

2016•2017  
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN  
*master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## Masterproef

Optimalisatie van procescondities voor productie en opslag van aseptisch  
appelsap

Promotor :  
ing. Liesbet PAULS

Promotor :  
ir. EMILIE VAN DE WEYER

Cindy Wijnants

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële  
wetenschappen: biochemie*

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2016•2017  
Faculteit Industriële  
ingenieurswetenschappen  
*master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## Masterproef

Optimalisatie van procescondities voor productie en  
opslag van aseptisch appelsap

Promotor :  
ing. Liesbet PAULS

Promotor :  
ir. EMILIE VAN DE WEYER

Cindy Wijnants

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële  
wetenschappen: biochemie*

## Woord vooraf

Als laatstejaarsstudente van de opleiding Industrieel Ingenieur Biochemie kreeg ik de mogelijkheid om een 10 weken durende stage uit te voeren op de R&D-afdeling bij Konings NV te Zonhoven. Mijn masterproef focust op de optimalisatie van de procescondities voor de productie en de opslag van aseptisch appelsap.

Tijdens mijn stageperiode kon ik steeds terugvallen op mijn promotoren. Daarvoor wil ik hen graag persoonlijk bedanken. Allereerst wil ik graag het volledige innovatieteam van Konings NV bedanken, maar in het bijzonder ir. Emilie Van de Weyer voor de goede begeleiding. Ondanks haar drukke agenda kon ik steeds bij haar terecht met al mijn vragen. Daarnaast wil ik alle overige werknemers van het bedrijf bedanken voor de behulpzaamheid en de enthousiaste deelname aan mijn talloze sensorische testen. Tot slot wil ik mijn interne promotor ing. Liesbet Pauls bedanken voor de steun, goede moed en motiverende feedback die ze me steeds gaf gedurende mijn masterproef.

De afgelopen 10 weken heb ik zeer veel bijgeleerd. Ik ben dan ook blij dat ik deze leerrijke ervaring heb mogen meemaken en dat ik heb mogen meewerken aan een innovatief onderzoek in de voedingssector.



## Inhoudsopgave

<b>Woord vooraf</b> .....	<b>1</b>
<b>Lijst van tabellen</b> .....	<b>7</b>
<b>Lijst van figuren</b> .....	<b>9</b>
<b>Verklarende woordenlijst</b> .....	<b>11</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>13</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>15</b>
<b>1 Inleiding</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Literatuurstudie</b> .....	<b>19</b>
2.1 Productieproces van appelsap .....	19
2.1.1 Aankoop van appels.....	19
2.1.2 Wassen en sorteren .....	20
2.1.3 Extractie .....	20
2.1.4 Conserveren .....	21
2.1.5 Opslag .....	22
2.1.6 Verpakking .....	23
2.1.7 Desinfectiemethoden.....	24
2.2 Smaakcomponenten in appelsap .....	25
2.2.1 Suikers en organische zuren.....	25
2.2.2 Polyfenolen .....	25
2.3 Kwaliteit van appelsap.....	27
2.3.1 Ascorbinezuur .....	27
2.3.2 Bruinkleuring.....	30
2.4 Microbiologisch bederf van appelsap tijdens opslag .....	35
2.4.1 Sporenvormers.....	35
2.4.2 Detectie.....	36
2.4.3 Patuline .....	36
2.5 Sensorische testen.....	36
2.5.1 Sensorische eigenschappen .....	37
2.5.2 Soorten panels.....	37
2.5.3 Soorten sensorische testen .....	37
<b>3 Productieproces bij Konings NV</b> .....	<b>39</b>

<b>4</b>	<b>Materiaal en methode.....</b>	<b>41</b>
4.1	Sensorische testen.....	41
4.2	Fysicochemische analyse .....	42
4.2.1	Hoeveelheid opgeloste droge stof .....	42
4.2.2	pH en appelzuurgehalte .....	42
4.2.3	Ascorbinezuurgehalte.....	42
4.3	Pasteuriseren.....	43
<b>5</b>	<b>Project 1: Optimalisatie van productieproces voor aseptische opslag van sap....</b>	<b>45</b>
5.1	Proefopzet.....	45
5.1.1	Opvolging productieproces.....	45
5.1.2	Verouderingsexperimenten .....	45
5.2	Resultaten en discussie .....	46
5.2.1	Opvolging productieproces.....	46
5.2.2	Verouderingsexperimenten .....	48
5.3	Conclusie .....	53
<b>6</b>	<b>Project 2: Bepaling maximale opslagperiode van aseptisch opgeslagen sap.....</b>	<b>55</b>
6.1	Proefopzet.....	55
6.2	Resultaten en discussie .....	55
6.2.1	Fysicochemische analyse .....	55
6.2.2	Sensorische testen.....	58
6.3	Conclusie .....	59
<b>7</b>	<b>Project 3: Bepaling ideale blend in fles .....</b>	<b>61</b>
7.1	Proefopzet.....	61
7.1.1	Bepaling ideale blendsamenstelling .....	61
7.1.2	Verouderingsexperiment .....	61
7.2	Resultaten en discussie .....	63
7.2.1	Bepaling ideale blendsamenstelling .....	63
7.2.2	Verouderingsexperiment .....	65
7.2.3	Conclusie .....	72
<b>8</b>	<b>Algemene conclusie.....</b>	<b>75</b>
	<b>Bibliografie .....</b>	<b>77</b>
	<b>Bijlagen .....</b>	<b>85</b>
	Bijlage A: Correctietabel °Brix-waarden .....	85
	Bijlage B: Optimalisatie van productieproces voor aseptische opslag van sap.....	87

Bijlage C: Bepaling maximale opslagperiode van aseptisch opgeslagen sap .....	89
Bijlage D: Bepaling ideale blend in fles .....	90





## Lijst van tabellen

Tabel 1: Optimale niveaus voor CA-opslag van appels [2, p. 6].....	19
Tabel 2: Minimum aantal correcte antwoorden nodig om te besluiten dat het sensorisch verschil significant is voor een bepaald significantieniveau ( $\alpha$ ) en een aantal proefpersonen (n) in een driehoekstest [80]. .....	41
Tabel 3: Statistische verwerking van resultaten van beide blends na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	70
Tabel 4: Statistische verwerking van resultaten van beide blends na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	70
Tabel 5: Statistische verwerking van resultaten van blend AAM N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	71
Tabel 6: Statistische verwerking van resultaten van blend AABP N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	72
Tabel 7: Correctietabel °Brix-waarden (citroenzuur) [88] .....	85
Tabel 8: Meetresultaten opvolging productieproces.....	87
Tabel 9: Toegevoegde en effectieve AA-concentratie en AA-verlies tijdens opvolging productieproces.....	88
Tabel 10: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	88
Tabel 11: pH en appelzuurgehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	88
Tabel 12: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	89
Tabel 13: Hoeveelheid opgeloste droge stof, pH, appelzuurgehalte en AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	89
Tabel 14: Hoeveelheid opgeloste droge stof van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	90
Tabel 15: pH en appelzuurgehalte van blend AAM N2 met daarbij horende referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	90
Tabel 16: AA-gehalte van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	91
Tabel 17: Resultaten voorkeurstest tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	92
Tabel 18: Resultaten voorkeurstest tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	92



## Lijst van figuren

Figuur 1: Schematische voorstelling van het algemeen productieproces van troebel appelsap .....	19
Figuur 2: Ademhalingsreactie van appels met glucose als substraat [5] .....	19
Figuur 3: Horizontale decanteercentrifuge [8, p. 115] .....	21
Figuur 4: Mechanisme van celinactivatie via PEF [18, p. 785] .....	22
Figuur 5: BIB [28] .....	23
Figuur 6: Reactievergelijking van HCl en NaClO <sub>2</sub> tot ClO <sub>2</sub> , NaCl en H <sub>2</sub> O [29].....	24
Figuur 7: Fenton-reactie [30, p. 7] .....	24
Figuur 8: Fotosynthesereactie [32] .....	25
Figuur 9: Structuurformule van quercetine [35, p. 4].....	26
Figuur 10: Structuurformules van ferulinezuur (links) en gallisch zuur (rechts) [35, p. 4].....	27
Figuur 11: Afbraakreacties van AA onder anaerobe (links) en aerobe (rechts) omstandigheden [53, p. 5081] .....	28
Figuur 12: Afbraak van AA i.f.v opslagtijd en bewaartemperatuur [56, p. 614] .....	29
Figuur 13: Enzymgekatalyseerde oxidatie van catechol tot een chinon door PPO (rechts) en niet-enzymgekatalyseerde reductie van een chinon tot catechol waarbij AA geoxideerd wordt tot DHA (links) [9], [49] .....	31
Figuur 14: Overzicht Maillard-reactie [62, p. 3] .....	32
Figuur 15: Reactie van DHA met aminozuren tot bruine pigmenten [36, p. 419].....	33
Figuur 16: NEB i.f.v. opslagtijd en bewaartemperatuur [55, p. 2] .....	34
Figuur 17: Standaardproductieproces van troebel appelsap bij Konings NV .....	39
Figuur 18: Reactievergelijking van appelzuur met NaOH tot H <sub>2</sub> O en een natriummalaat .....	42
Figuur 19: Reactievergelijking van jodaat, jodide tot jood en water [83], [84] .....	42
Figuur 20: Reactievergelijking van jood en AA tot DHA en jodide [83], [84] .....	43
Figuur 21: Verloop AA-gehalte tijdens productieproces van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 .....	46
Figuur 22: Toegevoegde en effectieve AA-concentratie en AA-verlies tijdens opvolging productieproces.....	47
Figuur 23: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	48
Figuur 24: pH-verloop van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	49
Figuur 25: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	50
Figuur 26: Resultaat driehoekstest tussen sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AAM N2 onmiddellijk na productie .....	51
Figuur 27: Resultaat voorkeurstest tussen sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AAM N2 onmiddellijk na productie in week 9 (links) en in week 11 (rechts) .....	52
Figuur 28: Resultaat van de wekelijks uitgevoerde voorkeurstesten tussen sappen afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	52
Figuur 29: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	56
Figuur 30: pH van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	56
Figuur 31: Appelzuurgehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	57

