76	26,62	21,35	17,67	11,26	25,62
rož 0,15 %	21,72	24,09	21,95	14,87	12,35	21,12
zč 0,01 %	22,47	23,02	22,89	13,58	12,74	18,43
zč 0,02 %	21,06	21,49	21,60	12,70	11,57	16,68
zč 0,03 %	20,38	24,59	17,94	15,54	9,21	21,47

Iz podatkov v preglednici 8 in slike 15 je razvidno, da je L vrednost s staranjem soka naraščala. To pomeni, da je sok s staranjem postajal svetlejši.

Sprememba vrednosti L je večja pri vzorcih soka rdeče pomaranče z dodatkom rožmarinovih ekstraktov, kot pri vzorcih soka z dodatki ekstrakta zelenega čaja. L vrednosti so se pri vzorcih soka z 0,01 % in 0,02 % dodatkom ekstrakta zelenega čaja manj povečale kot pri kontrolnem vzorcu. Tako je bil sok rdeče pomaranče po dvanajstih tednih pri teh dveh koncentracijah ekstrakta zelenega čaja temnejši kot kontrolni vzorec.

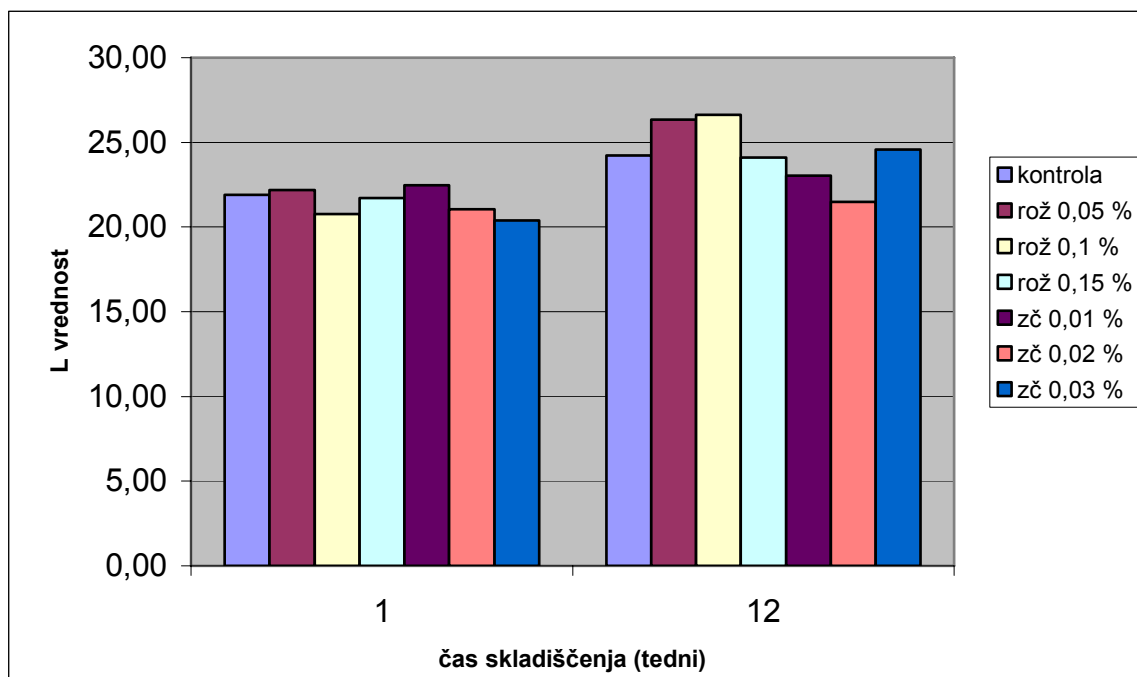
Vrednosti a* so se znižale, kar vidimo na sliki 16. Zniževanje a* vrednosti pomeni, da je sok izgubljal rdeč odtonek.

Največje znižanje vrednosti a* je pri soku rdeče pomaranče z dodatkom 0,01 % ekstrakta zelenega čaja ter pri soku z največjim dodatkom ekstrakta rožmarina.

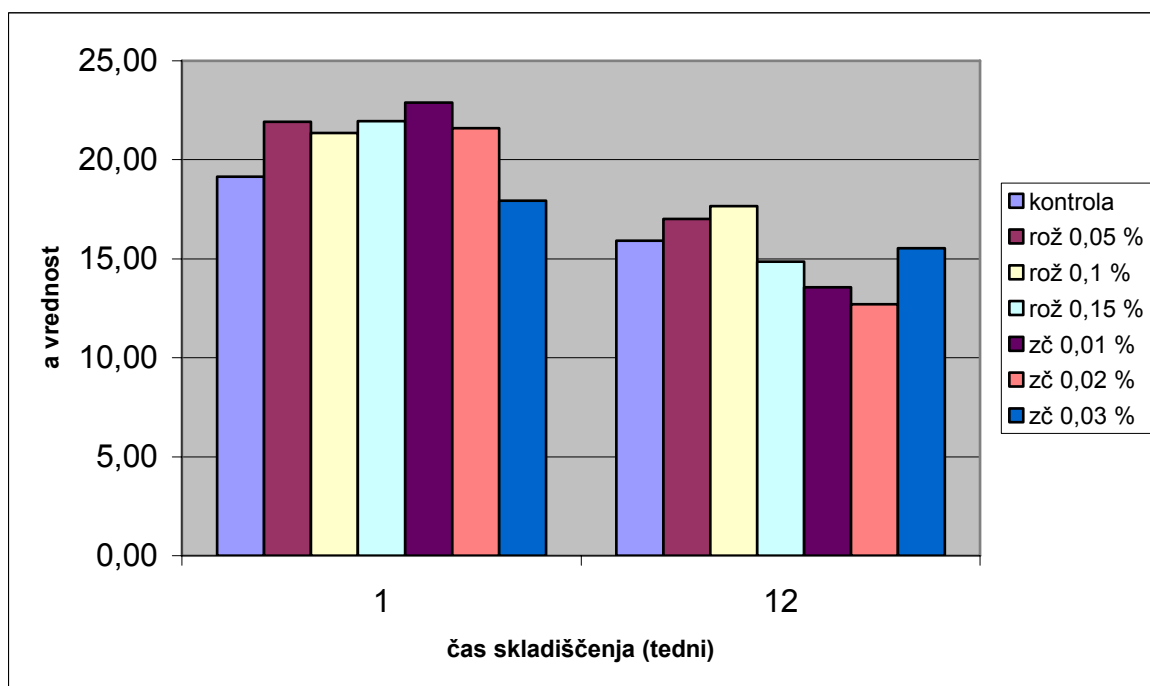
Najnižjo vrednost a* je dosegel sok z dodatkom 0,02 % ekstrakta zelenega čaja, medtem ko je bila pri soku obeh dodanih ekstraktov rožmarina končna vrednost a* višja.