Figuur 32: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	58
Figuur 33: Resultaten sensorische voorkeurstesten tussen sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 na 3 en na 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C .....	59
Figuur 34: Resultaat sensorische driehoekstesten voor bepaling blend AAM N2.....	63
Figuur 35: Resultaat sensorische driehoekstesten voor bepaling blend AABP N2.....	64
Figuur 36: AA-gehalte van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap (links) en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap (rechts) gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	65
Figuur 37: Overzicht van sensorische driehoekstesten tussen blend AAM N2 en daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	66
Figuur 38: Resultaat voorkeurstesten tussen blend AAM N2 en daarbij horend referentiesap na 2, 3, 4 en 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	66
Figuur 39: Overzicht van sensorische driehoekstesten tussen blend AABP N2 en daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	67
Figuur 40: Resultaat voorkeurstesten tussen blend AABP N2 en daarbij horend referentiesap na 3, 4 en 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	68
Figuur 41: Radardiagram: Voorkeur tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	69
Figuur 42: Radardiagram: Voorkeur tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C.....	69
Figuur 43: Radardiagram: Voorkeur blend AAM N2 na 0 weken en 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	71
Figuur 44: Radardiagram: Voorkeur blend AABP N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C .....	72

## Verklarende woordenlijst

AA	Ascorbinezuur, vitamine C
AAM N2	Afkorting voor procesconditie waarbij AA gedoseerd wordt op de maalmolen
AABP N2	Afkorting voor procesconditie waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank
ADP	Adenosine Difosfaat
ATP	Adenosine Trifosfaat
BIB	Bag-in-box
CA	Controlled Atmosphere
CO <sub>2</sub>	Koolstofdioxide
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glucose
ClO <sub>2</sub>	Chloordioxide
Cu	Koper
CYA	Czapek Gist Autolysaat Agar
DHA	Dehydroascorbinezuur
DNA	Deoxyribonucleid Acid
EB	Enzymatische Bruinkleuring
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ijzer
GC	Gas Chromatography
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>0</sub> -hypothese	Nulhypothese
H <sub>1</sub> -hypothese	Alternatieve hypothese
HCl	Waterstofchloride
HDPE	Hoge Dichtheid Polyethyleen
H <sub>2</sub> O	Water
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Waterstofperoxide
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Zwavelzuur
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I <sub>2</sub>	Jood
I <sup>-</sup>	Jodide-ion
IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Jodaation
LDPE	Lage Dichtheid Polyethyleen
LED	Licht Emitterende Diode
MEA	Malt Extract Agar
NaClO <sub>2</sub>	Natriumchloriet
NaOH	Natriumhydroxide
n-AFC	Alternatieve Geforceerde Keuze
NEB	Niet-enzymatische Bruinkleuring
O <sub>2</sub>	Dizuurstof
OH <sup>-</sup>	Hydroxide-ion
OH <sup>·</sup>	Hydroxideradicaal
OSA	Orange Serum Agar
PDA	Aardappel Dextrose Agar
PEF	Pulsed Electric Field
PET	Polyethyleen Tereftalaat
PP	Polypropyleen
PPO	Polyfenoloxidase
PT-tank	Pasteurisetank
RI	Referentie-inname

SO <sub>2</sub>	Zwavedioxide
UHPH	Ultra High Pressure Homogenization
UK	United Kingdom
UV	Ultra Violet
5-HMF	5-hydroxymethylfurfural

## Abstract

Konings NV in Zonhoven is, naast een co-packer, actief in de fruitverwerkingssector, met name de productie van sappen, ciders en concentraten. Aangezien referentiesap, geproduceerd volgens het standaardproductieproces, ca. twee weken opgeslagen kan worden bij een temperatuur van 2°C in een niet-aseptische tank alvorens transport, werd onderzoek uitgevoerd naar langdurige, aseptische opslag van sap.

Het productieproces om sap aseptisch op te slaan, werd enerzijds geoptimaliseerd, waarbij nagegaan werd of de toevoeging van vitamine C aan de buffertank, i.p.v. dosering ervan op de maalmolen, aanleiding geeft tot een stabiel sap. Uit de opvolging van beide productieprocessen bleek een kleinere hoeveelheid vitamine C vereist te zijn bij dosering op de buffertank. De impact van versnelde veroudering van sappen die hot-fill afgevuld werden in glazen flessen, werd tevens onderzocht door opslag in een warmtekamer bij 32°C, waarbij wekelijks fysicochemische en sensorische testen werden uitgevoerd. Uit deze resultaten bleek dat de dosering van vitamine C op de buffertank leidt tot een stabiel sap.

Verder werd de maximale opslagperiode bepaald om sap aseptisch op te slaan door op vastgelegde tijdstippen stalen fysicochemisch en sensorisch te analyseren. De fysicochemische eigenschappen van de sappen bleven constant gedurende de opslagperiode van zes maanden in BIB's. Uit de voorkeurstesten bleek dat na nul en na zes maanden opslag de voorkeur uitging naar het sap waarbij vitamine C gedoseerd werd op de buffertank.

Tot slot werden blends ontwikkeld waarbij aseptisch opgeslagen sap, afkomstig van beide procescondities, ingeblend werd met referentiesap. De stabiliteit van de blends en de daarbij horende referentiesappen werd analoog opgevolgd zoals eerder beschreven. Uit deze testen bleek dat het inblenden van aseptisch opgeslagen sap met referentiesap een gunstige impact heeft op de kwaliteit van het sap tijdens veroudering.





## Abstract in English

Konings NV in Zonhoven is, in addition to a co-packer, active in the fruit processing sector, especially the production of juices, concentrates and ciders. Reference juice, which is produced following the standard production process, is stored for about two weeks at a temperature of 2 °C in a non-aseptic tank before transport. This master's thesis researches the long-term aseptic storage of apple juice.

First, the production process of juice stored aseptically was optimized. The optimal place for addition of vitamin C into the process, the hammer mill or the buffer tank, was investigated. The succession of both production processes proved that it requires a smaller amount of vitamin C to be added to the buffer tank. Besides, the stability of the juices was investigated by storage in an aging heat chamber at 32 °C by weekly testing the sensory and physicochemical properties. These tests indicated that the addition of vitamin C to the buffer tank leads to a more stable juice.

Furthermore, the maximum storage period for aseptic juice was investigated by doing physicochemical and sensory tests at pre-set times. The physicochemical properties of the juices remained constant during the storage period of six months in the BIBs. The preference tests proved that after zero months and after six months of storage, the preference went to the juice where the vitamin C was added to the buffer tank.

Finally, blends were developed wherein aseptic stored juice, deriving from both process conditions, was blended with reference juice. The stability of the blends and the corresponding reference juices was investigated analogous to the previously discussed method. These tests indicated that the blending of aseptic juice with reference juice has a positive impact on the quality of the juice.



# 1 Inleiding

Konings NV is een bedrijf actief in de fruitverwerkingssector, met name de productie van sappen, concentraten en ciders, waarbij de focus gelegd wordt op appels en peren. Daarnaast doet het bedrijf dienst als co-packer, waarmee bedoeld wordt dat ze door de klant geleverde dranken verpakken, en als leverancier voor private labels. Het bedrijf omvat naast twee sites in Zonhoven tevens vestigingen in Breda, Borgloon en Boxford (UK).

Fruitbedrijven en veilingen beschikken over koelkamers met speciale atmosfeersamenstellingen die ervoor zorgen dat appels en peren het hele jaar door opgeslagen kunnen worden. Konings NV koopt doorheen het jaar deze opgeslagen appels aan voor de productie van hun dranken. Deze aankoop brengt echter een hoge kostprijs met zich mee. Het zou voor het bedrijf economisch voordeliger zijn om het appel- en perensap te persen tijdens het oogstseizoen, namelijk tijdens de maanden augustus tot en met oktober. In de oogstmaanden hebben de appels de beste kwaliteit en zijn ze goedkoper in vergelijking met opgeslagen fruit. Het appel- en perensap dient na het persen aseptisch opgeslagen te worden zodat de organoleptische eigenschappen ervan zo constant mogelijk blijven tijdens de bewaring.

De literatuurstudie omvat een algemene beschrijving van het productieproces van appelsap en informatie over de smaakcomponenten die aanwezig zijn in het sap. Daarnaast wordt de kwaliteit van het appelsap besproken waarbij het belang van vitamine C en de bruinkleuring aan bod komen. Hierna volgt een deel over microbiologisch bederf van appelsap en tot slot worden diverse sensorische testen toegelicht.

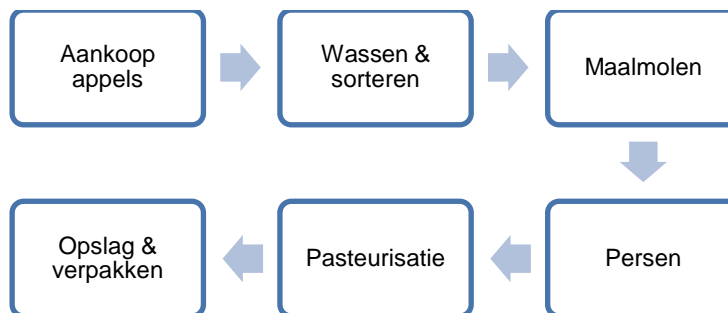
Het eindwerk wordt onderverdeeld in drie projecten. Het eerste project focust zich op de optimalisatie van het productieproces om sap aseptisch op te slaan. Hierbij wordt nagegaan of de toevoeging van vitamine C in een latere fase van het productieproces aanleiding geeft tot een stabiel sap. Vitamine C kan namelijk toegevoegd worden als antioxidant om ongewenste enzymatische bruinkleuringsreacties te voorkomen of te minimaliseren. Er wordt gestart met de opvolging van het productieproces waarbij vitamine C op verschillende plaatsen gedoseerd wordt, namelijk op de maalmolen en op de buffertank. Hierna wordt de stabiliteit van het sap in veroudering nagegaan door de stalen, die hot-fill afgevuld werden in glazen flessen, in een warmtekamer bij een temperatuur van 32°C te plaatsen. De stalen worden wekelijks geanalyseerd a.d.h.v. fysicochemische analyses waarbij het gehalte opgeloste droge stof, de pH, het appelzuurgehalte en het vitamine C-gehalte gemeten worden. Daarnaast worden iedere week sensorische voorkeurstesten uitgevoerd om te bepalen welk sap de voorkeur krijgt na een bepaalde opslagperiode.

Bij het tweede project wordt de maximale opslagperiode bepaald om sap aseptisch op te slaan. Dit gebeurt door het sap, dat afkomstig is van verschillende productieprocessen en dat aseptisch opgeslagen wordt in bag-in-boxen (BIB), op te volgen. Op vooraf vastgelegde tijdstippen wordt staal genomen waarop dan fysicochemische analyses uitgevoerd worden. Daarnaast wordt a.d.h.v. sensorische voorkeurstesten vastgesteld welk sap verkozen wordt na een bepaalde opslagperiode.

Tot slot wordt onderzocht of het inblenden van aseptisch opgeslagen sap met referentiesap een impact heeft op de kwaliteit van het sap tijdens veroudering. Referentiesap wordt omschreven als sap afkomstig van het standaardproductieproces dat ca. twee weken bij een temperatuur van 2°C bewaard kan worden in een niet-aseptische tank alvorens transport. Het is de bedoeling dat de blend de sensorische eigenschappen van het referentiesap benadert. De ideale blendsamenstelling wordt bepaald a.d.h.v. sensorische driehoekstesten en fysicochemische analyses. Verder wordt veroudering van deze blends versneld door opslag in de eerder vermelde warmtekamer bij 32°C om de impact op de fysicochemische parameters en de sensorische stabiliteit van de sappen na te gaan.

## 2 Literatuurstudie

### 2.1 Productieproces van appelsap



Figuur 1: Schematische voorstelling van het algemeen productieproces van troebel appelsap

#### 2.1.1 Aankoop van appels

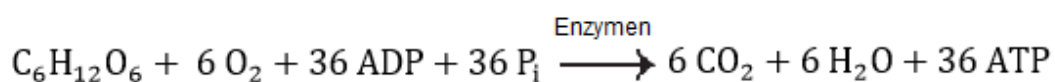
Appels die opgeslagen worden in koelkamers dienen aangekocht te worden voor de vervaardiging van appelsap. Deze koelkamers zijn voorzien van een gecontroleerde atmosfeer (CA) om de houdbaarheid van de appels te verlengen door de zuurstofconcentratie ( $O_2$ ) te verlagen en de concentratie aan koolstofdioxide ( $CO_2$ ) te verhogen. In de omgevingslucht bevindt zich 21%  $O_2$  en 0,03%  $CO_2$ . Wanneer de concentratie van  $O_2$  gereduceerd wordt tot een percentage lager dan 10% en deze van  $CO_2$  verhoogd wordt tot 1%, zal de ademhaling van appels vertragen [1], [2], [3]. De optimale bewaarcondities zijn echter afhankelijk van de variëteit van de appel. Enkele voorbeelden worden weergegeven in Tabel 1 [2].

Tabel 1: Optimale niveaus voor CA-opslag van appels [2, p. 6]

Appelsoort	Optimum $O_2$ (%)	Optimum $CO_2$ (%)	Optimum temperatuur ( $^{\circ}C$ )	Houdbaarheidsduur (maanden)
Belle de Boskoop	1,3	0,7	4,5 tot 5	5,5
Elstar	1 tot 1,2	2,5	1,8	7
Golden Delicious	1 tot 1,2	2,5	-0,5	9
Jonagold	1 tot 1,2	4,5	1	9

Appels zijn climacterische fruitsoorten die na de oogst verder ademen waarbij complexe substraatmoleculen, die aanwezig zijn in plantencellen zoals zetmeel, eenvoudige suikers en organische zuren oxidatief afgebroken worden tot eenvoudige moleculen zoals  $CO_2$  en  $H_2O$  [4]. Hoe hoger deze ademhalingsnelheid, hoe sneller de appels microbiologisch bederven [1], [2], [3].

De reactievergelijking waarbij een hexose (vb. glucose) gebruikt wordt als substraat wordt weergegeven in Figuur 2. Bij deze reactie komt 686 kcal energie vrij per mol glucose onder standaardomstandigheden ( $\Delta G^{0'}$ ). Hiervan worden 266,4 kcal gebruikt om 36 moleculen ATP te vormen ( $36 \times 7,4$  kcal/ATP). De resterende 419,6 kcal en dus het grootste gedeelte van de vrijgekomen energie gaat verloren onder de vorm van warmte [5].



Figuur 2: Ademhalingsreactie van appels met glucose als substraat [5]

Het rijpingshormoon van appels, namelijk ethyleen, versnelt de rijping van het fruit. Deze ethyleenproductie wordt tevens gereduceerd door de concentratie aan O<sub>2</sub> te verlagen en deze van CO<sub>2</sub> te verhogen, zoals eerder vermeld [1].

### 2.1.2 Wassen en sorteren

De appels worden via een mechanisch lopende band getransporteerd naar een met water gevulde opvangtank. In deze tank worden de appels geweekt om grond en ander vreemd materiaal te verwijderen. Hiervoor kunnen sproeitoepassingen en roterende borstels gebruikt worden. Aan het waswater kunnen detergenten of een 1,5% HCl-oplossing toegevoegd worden om sporen van insecticiden en fungiciden te verwijderen. Het wassen moet uitgevoerd worden voordat het fruit gesneden wordt om nutritioneel verlies van vitaminen, mineralen, suikers, enz. te voorkomen [1].

De appels worden hierna getransporteerd naar een inspectiehal waar beschadigde exemplaren verwijderd worden. Het (manueel) sorteren van het fruit om aangetaste en rotte appels te verwijderen is verplicht. Indien ze niet verwijderd worden, kunnen ze leiden tot off-flavours in het eindproduct en verhogen ze het risico op microbiologische verontreiniging [1], [6].

### 2.1.3 Extractie

#### 2.1.3.1 Maalmolen

Na het was- en sorteerproces worden de appels getransporteerd naar een maalmolen, waar ze versneden worden in kleinere stukken om het persen te vergemakkelijken. Voor deze desintegratie kunnen vaste, gepositioneerde of roterende maalmessen worden gebruikt. De maalmolens die in het algemeen gebruikt worden, zijn de hamermolen, de fruitmolen en de rasp molen. Rasp molens blijken het meest efficiënt te werken voor harde vruchten zoals appels. Zo'n rasp molen bestaat uit een draaiende metalen cilinder met instelbare getande bladen, die roteren richting een stel evenwijdige metalen messen en platen [1], [6].

#### 2.1.3.2 Persen

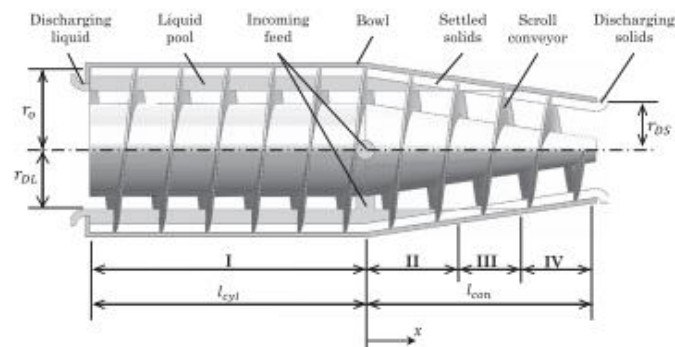
Voor de extractie van het sap uit de appels bestaan verschillende soorten persen. Het persen kan ladingsgewijs of continu uitgevoerd worden. De hydraulische pers is één van de oudste types voor sapextractie, maar wordt nog steeds wereldwijd op grote schaal commercieel gebruikt. Ze werkt ladingsgewijs en is arbeidsintensief [1], [6]. De "horizontal pack press" is er een voorbeeld van. Deze pers is opgebouwd uit een trommel waarin de maische<sup>1</sup> gebracht wordt. De trommel bevat persdoeken waarin de pulp achterblijft, terwijl het sap de pers kan verlaten. De trommel kan roteren waardoor de pulp gebroken wordt zodat een tweede extractie volgt [1].

Een voorbeeld van een continu proces is de continue bandpers. De maische wordt hierbij gelijkmatig verspreid over de band en samengeperst tussen de persband en de hoofdtrommel. Op het einde van het proces wordt de pulp van de band en de trommel geschraapt en in een afvalcontainer gedumpt. Vaak wordt de pulp nog gevaloriseerd in de veevoederindustrie [1]. Een ander voorbeeld van een continu proces is de decanteercentrifuge, die de maische scheidt in enerzijds pulp (gesuspendeerde vaste stoffen) en anderzijds troebel sap. Figuur 3 toont een horizontale decanteercentrifuge die opgebouwd is uit een cilindrische behuizing die ronddraait met een hoge snelheid. In de behuizing bevindt zich een schroef die draait met een iets lagere snelheid. Het snelheidsverschil tussen de behuizing en de schroef levert de energie die het transportsysteem nodig heeft om de vaste stoffen te verzamelen en te verwijderen. De

---

<sup>1</sup> Een maische is een puree van sap en pulp.

suspensie van vloeistof en vaste stoffen wordt toegevoerd langs de hartlijn van de schroef en de gescheiden stoffen worden hierna naar buiten versneld onder invloed van een centrifugaalkracht. Door het versnellen worden de vaste deeltjes gedwongen om naar één kant te bewegen waar ze ophopen en uiteindelijk verwijderd kunnen worden [7], [8].



Figuur 3: Horizontale decanteercentrifuge [8, p. 115]

#### 2.1.4 Conserveren

De meest voorkomende methode om de houdbaarheid van vruchtensap te verlengen, is warmtepasteurisatie [6]. Dit is een proces waarbij bacteriën vernietigd worden door het voedingsmiddel kort ( $\pm 3$  minuten) te verhitten tot een temperatuur van  $84^{\circ}\text{C}$ , heet te vullen in flessen of blikken en dan af te koelen tot een temperatuur lager dan  $37^{\circ}\text{C}$ . Door de flessen of blikken te sluiten wanneer ze heet zijn en daarna af te koelen, ontstaat een vacuüm omdat de beschikbare hoeveelheid zuurstof verminderd is. Dit speelt een belangrijke rol bij het voorkomen van microbiële groei [6].