Vrednost b* je pri vseh vzorcih naraščala (preglednica 8 in slika 17). Večji dvig b* vrednosti je bil pri soku z dodanimi ekstrakti rožmarina, nekoliko manjše pa pri soku z dodanimi ekstrakti zelenega čaja. Naraščanje vrednosti b* pomeni, da je bilo v vzorcih več rumenega odtenka barve.

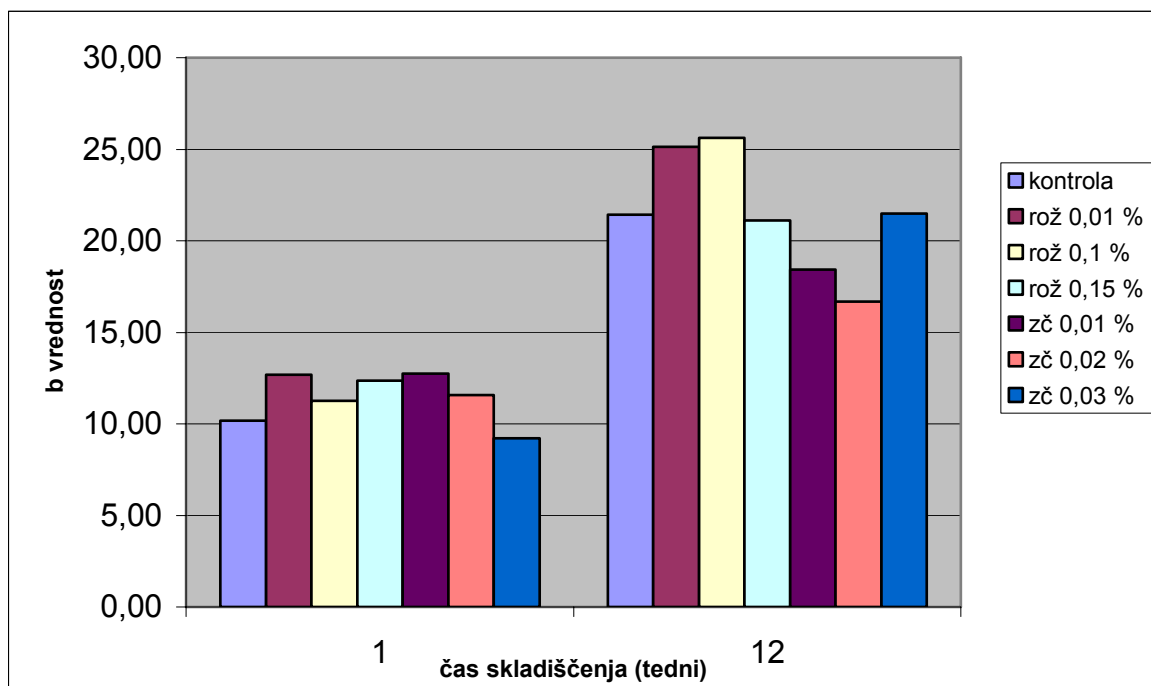
Po dvanajstih tednih staranja ima vzorec soka z 0,1 % dodatkom ekstrakta rožmarina najvišjo a* vrednost, vzorec soka z 0,02 % dodatkom ekstrakta zelenega čaja pa najnižjo a* vrednost.



Slika 15: L vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatki ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.



Slika 16: a* vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatki ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.



Slika 17: b* vrednost za vzorce soka rdeče pomaranče z dodatkom ekstraktov po prvem in dvanajstem tednu.

4.3 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI ASKORBINSKE KISLINE

Preglednica 9: Vsebnost askorbinske kisline v soku rdeče pomaranče po dvanajstih tednih staranja

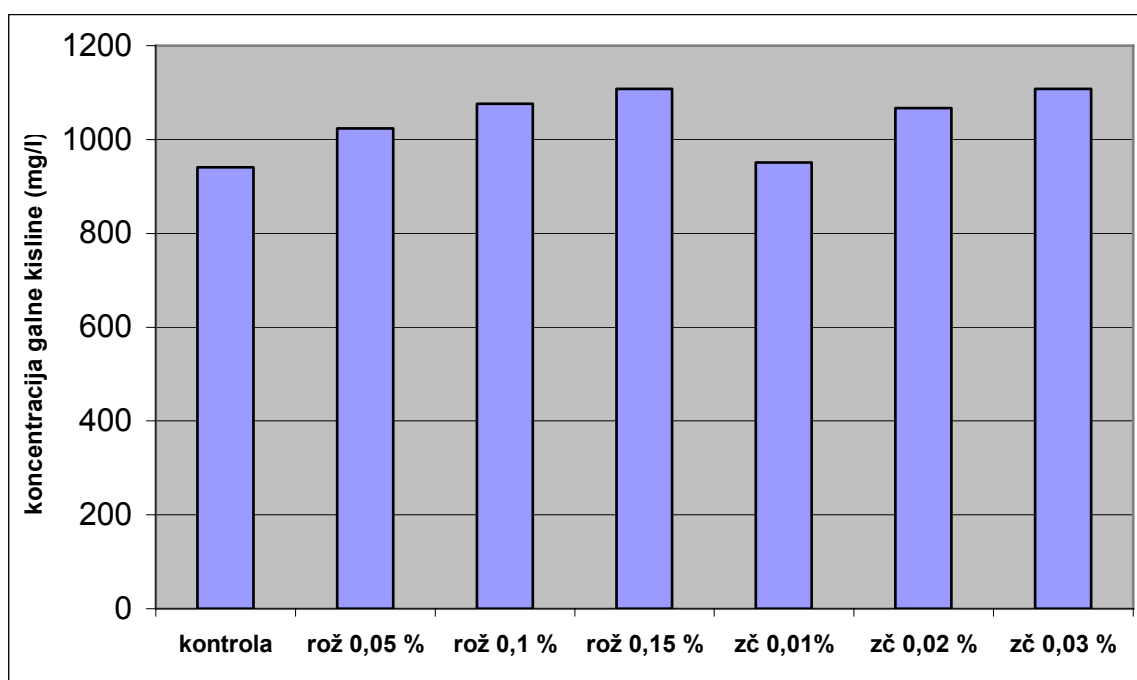
	Sok z ekstrakti	Vsebnost askorbinske kisline (mg/l)
začetek poskusa	sveže pripravljen sok brez dodatkov	103,3
konec poskusa	kontrola	/
	rož 0,01 %	/
	rož 0,1 %	/
	rož 0,15 %	2,2
	zč 0,01 %	/
	zč 0,02 %	/
	zč 0,03 %	/

Analizo askorbinske kisline smo opravili ob koncu poskusa. Samo največji dodatek rožmarina je zaščitil askorbinsko kislino v soku rdeče pomaranče. Tudi po večmesečnem staranju soka na 37 °C je bilo v tem vzorcu še 2,2 mg askorbinske kisline v 1l soka.