In tegenstelling tot sterilisatie is het bij een pasteurisatiebehandeling niet de bedoeling om alle aanwezige micro-organismen te doden. Het aantal micro-organismen wordt echter gereduceerd tot een bepaald niveau waarbij ze geen ziekte meer kunnen veroorzaken. De sporen van schimmels en bacteriën (zie 2.4.1) worden bij een pasteurisatiebehandeling dan ook niet gedood. Dat betekent dat het gepasteuriseerd product gekoeld bewaard dient te worden [1], [9].

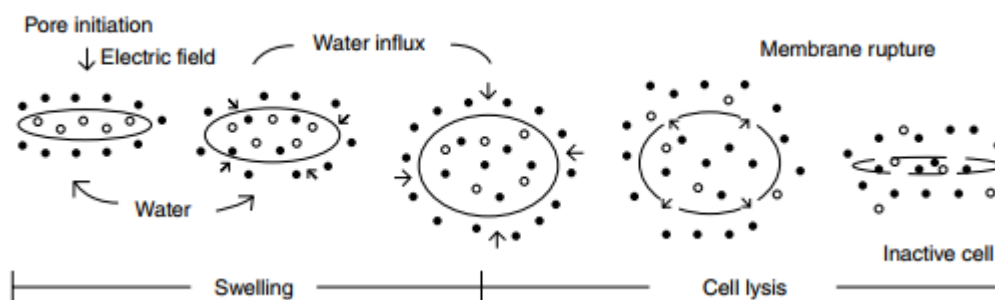
Pasteurisatie bij hoge temperaturen is een conventionele methode om de houdbaarheid van vruchtensappen te verhogen. Nochtans is bekend dat vruchtensap hittegevoelig is [10]. Pasteurisatie leidt onder andere tot ongewenste kleur- en smaakveranderingen en vernieling van hittegevoelige voedingstoffen wat resulteert in een vermindering van de sensorische en nutritionele kwaliteit van het vruchtensap [9]. Om deze reden wordt continu gezocht naar alternatieve conserveringstechnieken die geen directe hitte toepassen, maar toch een product afleveren dat veilig is voor consumptie en waarvan de zintuiglijke kenmerken vergelijkbaar zijn met deze van het onbehandelde sap [11]. Pulsed Electric Field (PEF) en Ultra High Pressure Homogenization (UHPH) zijn hier voorbeelden van [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17].

##### 2.1.4.1 PEF

PEF is een niet-thermische, milde conserveringstechniek waarbij het product tussen twee elektroden geplaatst wordt en blootgesteld wordt aan hoogspanningspulsen. Het levensmiddel ondervindt hierbij kortstondige, maar intense pulsen waardoor het product slechts in beperkte mate opwarmt. Dit zorgt ervoor dat de voedingswaarde en de sensorische eigenschappen van het sap beter behouden blijven in vergelijking met de conventionele thermische pasteurisatie [10], [11], [16].

De PEF-weerstand van micro-organismen wordt bepaald door de celmembranen. Membranepermeabiliteit wordt veroorzaakt door een geïnduceerd transmembraanpotentiaal dat slechts één volt hoger is dan de natuurlijke potentiaal van het celmembranen (varieert van -50 tot -100 mV). Deze permeabiliteit kan reversibel of irreversibel zijn afhankelijk van de intensiteit van de elektrische veldsterkte, de duur van de puls en het aantal pulsen [9], [10], [18]. De inactivatie van micro-organismen vergroot met toenemend aantal pulsen en naarmate de intensiteit van het elektrisch veld hoger is. De veldsterkte kan verhoogd worden door de afstand tussen de elektroden te verkleinen en/of de inputspanning te verhogen.

Na blootstelling aan een elektrisch veld wordt het celmembranen dus doorlaatbaar voor kleine moleculen zoals watermoleculen. Doordringing veroorzaakt dan zwelling en eventuele breuk van het celmembranen waardoor deze lek raakt en de celinhoud door het celmembranen kan ontsnappen. Dit leidt dan tot inactivatie van de cel (zie Figuur 4) [10], [16], [17], [18].



Figuur 4: Mechanisme van celinactivatie via PEF [18, p. 785]

#### 2.1.4.2 Hoge druk behandelingen

Drukken hoger dan 200 MPa gaan voedselbederf tegen omdat pathogene micro-organismen en enzymen in vruchtensappen worden geïnactiveerd met slechts een minimale invloed op de sensorische, fysische en nutritionele eigenschappen van het sap [15]. Sporen van hitteresistente schimmels zijn echter wel bestand tegen een hoge druk behandeling [19].

Hoge druk behandelingen worden steeds aantrekkelijker als alternatief voor de conventionele warmtebehandelingen. Het zijn niet-thermische processen die potentiële toepassingen hebben bij een groot aantal vloeibare levensmiddelen waaronder vruchtensappen [14], [15].

UHPH is een voorbeeld van zo'n hoge druk behandeling. De behandeling wordt uitgevoerd m.b.v. een hoge druk homogenisator. Het toestel beschikt over een hoge druk keramische klep die 400 MPa kan ondersteunen, gevolgd door een tweede pneumatische klep, die een druk tot 50 MPa aankan. Deze hoge druk kleppen werken in op allerlei colloïdale deeltjes, waaronder de cellen van micro-organismen. De inlaat- en uitlaatemperatuur van de te behandelen vloeistof wordt gecontroleerd door twee warmtewisselaars, die respectievelijk geplaatst worden voor de ingang van het toestel en na de tweede homogenisatieklep [20].

#### 2.1.5 Opslag

Na de warmtebehandeling kan het sap opgeslagen worden in bulkcontainers. Om de opslagtermijn te verlengen, moeten aseptische omstandigheden gehandhaafd worden zodat microbiel bederf voorkomen wordt [3]. Aseptische opslag elimineert namelijk microbiële



activiteit en creëert op die manier een stabiele omgeving zodat de houdbaarheid van het product verlengd wordt [21].

Aseptische opslag omvat het vullen en afdichten van een microbiologisch stabiel product in een gesteriliseerde opslagtank onder omstandigheden die microbiële herbesmetting van het product, de tank en zijn sluiting beletten [6], [22]. Uit onderzoek naar aseptische opslag van vruchtensappen blijkt dat het sap stabiel blijft gedurende drie maanden bij een opslagtemperatuur van 4 tot 10°C [23].

Deze vorm van opslag en verpakking is voordelig voor zowel de consument als de distributiekanaal door de lagere distributie- en opslagkosten, langere houdbaarheid, geen toevoeging van additieven, enz. [22].

### 2.1.6 Verpakking

De verpakking van appelsap kan een significant effect uitoefenen op de stabiliteit van het sap tijdens de opslagperiode. Om een voldoende houdbaarheid te garanderen moet de verpakking voldoen aan een aantal vereisten [21]:

- De verpakking moet een barrière vormen voor het zonlicht;
- De verpakking moet ondoorlaatbaar zijn voor gassen en dampen;
- De verpakking moet resistent zijn tegen vochtname;
- De samenstelling van het materiaal mag niet toxisch of schadelijk zijn voor de gezondheid;
- De verpakking moet stabiel zijn tijdens de opgegeven opslagtermijn.

Er bestaan meerdere soorten verpakkingstypes voor sappen. Zo worden glazen flessen, metalen blikjes, kartonnen verpakkingen (Tetra Brik) en plasticen flessen gemaakt van polypropyleen (PP), hoge dichtheid polyethyleen (HDPE) en polyethyleen tereftalaat (PET), gebruikt [24], [25], [26].

De bag-in-box (BIB) is een soort verpakking om het sap hygiënisch op te slaan. Het is een luchtdichte container die vloeistoffen opslaat zonder dat de inhoud besmet raakt door de omgevingslucht. De container bestaat uit een plasticen zak in een kartonnen doos. De zak is vervaardigd uit lage dichtheid polyethyleen (LDPE) dat waterafstotend werkt en bestand is tegen basen en zuren [24]. De kartonnen doos is gemaakt van golfkarton of massief karton en dient ter bescherming tijdens het transport. Om de vloeistof eruit te halen, moet de gebruiker het karton op de voorziene plaats openen en een tapkraan uit de plasticen zak halen. Deze kraan is zodanig ontworpen dat tijdens het schenken en het bewaren geen lucht bij de vloeistof komt. De combinatie van de plasticen zak en de tapkraan zorgen ervoor dat de houdbaarheid van vloeistoffen verlengd wordt, zowel voor als na het openen van de BIB. Er zijn BIB's verkrijgbaar gaande van 2 tot 1000 liter [27].

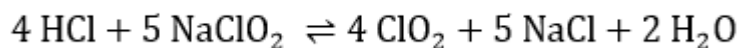


Figuur 5: BIB [28]

### 2.1.7 Desinfectiemethoden

Verscheidende desinfectiemethoden voor het steriliseren van opslagtanks en verpakkingsmaterialen worden momenteel gebruikt in aseptische verpakkingssystemen [22]. De inactivatie van micro-organismen gebeurt traditioneel via een hittebehandeling, waarbij het te steriliseren oppervlak blootgesteld wordt aan heet water of aan stoom om een temperatuur van 135°C te bereiken [22]. Omdat een thermische behandeling niet altijd mogelijk is omdat het materiaal permanent vervormd kan geraken, kunnen desinfectiemiddelen gebruikt worden om oppervlakken te ontdoen van ziekmakende of hinderlijke micro-organismen. Deze desinfectiemiddelen omvatten een grote verscheidenheid aan chemische stoffen in de vorm van vloeistoffen en gassen [22]. Deze producten worden verondersteld werkzaam te zijn tegen alle micro-organismen, inclusief de hitteresistente sporenvormers. Maar ze mogen niet schadelijk zijn voor de gezondheid.