4.4 REZULTATI ANALIZE SKUPNIH FENOLNIH SNOVI

Preglednica 10: Vsebnost skupnih fenolnih snovi v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti določenih ob začetku poskusa

Sok z dodanimi ekstrakti	Ekvivalent galne kisline (mg/l)
kontrola	940,2
rož 0,05 %	1024,1
rož 0,1 %	1076,5
rož 0,15 %	1107,9
zč 0,01 %	950,7
zč 0,02 %	1066,7
zč 0,03 %	1107,9



Slika 18: Skupne fenolne snovi izražene v mg galne kisline/l v soku rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti določenih ob začetku poskusa.

Reducirajoči sladkorji, zlasti fruktoza so sposobni redukcije volframata in molibdata (komponenti Folin – Ciocalteujevega reagenta) v alkalnem. Z ozirom na koncentracijo reducirajočih sladkorjev je potrebna korekcija izračunane koncentracije skupnih fenolnih spojin izraženih kot miligram galne kisline na liter (Košmerl, 2000).

Ker je količina reducirajočih sladkorjev v soku rdeče pomaranče 37 g/l, smo pri izračunanih vrednostih, zapisanih v preglednici 10, upoštevali korekcijski faktor 1,06.

Fenolne snovi delujejo kot antoksidanti. Za fenolne antioksidante predpostavljajo, da zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom (Trošt, 2004).

Vsebnost fenolnih snovi se je z večanjem dodatka ekstraktov rožmarina in zelenega čaja sorazmerno povečala glede na kontrolni vzorec (slika 18).

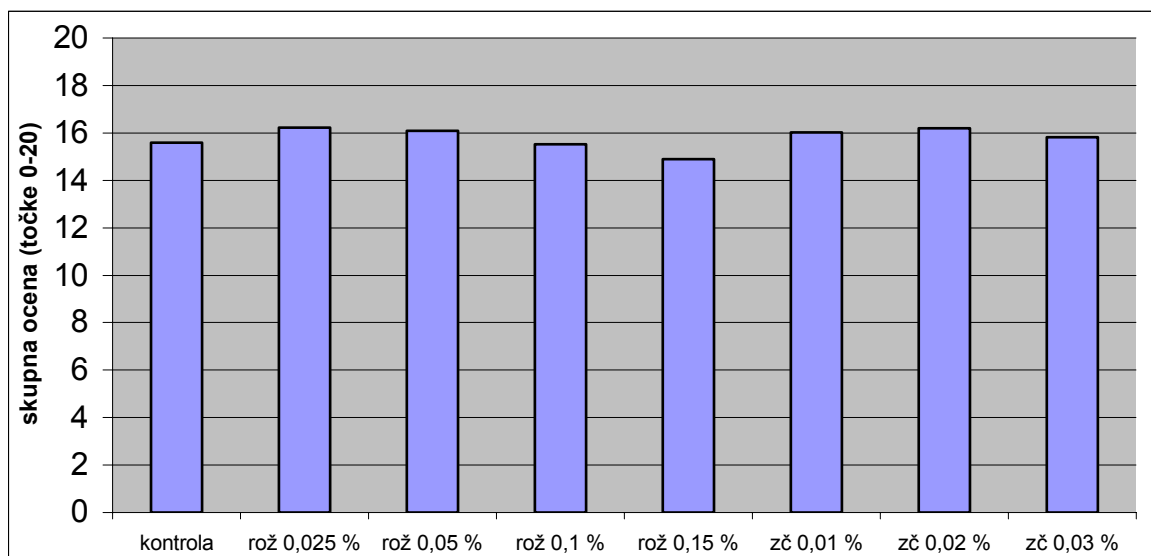
4.5 REZULTATI SENZORIČNEGA OCENJEVANJA

Rezultate senzoričnega ocenjevanja soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti rožmarina in zelenega čaja podajamo na slikah 19 – 22. Sliki 19 in 20 prikazujeta ocene senzoričnega panela oziroma ocenjevalcev – potrošnikov po šestih tednih skladiščenja, sliki 21 in 22 pa po dvanajstih tednih skladiščenja.

Senzorični panel je ocenjeval z analitično točkovno metodo, in sicer okus s točkami 0 – 8, vonj, barvo in bistrost pa s točkami 0 – 4, pri čemer je 0 točk pomenilo popolno neustreznost senzorične lastnosti, 8 oz. 4 točke pa optimalno izraženo senzorično lastnost. Ocenjevalci – potrošniki so ocenjevali stopnjo sprejemljivosti soka s stališča potrošnikov. Ker so bili le-ti ocenjevalci iz vrst zaposlenih na Fructalu in dobro poznajo značilnosti soka rdeče pomaranče, so bili pri svojih ocenah zelo strogi.

Namen senzoričnega ocenjevanja je bil ugotoviti ali dodani ekstrakti rožmarina in zelenega čaja vplivajo na senzorične lastnosti soka rdeče pomaranče, ali dodatke spoznamo v spremembi barve, vonja, okusa, ali dodatki prispevajo k priokusu, ali povzročajo pookus. Zato smo prvo preskusno senzorično ocenjevanje izvedli takoj po pasterizaciji sokov. Izkušeni senzorični ocenjevalci so zaznali rožmarinov ekstrakt že pri najmanjšem dodatku. Z večanjem dodatka ekstrakta v soku rdeče pomaranče, je bil vpliv na vonj in okus soka rdeče pomaranče vse bolj izrazit. Zato smo za senzorično analizo dodatno pripravili še vzorec soka z manjšim dodatkom ekstrakta rožmarina, in sicer 0,025 %. Ta dodatek na začetku poskusa ni vplival na spremembo senzoričnih lastnosti soka rdeče pomaranče. Pri vzorcih sokov, ki so jim bili dodani ekstrakti zelenega čaja, pa je bilo čutiti grenak priokus, vendar le-ta ni bil moteč.

Na sliki 19 so grafično prikazane ocene senzoričnega panela. Rezultati kažejo, da se je pri kontrolnem vzorcu soka (sok brez dodanih ekstraktov) že čutil vonj in okus po starikavosti, kar je naravna posledica staranja. Pri soku z dodatkom rožmarinovega ekstrakta se je priokus po rožmarinu z večanjem dodatka jačal. Soku se je na okusu in vonju poznal dodatek ekstrakta rožmarina tako pri najmanjšem kot pri največjem dodatku. Pri najmanjšem dodatku ekstrakta rožmarina je bil sok še vedno sprejemljiv, medtem ko sta bila pri večjih dodatkih okus in vonj po rožmarinu preveč izrazita in zaradi tega tudi moteča. Pri analizi soka, ki mu je bil dodan manjši dodatek ekstrakta zelenega čaja je bil okus spremenjen, zaznal se je rahel priokus grenkobe. Nekateri ocenjevalci so to opisali z okusom po topilih. Za večino ocenjevalcev sta bila okus in vonj soka pri vseh treh koncentracijah ekstrakta še vedno sprejemljiva.