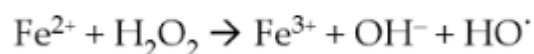
Studies hebben aangetoond dat chloordioxidegas (ClO<sub>2</sub>-gas) in hoge mate geselecteerde bederfororganismen, waaronder *Penicillium*, inactieveert op epoxy (thermohardende kunststof) gecoate oppervlakken. Bovendien werkt ClO<sub>2</sub> over een groot pH-bereik gaande van 3 tot 9 en reageert het niet met organische stoffen en met water, in tegenstelling tot chloor. Hierdoor is ClO<sub>2</sub> een geschikt ontsmettingsmiddel voor tanks die appelsap aseptisch opslaan. ClO<sub>2</sub> ontstaat uit de reactie van zoutzuur (HCl) met natriumchloriet (NaClO<sub>2</sub>) [29].



Figuur 6: Reactievergelijking van HCl en NaClO<sub>2</sub> tot ClO<sub>2</sub>, NaCl en H<sub>2</sub>O [29]

Er blijkt een tankbehandeling van 8 tot 10 mg/l ClO<sub>2</sub>-gas gedurende 10 tot 30 minuten in een relatieve vochtigheid van 85 à 90 % en een temperatuur gaande van 9 tot 28°C vereist te zijn om de groei van bederfororganismen tegen te gaan [29].

Om verpakkingsmateriaal te steriliseren, is waterstofperoxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geschikt, maar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan leiden tot schadelijke radicaalreacties. Cellen bevatten namelijk ijzerionen (Fe<sup>2+</sup>) die opgenomen worden door ijzerhoudende enzymen [30]. Deze enzymen functioneren als elektronencarriers in de ademhalingsketen waar ATP gevormd wordt uit ADP en fosfaat [31]. In aanwezigheid van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wordt Fe<sup>2+</sup> echter geoxideerd via de Fenton-reactie waarbij zeer reactieve hydroxideradicalen gevormd worden (Figuur 7). Radicalen zijn niet enkel voor micro-organismen agressieve moleculen, maar ook voor de consument. De gevormde hydroxideradicalen oxideren biomoleculen die zich in de buurt van het Fe<sup>2+</sup>-ion bevinden, zoals nucleïnezuren. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestreste cellen accumuleren bijgevolg DNA-letsels die mutageen en dodelijk zijn [30].



Figuur 7: Fenton-reactie [30, p. 7]

Het te steriliseren oppervlak wordt behandeld met een H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oplossing in de vorm van een spray of een dompelbad, gevolgd door een hete lucht behandeling (60-125°C) om het sterilisatie-effect te verhogen en de resten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te verwijderen. De concentratie aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in het appelsap mag niet hoger zijn dan 0,5 ppm. Daarom wordt een maximumconcentratie van 30 tot 35 m/V% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opgelegd. In hoge concentraties heeft H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> namelijk een prikkelende, zure geur [22].

Wanneer zowel hitte als chemicaliën niet toepasbaar zijn om een gegeven materiaal te steriliseren, is elektromagnetische straling een optie. De dosering en het type straling is afhankelijk van de soort en de hoeveelheid micro-organismen die verwijderd moet worden [22].

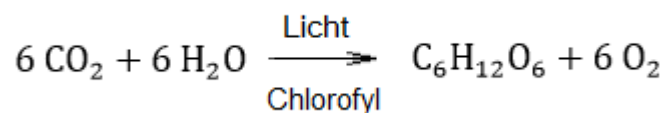
## 2.2 Smaakcomponenten in appelsap

In dit onderdeel worden suikers, organische zuren en polyfenolen besproken omdat zij de smaak bepalen van appelsap. Daarnaast bevat een appel ook mineralen, pigmenten, enzymen, vitaminen, water, enz. [1].

### 2.2.1 Suikers en organische zuren

Appels bevatten organische zuren waarvan appelzuur en citroenzuur de voornaamste zijn. Deze zuren zijn mede verantwoordelijk voor de verlaging van de snelheid van microbiële bederf en vormen, samen met de suikers, de belangrijkste elementen die de smaak van het fruit bepalen [1]. De suiker/zuurverhouding wordt dan ook gebruikt om de smaak en het aroma van appelsap te beschrijven [32]. De voornaamste monosachariden aanwezig in appels zijn glucose en fructose, waarvan fructose het zoetst is. Appels bevatten doorgaans twee tot drie keer meer fructose dan glucose [33].

Het gehalte aan zuren en suikers in appels is afhankelijk van verschillende condities. Zo zullen appels die in het zonlicht groeien een grotere hoeveelheid aan totale suikers en verhoudingsgewijs een kleiner zuurgehalte bevatten dan appels die groeien in schaduwrijke delen van de boom [33]. Fotosynthese is een proces waarbij planten  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , onder invloed van lichtenergie, omzetten in suiker (glucose) en  $\text{O}_2$  (zie Figuur 8) [34]. De oogstperiode en de rijpheid van de appel oefenen tevens een significante invloed op het suikergehalte van appels [33].



Figuur 8: Fotosynthesereactie [32]

### 2.2.2 Polyfenolen

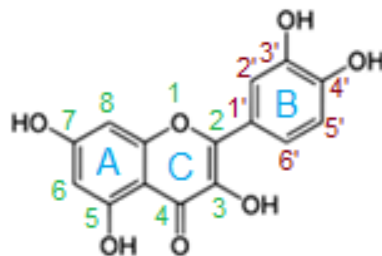
Polyfenolen, ook wel polyfenolische componenten genoemd, behoren tot een groep complexe organische componenten met één of meerdere fenolgroepen [9]. Ze zijn aanwezig in plantaardig materiaal als secundair metaboliet [35] en zijn mede verantwoordelijk voor de kleur, de smaak en de troebelheid van sappen [9], [36]. De concentratie aan fenolen moet 300 à 800 mg/l bedragen om voldoende smaak te behouden [37]. Daarnaast zijn polyfenolen werkzaam als antioxidant [9], [36] en betrokken bij de enzymatische bruinkleuring en bij de preventie van bepaalde ziektes zoals kanker, hartziekten en cataract (grijze staar) omwille van hun antioxidantkarakter [37].

De polyfenolen zitten voornamelijk in de schil, maar komen ook in de vrucht zelf voor. Het gehalte aan polyfenolen in appels hangt sterk af van de variëteit, het klimaat en de rijpheid van de vrucht [9], [36], [37]. Verse sappen bevatten mogelijk dezelfde reeks aan fenolische verbindingen als de appels waaruit ze zijn vervaardigd. Sommige van deze polyfenolen gaan verloren tijdens de sapproductie t.g.v. de activiteit van het enzym polyfenoloxidase (zie 2.3.2.1) en tijdens de opslag van het sap [38].

Fenolverbindingen hebben een groot arsenaal van structuren en functies. Ze worden onderverdeeld in wateroplosbare verbindingen (fenolzuren, flavonoïden en chinonen) en niet-wateroplosbare verbindingen (tannines, stilbenen en ligninen). Fenolverbindingen in fruit worden meestal vertegenwoordigd door de flavonoïden en de fenolzuren [35]. Uit studies blijkt dat de opslag van sappen resulteert in een afname van de flavonoïden van 19% naar 8% en van de fenolzuren van 21% naar 5% [38].

### 2.2.2.1 Flavonoïden

De flavonoïden zijn de belangrijkste bioactieve stoffen in fruit. Ze dragen bij tot de weerstand van de planten tegen stressaanvallen. Deze stoffen beschermen de plant tegen schade die veroorzaakt wordt door pathogenen, verwonding of overmatige blootstelling aan UV-licht [35]. De term flavonoïde wordt gebruikt om een grote verscheidenheid aan natuurlijke producten te beschrijven die een C6-C3-C6-koolstofstructuur bevatten. Quercetine, zie Figuur 9, is een voorbeeld van een flavonoïde [35].



Figuur 9: Structuurformule van quercetine [35, p. 4]

Wanneer de flavonoïden gekoppeld zijn aan één of meerdere suikermoleculen (via een glycosidische binding tussen het C3-koolstofatoom en het suikermolecuul) worden ze glycosiden genoemd. Flavonoïden die niet gebonden zijn aan een suikermolecule worden aglyconen genoemd. De mate van glycosylering en het chemische karakter van het suikermolecule oefenen een directe invloed uit op de antioxidantcapaciteit van de flavonoïden [35]. Zo zijn aglyconen actiever dan glycosiden. De hogere antioxidantcapaciteit van de aglyconen kan verklaard worden door de aanwezigheid van de vrije hydroxylgroep op het C3-koolstofatoom. Wanneer deze hydroxylgroep gebonden is op een suikermolecule, zal deze minder oxidatief zijn vanwege deze binding. Daarnaast zijn glycosiden gebonden met een disaccharide minder oxidatief dan glycosiden met een monosaccharide omdat een disaccharide een minder goede uittredende groep is dan een monosaccharide [39].

### 2.2.2.2 Fenolzuren

De fenolzuren worden onderverdeeld in twee subgroepen, namelijk de hydroxybenzoëzuren en de hydroxykaneelzuren, en hebben een zuur karakter door de aanwezigheid van een carboxylgroep [35].

Hydroxykaneelzuurverbindingen zitten meestal in een C6-C3-koolstofstructuur. Ferulinezuur, p-coumarinezuur en cafeïnezuur zijn enkele voorbeelden van deze klasse. Hydroxybenzoëzuurverbindingen bevatten een C6-C1-koolstofsstructuur en komen meestal voor als esters. Fenolzuren uit deze categorie die het meest voorkomen in fruit zijn gallisch zuur, vanillinezuur, ellaginezuur en syringinezuur [35].



Figuur 10: Structuurformules van ferulinezuur (links) en gallisch zuur (rechts) [35, p. 4]

## 2.3 Kwaliteit van appelsap

De kwaliteit van een levensmiddel wordt gedefinieerd als het vermogen van een product om aan de noden van de gebruikers te voldoen. De kwaliteit wordt onderverdeeld in drie soorten, namelijk hygiënische, nutritionele en organoleptische kwaliteit. Hygiënische kwaliteit is gelinkt aan de microbiële veiligheid. Nutritionele kwaliteit beschrijft dan weer de capaciteit van het product om voldoende voedingskwaliteit te leveren. De organoleptische kwaliteit omvat daarentegen smaak, kleur en geur en is zeer gevoelig aan verpakkingsvoorwaarden en bewaarprocessen [9].

### 2.3.1 Ascorbinezuur

Ascorbinezuur (AA) of vitamine C is een organische, wateroplosbare verbinding [40]. AA wordt voornamelijk toegevoegd als antioxidant aan levensmiddelen. Het zorgt ervoor dat oxidatiereacties vertragen, zodat de kleur (zie 2.3.2.1.1) en de versheid van het levensmiddel behouden blijven. Bovendien belet de lage pH van AA (2,1 à 2,6) [41] microbiële groei. Wanneer AA toegevoegd wordt aan levensmiddelen dient rekening gehouden te worden met de (zure) smaak. Nochtans zijn geen negatieve bijwerkingen bekend na toevoeging van AA aan een levensmiddel, behalve bij uitzonderlijk hoge doseringen die echter niet gebruikt worden in de voedingsindustrie [42], [43], [44].

AA is een onstabiel molecuul onder invloed van zuurstof, warmte, licht, pH en metaalionen [9], [42], [45]. Het verlies aan AA is hierdoor één van de kritische factoren die de houdbaarheid van vruchtensappen bepalen [42].

#### 2.3.1.1 Detectie en kwantificatie

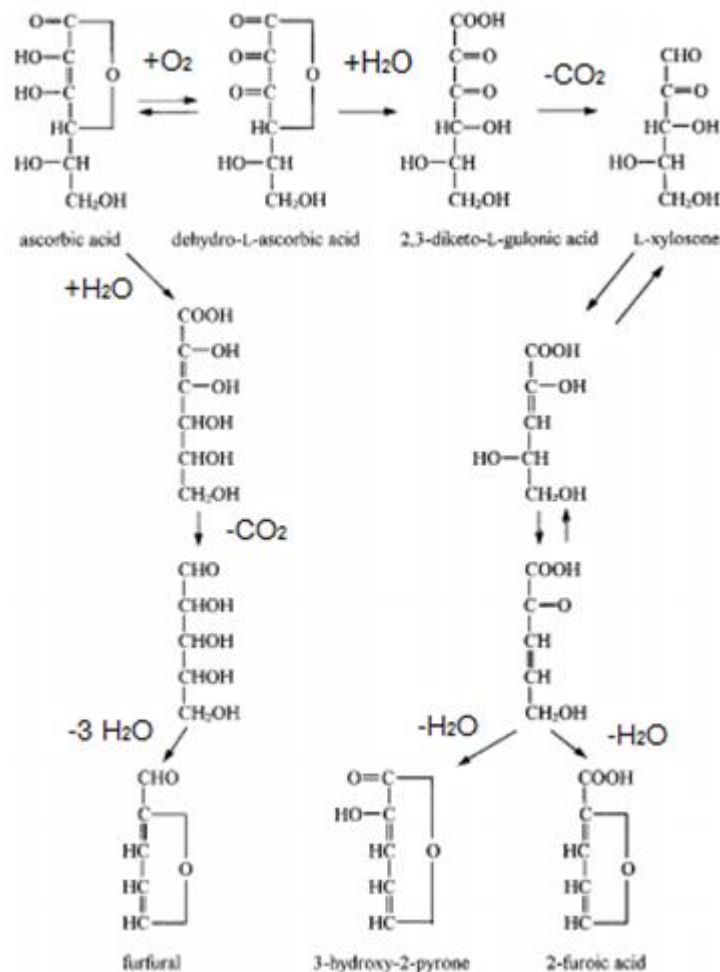
Aangezien AA een goede antioxidant is, kan AA gemakkelijk bepaald worden d.m.v. een jodometrische titratie [46]. Het gebruik van jood als een titrant is goedkoop, simpel en betrouwbaar. Er is ook geen extractie en voorbehandeling van het staal vereist waardoor de uitvoering van deze titratie zeer kort is [40]. De bijhorende reacties zijn terug te vinden in 4.2.3.

High-performance liquid chromatography (HPLC) is een scheidingstechniek waarbij het AA-gehalte in het sap exact bepaald kan worden met een detectielimiet van 0,0097 mg/100ml sap [43], [47], [48], [49]. AA wordt geïdentificeerd door zijn UV-spectrum en retentietijd te vergelijken met die van een gekende AA-standaard [43], [48].

Een gas-chromatografische (GC) analyse kan ook toegepast worden om zeer nauwkeurig het AA-gehalte in het sap te bepalen. Hierbij is het wel nodig dat oxidatie van AA door zuurstof wordt vermeden. Daarom wordt het sap voorbehandeld door het te vriesdrogen [45]. Dit is tevens een techniek die gebruikt wordt om de houdbaarheid van levensmiddelen te verlengen en is gebaseerd op de uitdroging van een bevroren product via sublimatie [50].

### 2.3.1.2 Invloed van zuurstof

De afbraak van AA kan zowel onder aerobe als anaerobe omstandigheden plaatsvinden. Zowel de aerobe als de anaerobe afbraak van AA treedt op bij lage pH (3 à 4), zoals in appelsap [48], [51].



Figuur 11: Afbraakreacties van AA onder anaerobe (links) en aerobe (rechts) omstandigheden [53, p. 5081]

Onder aerobe en zure omstandigheden (zie Figuur 11) wordt AA geoxideerd tot dehydroascorbinezuur (DHA), gevolgd door de vorming van 2,3-diketogulonzuur door het irreversibel openen van de lactonring via een hydrolysereactie. De antioxidantactiviteit van DHA gaat hierdoor volledig verloren [36], [52]. De decarboxylatie van 2,3-diketogulonzuur leidt tot xyloson. Xyloson ondergaat vervolgens een intermoleculaire redoxreactie en dehydraties met vorming van 2-furaanzuur en 3-hydroxy-2-pyron, wat gepaard gaat met smaak- en geurveranderingen [52]. Oxidatie van AA komt meestal voor tijdens de verwerking van sappen [52], [53].

Zuurstof dat opgelost zit in het product, of dat zich in de bovenruimte van de opslagtank bevindt of dat zich een weg zoekt doorheen eventuele openingen van de opslagtank beïnvloedt dus de kwaliteit en de houdbaarheid van het vruchtensap. Wanneer het volume lucht in de bovenruimte van de opslagtank groot is, wordt in de literatuur aangeraden om het sap onder stikstofatmosfeer te houden om zo het verlies aan AA te beperken [9], [21].



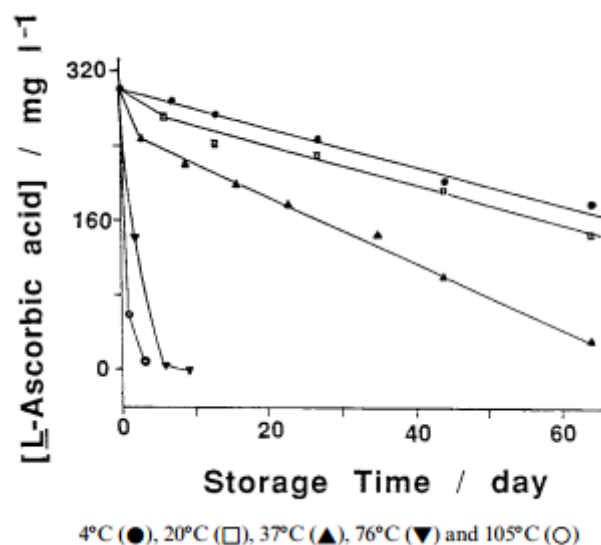
De verpakking van levensmiddelen vormt tevens een belangrijke factor die kan inspelen op de aanwezigheid van zuurstof [9]. Verpakkingsmaterialen die ondoordringbaar zijn voor zuurstof worden dan ook aanbevolen voor de opslag van appelsap [1].

Onder anaerobe condities wordt AA omgezet in furfural door splitsing van de ringstructuur via een hydrolyse reactie, gevolgd door decarboxylering en dehydraties [52], [53], [54], [52]. Furfural oefent een negatieve invloed uit op de geur en de smaak van appelsap [55]. Anaerobe afbraak komt voornamelijk voor tijdens de stockage van het sap [42], [48].

### 2.3.1.3 Invloed van bewaartemperatuur en opslagtijd

Aangezien het verlies in AA-gehalte een belangrijke factor vormt bij de bepaling van de houdbaarheid van vruchtensappen, is het vereist dat de afname van AA beschreven wordt en de kinetica van het AA-verlies onderzocht wordt [55].

Uit eerder uitgevoerde studies blijkt dat het verlies van AA onder anaerobe condities in functie van de tijd bij alle temperaturen beschreven wordt volgens een 1<sup>ste</sup> orde reactie (zie Figuur 12) [55]. Het gehalte aan AA in het appelsap daalt naarmate de temperatuur hoger is en de opslagtijd toeneemt. Dat betekent dat de bewaartemperatuur zo laag mogelijk en de opslagtijd zo kort mogelijk ingesteld moeten worden om het verlies aan AA te beperken [42]. Lage temperaturen remmen de afbraak van AA af en limiteren de accumulatie van de verschillende afbraakproducten van AA [52].



Figuur 12: Afbraak van AA i.f.v opslagtijd en bewaartemperatuur [56, p. 614]

Hoewel het invriezen van het sap bij temperaturen tussen -18°C en -28°C resulteert in een bevredigend behoud van AA, zal het molecuul gemakkelijk geoxideerd worden bij een temperatuur hoger dan -10°C [1].

### 2.3.1.4 Invloed van licht

Uit eerdere studies blijkt dat licht slechts een gering effect uitoefent op de afbraak van AA, in vergelijking met zuurstof [24].

### 2.3.1.5 Invloed van pH

De afbraak van AA neemt significant toe wanneer de pH stijgt van 3,3 tot 5,5. Er werd geen verschil in afbraak waargenomen bij een pH-stijging van 2,4 naar 3,3 [57].