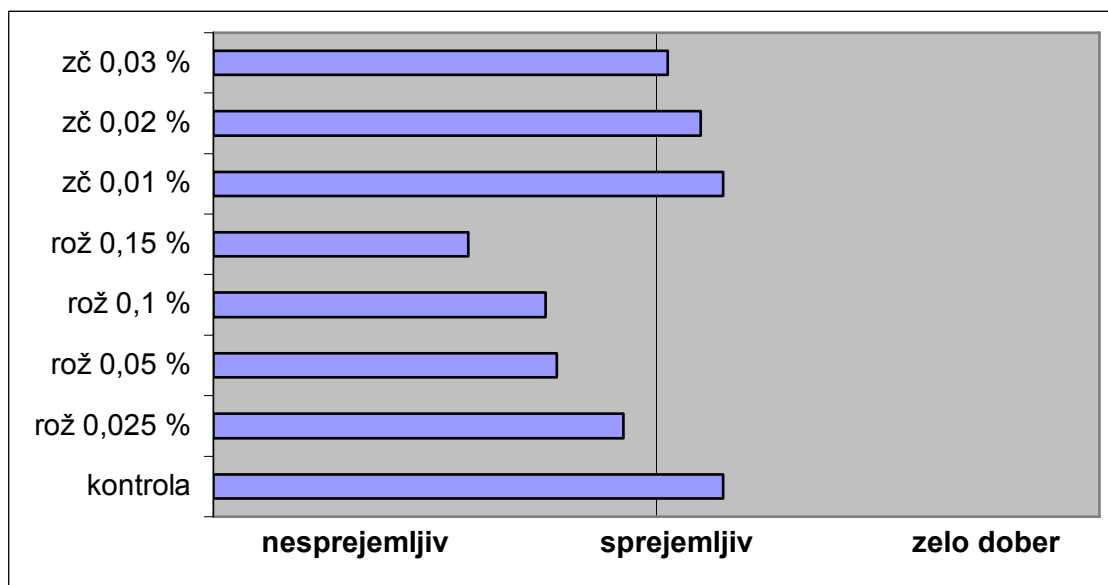


Slika 19: Senzorične ocene soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po šestih tednih skladiščenja.

Ocena sprejemljivosti soka, ki so jo podali preizkuševalci (ponazorjena na sliki 20) je bila podobna. Kontrolnemu vzorcu so pripisali starikav okus. Priokus rožmarina so zaznali že pri najmanjšem dodatku ekstrakta, zato so tudi ocene nizke. Pri ekstraktih zelenega čaja so zaznali grenkobo, ki je bila v soku z največjim dodatkom preveč izrazita.

Razlike v ocenah med senzoričnim panelom in ocenjevalci – potrošniki so precejšne. Ocenjevalci potrošniki so sok ocenili bolj kritično. Vsak priokus, neznačilen vonj ki ga puščajo ekstrakti so kaznovali z nižanjem ocene. Tako je iz slike 20 razvidno kako večanje dodatka ekstraktov vpliva na senzorične lastnosti soka. Najvišjo oceno sprejemljivosti sta prejela vzorca soka z najmanjšim dodatkom ekstrakta zelenega čaja in kontrolni vzorec soka.

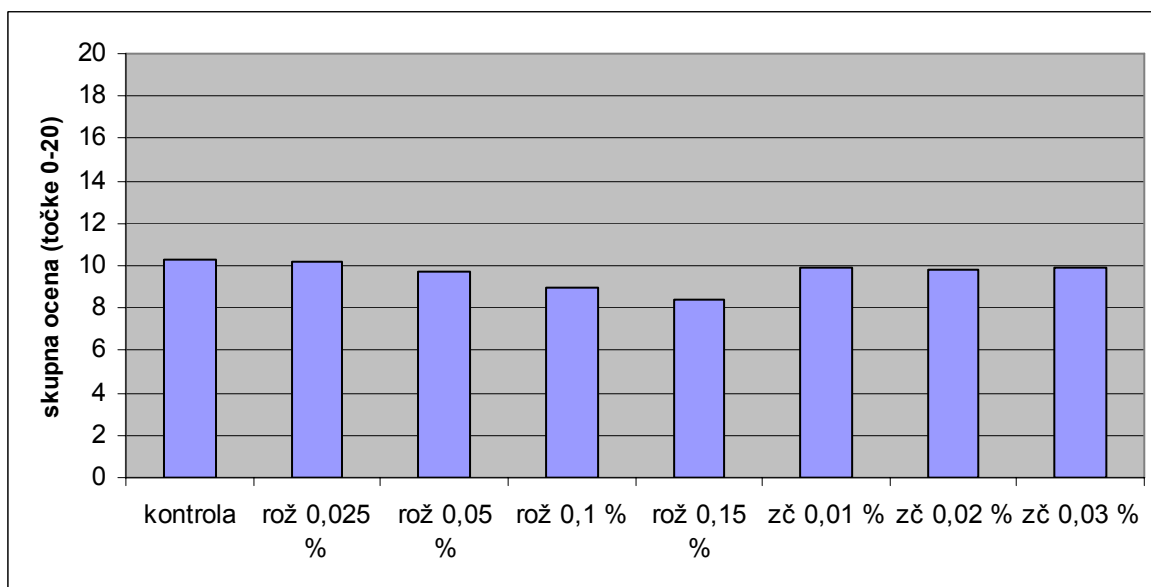
Senzorični panel so sestavljali ocenjevalci iz različnih kateder oddelka za živilstvo. Med njimi so bili strokovnjaki s področja vinarstva, sadjarstva, oljarstva in pekarstva. Pri obdelavi dobljenih rezultatov je bilo razvidno, da so ocenjevalci s področja vinarstva pripisali višje ocene vzorcem soka z večjim dodatkom ekstraktov, ki so dali soku grenak, trepek okus, kar je ocenjevalce spominjalo na taninske komponente v vinu.



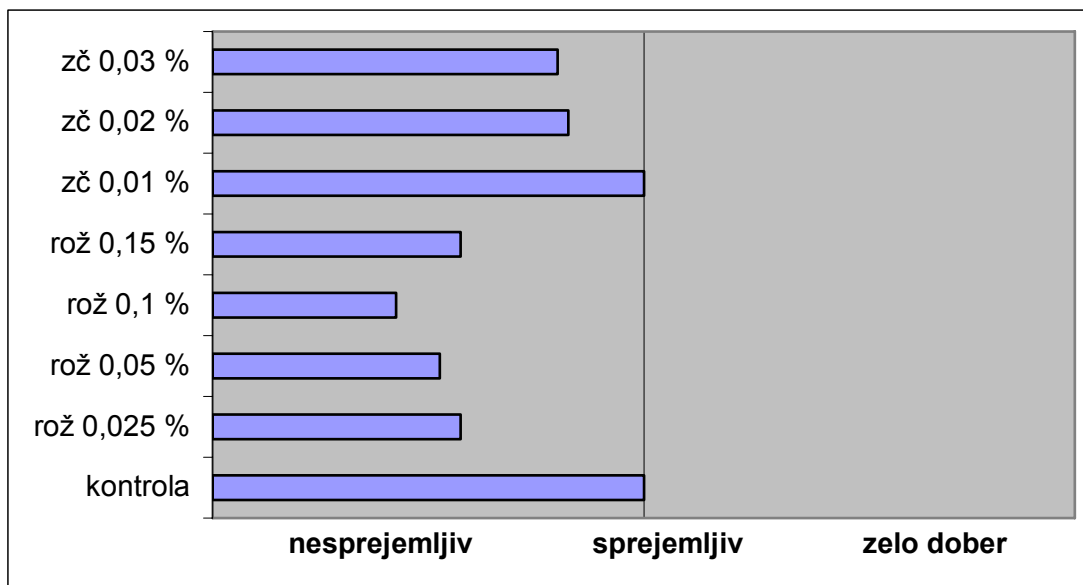
Slika 20: Senzorična sprejemljivost soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po šestih tednih skladiščenja.