De anaerobe afbraak van AA is maximaal bij een pH gelijk aan 4 en minimaal bij een pH gelijk aan 2 [36]. De afbraak van AA tot furfural is vele malen groter bij een pH van 2 dan bij een pH van 7. Studies hebben aangetoond dat een lage pH de vorming naar zowel furfural als naar 2-furaanzuur en 3-hydroxy-2-pyron stimuleert [52].

Een toename van de concentratie aan appelzuur van 0,1 naar 1% leidt tevens tot een verhoging van de AA-afbraak. Er was echter geen verschil waarneembaar tussen 0,5 en 1,0% [57].

### **2.3.1.6 Invloed van metaalionen**

Het menselijk lichaam heeft veel essentiële mineralen nodig. Het belang van mineralen als ingrediënt in voedingsmiddelen hangt niet alleen af van hun voedings- en fysiologische rollen. Ze dragen tevens bij aan de smaak en de textuur van het voedingsproduct en activeren of remmen enzymgekatalyseerde reacties [36].

Mineralen worden onderverdeeld in macromineralen ( $RI^2 > 50$  mg/dag) en micromineralen ( $RI < 50$  mg/dag). Ijzer (Fe) en koper (Cu) behoren tot de micromineralen [36], [58]. In aanwezigheid van sporen van  $Cu^{2+}$ - en  $Fe^{2+}$ -ionen wordt AA versneld oxidatief afgebroken, totdat alle zuurstof verbruikt is. Eerst treedt een redoxreactie op tussen het metaalion en AA, gevolgd door de auto-oxidatiereactie van het metaalion [59]. De gemiddelde hoeveelheid aan metaalionen in appelsap bedraagt 1,878 mg Fe/l en 0,010 mg Cu/l [60], [58], [61]. De katalytische activiteit van het  $Cu^{2+}$ -ion is groter dan deze van het  $Fe^{2+}$ -ion op de oxidatieve afbraak van AA. Een verhoging van de concentratie aan metaalionen versnelt dus de oxidatiereactie van AA tot DHA [36], [62].

### **2.3.2 Bruinkleuring**

Bruinkleuring van appelsap wordt onderverdeeld in enzymatische en niet-enzymatische bruinkleuringsreacties. Het ontstaan van de bruine kleur tijdens de thermische verwerking is vooral te wijten aan enzymatische bruinkleuringsreacties, terwijl de niet-enzymatische bruinkleuring vooral optreedt tijdens de opslag van appelsap [12].

#### **2.3.2.1 Enzymatische bruinkleuringsreactie (EB)**

Polyfenoloxidase (PPO), ook wel fenolase of catecholase [1] genoemd, is een enzym dat van nature voorkomt in appels en peren. Het is actief in de chloroplasten van planten en in het cytosol bij veroudering of rijping van de planten. PPO speelt een belangrijke rol in planten bij resistentie tegen microbiologische en virale infecties en bij aanpassing aan klimatologische condities [9].

PPO veroorzaakt bruinkleuring in aanwezigheid van zuurstof. PPO katalyseert de 1<sup>ste</sup> stap in de biochemische omzetting van polyfenolen (met betrekking tot catechol) tot chinonen (zie Figuur 13). Deze oxidatieproducten polymeriseren en leveren donkere, onoplosbare polymeren, die melaninen genoemd worden [1], [9]. Melaninen vormen barrières en hebben antimicrobiële eigenschappen, waardoor de verspreiding van infecties in plantaardige weefsels voorkomen wordt [1].

Bij beschadiging of bij de verwerking van appels komen PPO, substraten en zuurstof met elkaar in contact waardoor allerlei reacties beginnen op te treden die leiden tot bruinkleuring [1].

---

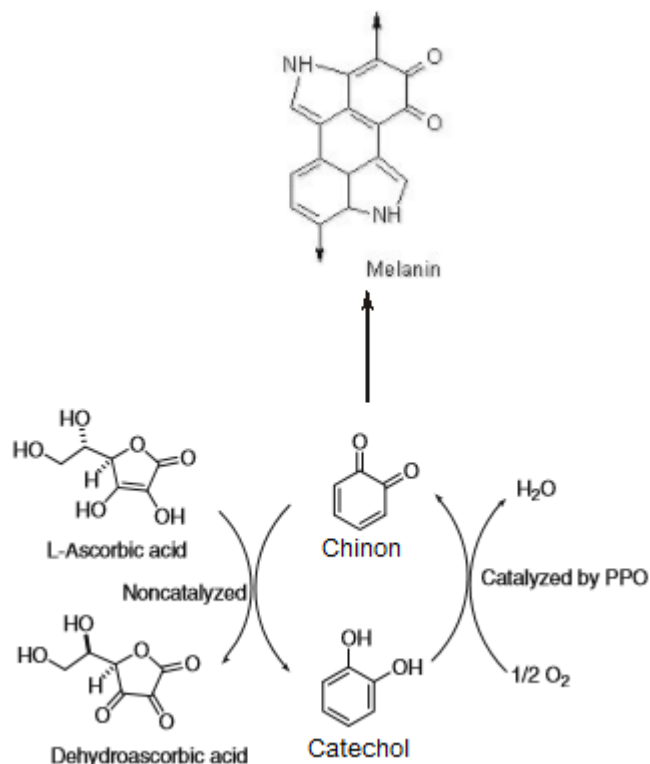
<sup>2</sup> RI = referentie-inname



### 2.3.2.1.1 Inhibitie van PPO

PPO kan op verschillende manieren geïnhibeerd worden. Dit moet bij voorkeur zo vroeg mogelijk in het productieproces van appelsap gebeuren aangezien dit resulteert in een lichter gekleurd sap, zelfs na pasteurisatie [63]. De vorming van bruine pigmenten in fruitproducten tijdens de enzymatische bruinkleuringsreactie wordt geregeld door het gehalte aan fenolen, de hoeveelheid PPO-activiteit en de aanwezigheid van zuurstof [1].

Enzymatische bruinkleuring kan gedurende het productieproces vermeden of geminimaliseerd worden door AA toe te voegen als antioxidant om de oxidatiereacties van polyfenolen, die aanwezig zijn in het vruchtvlees, te vermijden (Figuur 13) [51]. Deze actie gaat door zolang de concentratie van AA voldoende is om een lage concentratie aan chinonen te blijven behouden. Wanneer de concentratie aan AA afneemt, zal de concentratie aan chinonen toenemen en dat leidt op zijn beurt tot de vorming van bruine pigmenten [1].



**Figuur 13: Enzymgekatalyseerde oxidatie van catechol tot een chinon door PPO (rechts) en niet-enzymgekatalyseerde reductie van een chinon tot catechol waarbij AA geoxideerd wordt tot DHA (links) [9], [49]**

De activiteit van het enzym daalt tevens bij temperaturen hoger dan 73°C. Het enzym wordt dus geïnactiveerd tijdens een pasteurisatiebehandeling [64].

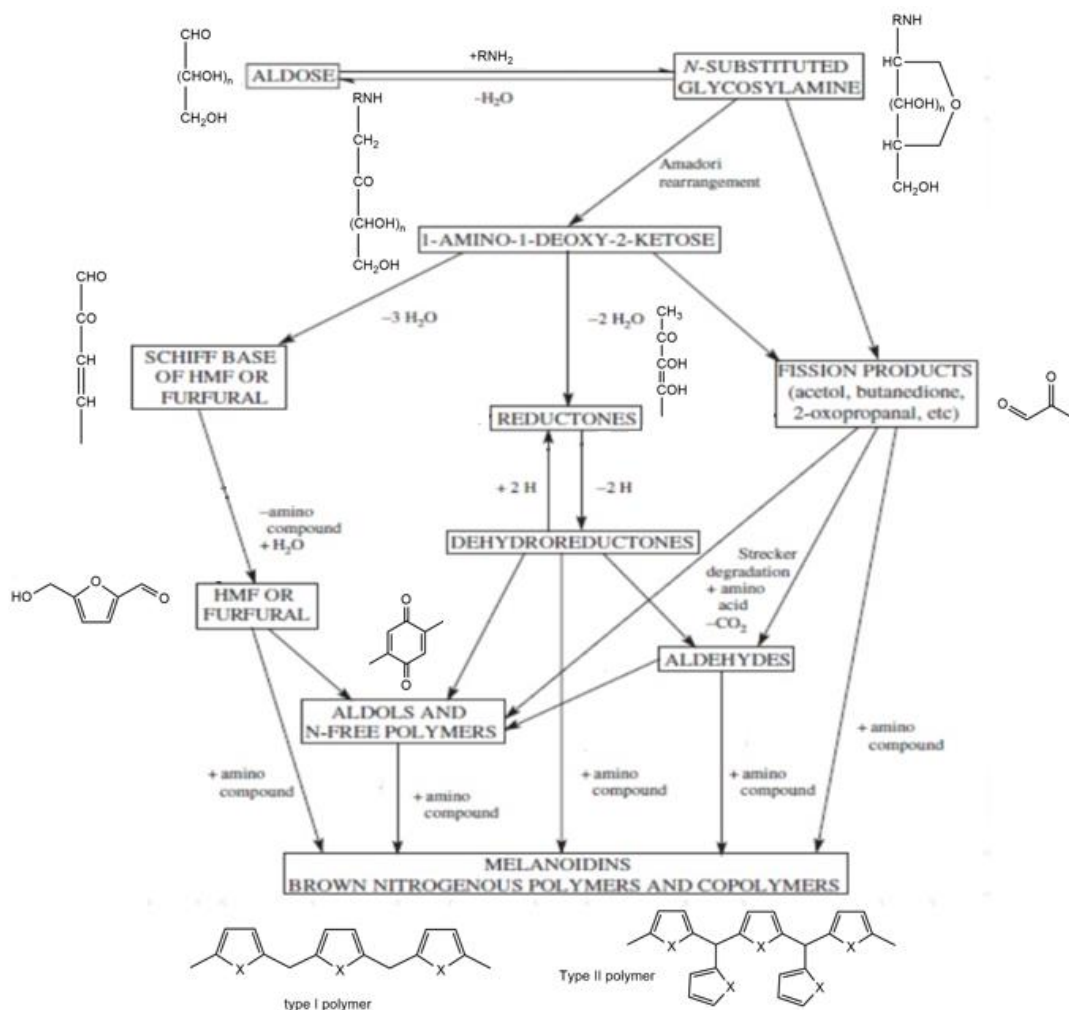
Tot slot kunnen ook chemische inhibitoren toegevoegd worden om de EB te voorkomen. Deze inhibitoren zijn verbindingen die ofwel inwerken op het enzym ofwel reageren met de substraten. De meest voorkomende methode die wordt gebruikt in de fruitindustrie om de EB te controleren, is de toevoeging van zwaveldioxide (SO<sub>2</sub>). SO<sub>2</sub> dient als reductiemiddel. Het vermindert de hoeveelheid chinonen, geproduceerd door de PPO-katalyse en voorkomt op die manier de latere condensatie tot bruine melaninen. Inactivatie van het enzym PPO via SO<sub>2</sub> met een gehalte van 0,005 à 0,2% werkt succesvol bij het voorkomen van EB. Het gebruik ervan is echter beperkt door opgedragen regels aangezien SO<sub>2</sub> gekoppeld is aan allergische

reacties. Er wordt door de "Food and Drug Administration (FDA)" een acceptabele dagelijkse inname opgelegd van 0,7 mg SO<sub>2</sub>/ kg lichaamsgewicht [1].