Po dvanajstih tednih je senzorični panel v vseh analiziranih sokovih, zlasti sokovih z večjim dodatkom ekstraktov zaznal vonj in okus po starem, postanem. Temu primerne so tudi nižje ocene, ki so prikazane na sliki 21.

V soku z dodatkom rožmarinovega ekstrakta sta se vonj in okus po rožmarinu še ojačala in bila zelo moteča. V soku z dodatkom ekstrakta zelenega čaja je prevladoval moteč grenak priokus, ter vonj po starem prekuhanem pomarančnem soku.



Slika 21: Senzorične ocene soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po dvanajstih tednih skladiščenja



Slika 22: Senzorična sprejemljivost soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti po dvanajstih tednih skladiščenja

Sprejemljivost soka z dodanimi ekstrakti se je po dvanajstih tednih skladiščenja še poslabšala (slika 22). Ocene sprejemljivosti soka se z večanjem dodatka ekstraktov slabšajo.

Ocene vzorcev soka rdeče pomaranče z dodatki ekstraktov rožmarina so bile nižje, kot pri soku z dodanimi ekstrakti zelenega čaja. Kontrolni vzorec soka, ki bi moral imeti najnižjo oceno, je imel v našem primeru najvišjo oceno.

4.6 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV ANALIZ PO DVANAJSTIH TEDNIH SKLADIŠČENJA

Preglednica 11: Statistična analiza rezultatov analiz soka rdeče pomaranče z dodatki antioksidantov po dvanajstih tednih skladiščenja.

		Merjeni parametri							
		AOP (nmol/l)	L	a*	b*	okus	vonj	bistrost	barva
Sok z ekstrakti	kontrola	0,248±0,015 ^b	24,22±3,61 ^{ab}	15,91±3,26 ^{ab}	21,43±5,26 ^{ab}	4,00±0,00 ^{ab}	1,7±0,3 ^a	1,0±0,0 ^a	4,0±0,0 ^a
	rož 0,05 %	0,304±0,019 ^a	26,36±1,96 ^a	17,02±1,69 ^{ab}	25,13±2,95 ^a	3,80±0,76 ^{ab}	1,5±1,1 ^a	0,9±0,2 ^{ab}	4,0±0,0 ^a
	rož 0,1 %	0,308±0,021 ^a	26,62±1,04 ^a	17,67±0,59 ^a	25,62±2,39 ^a	4,30±0,27 ^a	2,2±0,8 ^a	0,7±0,4 ^{bc}	4,0±0,0 ^a
	rož 0,15 %	0,305±0,034 ^a	24,09±1,60 ^{ab}	14,87±0,49 ^{bc}	21,12±2,22 ^{ab}	3,90±0,22 ^{ab}	2,0±0,8 ^a	0,7±0,4 ^{bc}	4,0±0,0 ^a
	zč 0,01 %	0,252±0,035 ^b	22,26±1,26 ^a	13,13±0,69 ^c	17,55±1,90 ^b	3,30±0,48 ^b	2,0±0,2 ^a	0,6±0,5 ^{bc}	4,0±0,0 ^a
	zč 0,02 %	0,255±0,043 ^b	24,59±1,62 ^{ab}	15,54±2,03 ^{abc}	21,47±3,23 ^{ab}	3,30±0,57 ^b	1,8±0,4 ^a	0,6±0,5 ^c	4,0±0,0 ^a

a, b, c: vrednosti, ki imajo v stolpcu enako črko se med seboj statistično značilno ne razlikujejo ($p > 0,05$)

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT. Osnovni statistični parametri so bili izračunani s postopkom MEANS. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili postopek GLM (General Linear Modul). Predvsem nas je zanimalo, če kateri od dodanih ekstraktov pri vzorcih soka starih dvanajst mesecev izstopa po svojem učinkovanju.

Pri reakciji soka z reagentom DPPH se absorbanca zniža. Večja kot je redukcija barve (nižja absorbanca), več antioksidantov je v vzorcih soka. Z matematičnim izračunom lahko dobljeno absorbanco pretvorimo v antioksidacijski potencial (nmol/l).

Iz statistično obdelanih rezultatov (preglednica 11) razberemo, da je imel kontrolni vzorec soka najnižji antioksidacijski potencial, kar pomeni, da je vseboval tudi najmanj antioksidantov.

Pri vzorcih soka z različnimi dodatki ekstraktov rožmarina opazimo, da se vrednosti antioksidacijskega potenciala bistveno ne razlikujejo med seboj.

Med sokovi z različnimi dodatki ekstraktov rožmarina ni bilo statistično značilnih razlik. Vzorci soka z dodatki rožmarinovega ekstrakta imajo večji antioksidacijski potencial kot vzorci soka z dodatki ekstrakta zelenega čaja ($p > 0,05$) tudi po večmesečnem staranju soka.

Naraščanje L vrednosti pomeni, da je merjen vzorec postajal svetlejši. Najtemnejši vzorec z najnižjo izmerjeno L vrednostjo je kontrola, brez dodatkov ekstraktov.

Pri prvih dveh dodatkih ekstraktov rožmarina je L vrednosti višja, kar pomeni, da sta bila vzorca svetlejša od kontrole. Pri vzorcu soka z največjim dodatkom rožmarinovega ekstrakta se je vrednost L zniževala, kar pomeni da je sok postajal temnejši.

Pri vzorcih soka z dodatki zelenega čaja, L vrednost z naraščanjem dodatka narašča, kar pomeni svetlejši odtenek barve, vendar še vedno nižji kot je pri kontroli in vzorcih z dodatki rožmarina. Šele najvišji dodatek ekstrakta zelenega čaja se približa L vrednosti kontrole.

Iz preglednice 11 lahko razberemo, da ni statistično značilnih razlik med različnimi dodatki rožmarina in zelenega čaja.

Če primerjamo a^* vrednost kontrolnega vzorca soka z izmerjenimi a^* vrednostmi vzorca soka z dodatki ekstraktov rožmarina, so le ti višji, kar pomeni, da je bil sok bolj rdečkaste barve kot kontrolni vzorec. Odstopa le vzorec z največjim dodatkom rožmarinovega ekstrakta, ki ima a^* vrednost nižjo kot kontrolni vzorec.

Pri vzorcu soka z najmanjšim dodatkom zelenega čaja je bila vrednost a^* nižja kot v kontrolnem vzorcu, pri vzorcu z največjim dodatkom pa je bila vrednost a^* višja kot v kontrolnem vzorcu. Vzorec kontrolnega soka je bil tako bolj rdeč kot vzorec soka z najmanjšim dodatkom zelenega čaja, ter manj rdeč kot vzorec soka z največjim dodatkom zelenega čaja.

Najbolj rdeč odtenek barve sta imela vzorca soka z dodatkom 0,05 % in 0,1 % ekstrakta rožmarina.

Med različnimi dodatki ekstrakta rožmarina in zelenega čaja ni statistično značilnih razlik, izstopa le sok 0,1 % dodatka rožmarina, ki ima statistično značilno višjo vrednost a .

Vrednosti b^* se je pri vzorcih soka z dodanimi ekstrakti rožmarina 0,05 % in 0,1 % povečala. Vzorca sta imela bolj rumen odtenek glede na kontrolni vzorec soka. Pri največjem dodatku ekstrakta, smo izmerili enako vrednost kot v kontrolnem vzorcu soka.

Vzorci soka z dodanimi ekstrakti zelenega čaja so imeli enake oz. nižje vrednosti kot kontrolni vzorec soka. To nakazuje na to, da je imel sok z največjim dodatkom ekstrakta rožmarina in ekstrakta zelenega čaja ob koncu staranja podobne b^* vrednosti kot kontrolni vzorec. Odstopala sta samo vzorca soka z dodanimi ekstraktoma rožmarina 0,05 % in 0,1 %, kar pomeni da sta bila vzorca soka bolj rumenkasta glede na kontrolni vzorec soka.

Med sokom z različnimi dodatki ekstraktov rožmarina in zelenega čaja ni bilo statistično značilnih razlik.

4.7 ANALIZA POVEZANOSTI SPREMENLJIVK

Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta za vse analizirane parametre smo določili s statističnim programom SAS System. Izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti so podani v preglednici 12 in povedo, kakšne so povezave med posameznimi neodvisnimi, analiziranimi parametri. Razvidno je, da so med posameznimi parametri pozitivne in negativne zveze.

Preglednica 12: Korelacijski koeficienti med analiziranimi parametri

	AOP	L	a*	b*	okus	vonj	bistrost
AOP	1	-0,74	-0,63	-0,76	-0,66	-0,06	-0,03
L		1	0,97	0,99	0,64	-0,21	0,25
a*			1	0,97	0,71	-0,20	0,37
b*				1	0,69	-0,20	0,30
okus					1	0,20	0,47
vonj						1	-0,59
bistrost							1

AOP – antioksidacijski potencial; L – merjenje barve; a* - merjenje barve; b* - merjenje barve; okus, vonj, bistrost – senzorični parametri; - pred številom pomeni negativno korelacijo; obarvana polja – med parametri je močna zveza

Iz preglednice 12 je razvidno, da je antioksidacijski potencial v negativni korelaciji s parametri barve (L, a*, b*), ter senzoričnimi parametri (okus, vonj, bistrost). V pozitivni korelaciji so med seboj parametri L, a* in b*. Okus je v pozitivni korelaciji s parametri barve, kar pa ne velja za vonj, ki je z njimi v negativni korelaciji. Vonj je v pozitivni korelaciji le z okusom. Bistrost je v negativni korelaciji z antioksidacijskim potencialom in vonjem, s parametri barve in okusom pa je v pozitivni korelaciji.

Na osnovi Pearsonovega korelacijskega koeficienta R, ki je pri linearni zvezi enak kvadratnemu korenu determinacijskega koeficienta, smo ovrednotili stopnjo povezanosti med posameznima, neodvisnima spremenljivkama. Med spremenljivkami smo iskali zvezo, ki je močna (večja od 0,7). Našli smo šest močnih povezav, ki so bile statistično značilne pri 0,05 stopnji tveganja. Te povezave so naslednje: antioksidacijski potencial in L vrednost (0,74), antioksidacijski potencial in a* vrednost (0,76), vrednosti L in a* (0,97), vrednosti L in b* (0,99), vrednosti a* in b* (0,97) ter vrednosti a* in okus (0,71).

Povezanost spremenljivk je naključna, odvisna od napak pri merjenju. Na spremenljivke delujejo biološki in drugi dejavniki (pasterizacija, homogenizacija, deaeracija) variabilnosti. Nekatere močne povezave med spremenljivkami so pozitivne, kar pomeni, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, nekatere povezave pa so negativne.

Statistično močne in odvisne korelacijske povezave so med parametri barve L, a^* in b^* . Ti parametri so povezani med seboj (tridimenzionalna povezava). Če se eden od parametrov poveča, se povečata tudi druga dva.

Statistično močne zveze so še med antioksidacijskim potencialom od L in b^* vrednostjo. Pri obeh gre za negativno korelacijo. Če se antioksidacijski potencial poveča, se vrednosti L in b^* znižata. Več kot je v soku antioksidantov, bolj je sok svetel.

Močno statistično odvisnost kažeta tudi spremenljivki a^* in okus. Pri njiju gre za pozitivno korelacijo.

5 RAZPRAVA IN SKLEP

5.1 RAZPRAVA

Sok rdeče pomaranče je občutljiv na spremembe barve. Choi in sod (2002) navajajo, da vsebuje sok rdeče pomaranče naravna rdeča barvila antociane, ki so zelo občutljivi na oksidacijo in segrevanje.

Naravni antioksidanti iz rožmarina in zelenega čaja imajo dokazan zaščitni vpliv pred oksidacijo (Bezjak, 2004).

Postavili smo hipotezo, da antioksidanti upočasnijo razpad antocianov in posledično spremembo barve soka rdeče pomaranče.

- Antioksidacijski potencial

V soku med staranjem potekajo oksidacijski procesi. Raspor in sod. (2000) so antioksidante prišteli med inhibitorje oksidacij, ki preprečujejo ali zadržujejo oksidacijo posameznih komponent soka.

Antioksidacijski potencial je zmožnost antioksidanta, da prepreči oksidacijo.

Rezultati analize antioksidacijskega potenciala med staranjem soka jasno kažejo, da ima sok brez dodanih ekstraktov rožmarina in zelenega čaja tudi po večmesečnem staranju nižji antioksidacijski potencial.

Ekstrakt rožmarina je zelo učinkovit že pri dodatkih v nizkih koncentracijah in lahko zlahka nadomesti uporabo sintetičnih antioksidantov (Quirin, 2003). Z večanjem dodatka ekstraktov rožmarina in zelenega čaja narašča tudi antioksidacijski potencial.

Ob začetku poskusa sta dodatka ekstrakta zelenega čaja 0,03 % in 0,01 % imeli višji antioksidacijski potencial od ostalih vzorcev soka z dodanimi ekstrakti in kontrole. Ekstrakt zelenega čaja vsebuje polifenolne snovi z visokim antioksidacijskim potencialom (Bezjak, 2003).

Vzorci soka, z dodanimi ekstrakti rožmarina so imeli po večmesečnem staranju soka na 37 °C višji antioksidacijski potencial kot vzorci z dodanimi ekstrakti zelenega čaja.

- Merjenje barve

Rezultati merjenja barve s kromometrom Minolta so zelo variabilni. Predvsem je to posledica neustreznega nastavka na instrumentu, ki je prilagojen merjenju barve plodov sadja in ne barve sokov.

L vrednosti so se s staranjem soka zviševale, kar nam pove, da je sok s staranjem postajal svetlejši. Zviševanje L vrednosti je bilo večje pri vzorcih soka z dodatki rožmarinovega ekstrakta. Najvišjo L vrednost pa je imel sok z 0,1 % dodatkom ekstrakta rožmarina, vendar razlike niso bile statistično značilne.

Zniževanje L vrednosti gre predvsem na račun neustreznega tehnološkega postopka priprave soka, kjer je bila izpuščena faza homogenizacije in deaeracije. Tako so se večji sadni delci posedli na dno merilne posode.

a* vrednost se je za vse vzorce soka s staranjem zniževala. Ta podatek nam pove, da je sok izgubljal rdeč odtenek. Pri vzorcih soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti zelenega čaja je prišlo do večjih izgub rdečega odtenka kot pri vzorcih z dodanimi ekstrakti rožmarina. Razlike niso statistično značilne.

b* vrednost se je pri vseh vzorcih soka, z dodatki in brez večala. Sok je s staranjem pridobival rumen odtenek.

Če primerjamo vzorce soka z dodanimi ekstrakti rožmarina s kontrolo, ugotovimo, da so pri vzorcu soka z največjim dodatkom ekstrakta rožmarina, vrednosti L, a* in b* nižje kot pri kontrolnem vzorcu soka rdeče pomaranče. Iz tega lahko sklepamo, da večji dodatki ekstraktov rožmarina ne vplivajo pozitivno na barvo soka rdeče pomaranče.

Prav tako lahko trdimo, da pri vzorcu soka rdeče pomaranče le največji dodatek ekstrakta zelenega čaja doprinese, da se vrednosti približajo oz. presežejo vrednosti kontrolnega vzorca. Vsi ostali vzorci soka z različnimi dodatki ekstraktov imajo vrednosti nižje od kontrolnega vzorca. To si razlagamo kot negativni odstop v kakovosti barve soka v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

- Askorbinska kislina

Maccarone in sod (1996) navajajo, da je askorbinska kislina naravno prisoten antioksidant v soku rdeče pomaranče. Občutljiva je na visoke temperature, svetlobo in kisik

Največji dodatek ekstrakta rožmarina v sok rdeče pomaranče je zaščitil askorbinsko kislino pred popolnim razpadom. Pri ostalih vzorcih soka rdeče pomaranče z dodanimi ekstrakti, askorbinske kisline z analizo nismo zaznali. Machlin in sod. (1994) navajajo, da se lahko askorbinska kislina v hrani delno ali pa popolnoma oksidira med dolgotrajnim skladiščenjem.

Pri soku rdeče pomaranče, ki mu je bil dodan kot antioksidant askorbinska kislina, so opazili 50 % znižanje vsebnosti askorbinske kisline v prvih treh tednih pri staranju soka na 4,5 °C. Do popolne izgube askorbinske kisline je prišlo po petih tednih staranja. Sok rdeče pomaranče, ki se mu je dodalo askorbinsko kislino kot antioksidant, je med staranjem imel manjše izgube, kot sok, ki mu nismo dodali askorbinske kisline (Choi in sod., 2002).

- Fenolne snovi

Abram (2000) navaja, da so fenolne spojine sekundarni metaboliti, ki nastanejo iz primarnih metabolitov. Flavonoidi se smatrajo za antioksidante, čeprav rezultati nekaterih študij kažejo tudi na to, da so lahko genotoksični.

Skupne fenolne snovi smo določali spektrofotometrično. Določali smo jih v vzorcih soka rdeče pomaranče brez dodanih ekstraktov, ter v vzorcih z dodanimi ekstrakti antioksidantov rožmarina in zelenega čaja. Vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila najmanjša v vzorcu soka, brez dodanega ekstrakta antioksidantov. V vzorcih, kjer so bili dodani ekstrakti, pa se je povečevala glede na količino antioksidanta.

- **Senzorična ocena**

Rezultati senzoričnega ocenjevanja se ne ujemajo z rezultati analize barve. Sok je s staranjem postajal temnejši, rdeča barva pa se je vse bolj spreminjala do rjavkastih odtenkov. Dodatek ekstraktov antioksidantov je v soku vplival negativno tako na okus kot na vonj. Dodatki ekstraktov rožmarina so dali soku vonj in okus po rožmarinu. S staranjem soka sta se okus in vonj po rožmarinu še ojačala. Dodani ekstrakti zelenega čaja so v soku rdeče pomaranče povzročili grenak priokus, ki je bil na začetku poskusa sprejemljiv, s staranjem vzorcev pa je postal bolj intenziven in moteč.

Is senzoričnega vidika lahko trdimo, da je staran sok z dodanimi naravnimi antioksidanti rožmarina in zelenega čaja nesprejemljiv.

- **Korelacijska analiza**

S pomočjo Pearsonovega korelacijskega koeficienta R smo ovrednotili stopnjo povezanosti med posameznimi neodvisnimi spremenljivkami. Našli smo šest močnih povezav ($R > 0,7$). To so antioksidacijski potencial in L vrednost, antioksidacijski potencial in a^* vrednost, L in a^* vrednost, L in b^* vrednost, a^* in b^* vrednost ter a^* vrednost in okus. L , a^* in b^* so v pozitivni korelaciji, kar je tudi razumljivo, saj vemo, da so vrednosti tridimenzionalno povezane (Žabkar, 1998).

Naša delovna hipoteza je bila, da naravni antioksidanti zaustavijo potemnenje barve soka rdeče pomaranče, česar pa nam naši rezultati niso potrdili.

Vzorci soka z dodanimi ekstrakti se po odtenku barve pri vizualni oceni niso razlikovali med seboj, niti se niso razlikovali od kontrolnega vzorca.

Naravni antioksidanti puščajo soku nesprejemljiv priokus in vonj.

Okus in bistrost sta v pozitivni korelaciji z barvnimi parametri (L , a^* , b^*), kar pomeni, da se pri spremembah barve s staranjem soka spreminjata tudi okus in bistrost.

Iz vseh zgornjih podatkov lahko sklepamo, da večji kot je antioksidacijski potencial vzorca soka, manjša je sprememba barve (L , a^* , b^*).

5.2 SKLEP

Glede na rezultate opravljenih analiz smo prišli do naslednjih zaključkov:

- naravni antioksidanti ekstraktov rožmarina in zelenega čaja niso zavrli procesa potemnenja soka rdeče pomaranče
- antioksidacijski potencial je v vzorcih soka z dodanimi ekstrakti rožmarina višji kot pri dodanih ekstraktih zelenega čaja
- vzorcem soka se je ne glede na dodan ekstrakt spremenila barva
- le največja koncentracija dodanega ekstrakta rožmarina je delno preprečila razgradnjo askorbinske kisline
- dodatki vseh ekstraktov antioksidantov rožmarina in zelenega čaja v soku rdeče pomaranče so puščali priokus in vonj, pri dodatku rožmarina bistveno bolj, kot pa pri dodatku zelenega čaja
- sprememba okusa in vonja zaradi dodanih ekstraktov se je s staranjem soka pojačala
- dodatek ekstraktov rožmarina in zelenega čaja je povečal vsebnost skupnih fenolnih snovi v soku

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali naravni antioksidanti rožmarina in zelenega čaja preprečijo temnenje soka rdeče pomaranče.

Koncentratu rdeče pomaranče smo dodali vodo do 11,4 % Brix, ter mu nato dodali tri različne koncentracije ekstrakta rožmarina in tri različne koncentracije ekstrakta zelenega čaja. Sok smo stekleničili in ga pasterizirali pri 90 °C. Vzorce soka smo termostatirali pri 37 °C za dobo dvanajstih tednov.

Analize smo opravljali vsak drugi teden. Opravili smo meritve barve s kromometrom Minolta in antioksidacijskega potenciala po DPPH metodi. Ob zadnji analizi smo opravili tudi vsebnost askorbinske kisline s HPLC kromatografijo in skupnih fenolnih snovi.

Rezultati so pokazali da dodani ekstrakti antioksidantov rožmarina in zelenega čaja ne zaustavijo temnenja soka rdeče pomaranče. Po vizualnem pregledu vzorcev soka ni bilo zaznati razlik v odtenku barve.

Senzorično ocenjevanje je v največji meri pokazalo, da okus in vonj po rožmarinu in zelenem čaju motita v soku rdeče pomaranče že v najmanjših koncentracijah. S staranjem vzorcev soka sta se vonj in okus pri dodatkih naravnih antioksidantov okrepila in pustila nesprijemljiv priokus.

Dodatek naravnih ekstraktov rožmarina in zelenega čaja je povečal vsebnost skupnih fenolnih snovi. Pri večjem dodatku ekstrakta je bila večja tudi vsebnost polifenolnih snovi. Sok z dodatkom 0,15 % ekstrakta rožmarina je imel enako vsebnost polifenolnih snovi kot sok z dodatkom 0,03% ekstrakta zelenega čaja.

Analiza vsebnosti askorbinske kisline v staranih vzorcih soka z dodanimi ekstrakti ob koncu poskusa je pokazala, da je le najvišja koncentracija ekstrakta rožmarina zaščitila askorbinsko kislino.

Pri testiranih koncentracijah se je pokazalo, da je ekstrakt rožmarina močnejši antioksidant kot ekstrakt zelenega čaja.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23 - 33
- Bezjak M. 2004. Stabilizacija likopena z naravnimi antioksidanti v ketchupu. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-19
- Bernot Sotenšek M. 2001. Antioksidativne učinkovanje ekstraktov rožmarina v zamrznjenih sekljanih puranjih zrezkih. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17 - 22
- Choi M. H., Kim. H. G., Lee H. S. 2002. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. Food Research International, 35: 753 – 759
- Cortese D. 2000. Sadje - moč naravne hrane. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 199 - 199
- Dobaja I. 1991. KKO – vrednosti pomarančnih sokov. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1 - 2
- Forsyth J., Damian J. 2003. Types on the market – citrus fruits. V: Encyclopedia of food science and nutrition. 2nd ed. Vol. 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1329 – 1332
- Hadolin M. 2000. Primeri izolacije flavonoidov iz naravnih materialov. Magistrsko delo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 10 - 30
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11 - 23
- Košmerl T. 2004. Osnove kemijske analize mošta in vina. Laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97 - 110
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotinskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-39
- Lanza C. M. 2003. Processed and derived products of oranges – citrus fruits. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Vol. 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1341 – 1346

- Maccarone E., Campisi S., Cataldi Lupo M. C., Fallico B., Nicolosi Asmundo C. 1996. Effeti dei trattamenti tecnologici sui costituenti del succo di arancia rossa di Sicilia. *Industrie delle Bevande*, 25: 335 - 341
- Maccarone E., Maccarone A., Rapisarda P. 1985. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of Food Science*, 50: 901 - 904
- Pao S., Fellers P. J. 2003. Oranges – citrus fruits. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Vol. 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic press: 1341 – 1346
- Pipan V. 1990. Kakovost zamrznjenih mesnih sekljancev po dodatku antioksidantov. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40 - 40
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocес pridobivanja antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65
- Rižner A. 2000. Izolacija aktivnih učinkovin rožmarina. *Doktorska disertacija*. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 1 - 56
- Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179 - 191
- Trošt K. 2004. Študija oksidacije in neencimskega temnenja sokov iz citrusov. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 25 - 30
- Trifiro A., Gherardi S., Calza M. 1995. Effeti della temperatura e del tempo di immagazzinaggio sulla qualita dei succhi freschi di arance pigmentate. *Industria Conserve*, 70: 243 - 251
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-111
- *Vitamins basic* 1997. 2nd ed. Basel, F. Hoffmann – La Roche: 21 - 24
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: *Funkcionalna živila*. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97 – 109

- Zore N. 1996. Alkaloidi-derivati purina v čaju. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 8 – 10
- Žabkar D. 1998. Spremembe kromometričnih parametrov med skladiščenjem jabolk cv. Granny Smith. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4 – 9
- Yukihiro H. 2001. Green tea. Health Benefits and applications. New York, Marcell Dekker inc.: 252 - 252
- Quirin K. W. 2003. SFE of natural antioxidants from rosemary and sage. Innovations in Food Technology, february: 31 – 33.

ZAHVALA:

Za pomoč se najiskreneje zahvaljujem doc. dr. Rajku Vidrihu za strokovno vodenje in koristne napotke. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Tereziji Golob za temeljit pregled diplomske naloge. Zahvala gre tudi Ivici Hočevnar in Barbari Slemenik za pomoč pri zbiranju literature in referiranju.

Na koncu bi se še posebej rad zahvalil tudi mojim staršem, soprogi Juditi, družini in vsem prijateljem, ki so mi v letih študija in nastajanja diplomskega dela stali ob strani.

Od srca Hvala!