### 2.3.2.2 Niet-enzymatische bruinkleurig (NEB)

#### 2.3.2.2.1 Maillard-reactie

Het meest bekende type van de niet-enzymatische bruinkleuringsreacties (NEB) is de Maillard-reactie. Deze reactie veroorzaakt ongewenste kleur-, geur- en smaakveranderingen [1]. De Maillard-reactie bestaat uit een reeks van chemische reacties tussen reducerende suikers, zoals glucose, en aminozuren die melanoïdinen opleveren. Melanoïdinen zijn bruine pigmenten met een groot moleculair gewicht. Ze hebben een sterk reducerend karakter dat vergelijkbaar is met dat van AA [9].



Figuur 14: Overzicht Maillard-reactie [62, p. 3]

Het verloop van de Maillard-reactie wordt opgedeeld in drie fases. De initiële reactie is de condensatie van een aminozuur met een eenvoudig suiker, waarbij een watermolecuul afsplitst ter vorming van een N-gesubstitueerd glycosylamine. Dit is een onstabiel molecuul en ondergaat de Amadori-omlegging waarbij een ketosamine (Amadori-component) gevormd wordt [1], [65].

Dit ketosamine kan in de tweede fase op drie verschillende manieren reageren. Één daarvan is de verdere dehydratatie die resulteert in reductonen en dehydroreductonen. Een reducton,

ook eendiol genoemd, is een organisch molecuul waarbij aan een geconjugeerd enon aan beide koolstofatomen van de C=C-binding een hydroxylgroep gebonden is.

Een tweede manier is de productie van korte hydrolytische splitsingsproducten ("Fission products"). Deze ondergaan vervolgens een Streckerdegradatie met aminozuren ter vorming van aldehyden of ze condenseren tot aldolen. Hierbij komen ongewenste aroma's vrij. De laatste manier is de Schiff base- of furfural-weg waarbij de ketosamines drie watermoleculen verliezen. Hierna splitsen ze een aminozuur af en nemen ze een watermolecuul op ter vorming van 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) of furfural. 5-HMF wordt gevormd uitgaande van een reducerend hexose zoals glucose, terwijl furfural resulteert uit een pentose, zoals ribose [51]. Zowel 5-HMF als furfural ondergaan hierna een aldolcondensatie [1], [65], [65]. De vorming van 5-HMF is afhankelijk van de duur en de temperatuur van de verwerking en de opslag van het sap. In verse, onbehandelde sappen is het gehalte aan 5-HMF nagenoeg nul. Het 5-HMF-niveau is belangrijk omdat het de graad van verhitten aangeeft die tijdens de bewerking is toegepast. De aanwezigheid van grote hoeveelheden 5-HMF wordt beschouwd als een teken van oververhitting. 5-HMF is namelijk mede verantwoordelijk voor de gekookte smaak van appelsap [1].

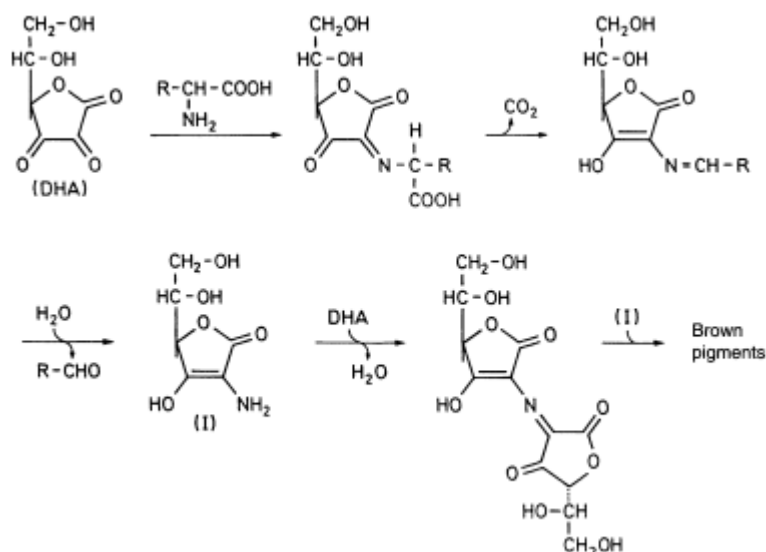
De gevormde producten reageren verder met aminozuren in de derde fase van de Maillard-reactie tot bruine pigmenten en aroma actieve componenten, die samen als melanoïdinen beschreven worden en als off-flavours ervaren kunnen worden door de consument [1], [65].

#### 2.3.2.2.2 Karamellisering

Karamellisering is een tweede type van de niet-enzymatische bruinkleuringsreacties. Deze reactie vindt plaats wanneer suikers in voedsel verhit worden tot een temperatuur hoger dan 120°C. Deze eenvoudige suikers verliezen hierbij watermoleculen [1]. Karamellisering veroorzaakt een lichte tot donkerbruine kleur en een extra smaak in het product [9]. Aangezien het sap gepasteuriseerd wordt tot een temperatuur van slechts 84°C [6], is dit niet relevant voor het eindwerk.

#### 2.3.2.2.3 NEB uit afbraakproducten van AA

In de aanwezigheid van aminozuren kan AA, DHA en hun afbraakproducten verder reageren door deel te nemen aan de Maillard- reactie. De reactie van DHA met aminozuren tot bruine pigmenten wordt weergegeven in Figuur 15 [36].

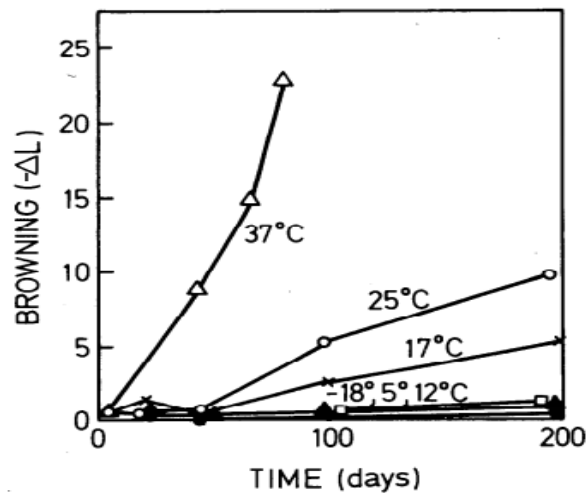


Figuur 15: Reactie van DHA met aminozuren tot bruine pigmenten [36, p. 419]

#### 2.3.2.2.4 Invloed van temperatuur en tijd

De Maillard-reactie treedt al op bij kamertemperatuur [9]. Bij het verhitten van voedsel kunnen Maillard-reacties dus niet, of bijna niet, vermeden worden [51].

In Figuur 16 wordt de niet-enzymatische bruinkleuring van sinaasappelsap weergegeven in functie van de tijd. In deze grafiek is duidelijk zichtbaar dat de bruinkleuring toeneemt naarmate de bewaar temperatuur hoger is en naarmate de opslag tijd vordert [55], [36].



Figuur 16: NEB i.f.v. opslagtijd en bewaar temperatuur [55, p. 2]

De Maillard-reactie kan tot twee à drie keer versneld worden door een temperatuursverhoging van 10°C [1].

#### 2.3.2.2.5 Invloed van concentratie van opgeloste vaste stoffen

In de voedingsindustrie worden refractometers gebruikt om via de meting van de brekingsindex van appelsap de hierin aanwezige concentratie aan suikers snel en nauwkeurig te bepalen [66], [67]. De concentratie wordt uitgedrukt in °Brix en deze wordt berekend volgens internationaal voorgeschreven formules [68]. Één °Brix komt overeen met één gram sucrose opgelost in 100 gram sap. Nochtans bevatten vruchtensappen naast sucrose nog andere suikers en zuren zoals AA en citroenzuur. Aangezien deze zuren een significant lagere brekingsindex hebben dan sucrose, moet de concentratie ervan ook titrimetrisch bepaald worden zodat de °Brix-waarde gecorrigeerd kan worden. Dit gebeurt m.b.v. tabellen (voorbeeld citroenzuur: zie bijlage A) [66].

De meting is gebaseerd op de breking van het licht (refractie) die afhankelijk is van de aard en de concentratie van de opgeloste stof [66]. Een LED-lichtbron zendt licht vanuit verschillende standen op het prisma-oppervlak dat in contact is met het staal. Afhankelijk van het verschil in brekingsindex tussen het staal en het prisma wordt het licht gedeeltelijk gebroken en gereflecteerd of volledig gereflecteerd. De meting van de brekingsindex is dus een reflectiemeting op het grensvlak van het staal en het prisma van de refractometer. De brekingsindex is afhankelijk van de temperatuur en de golflengte van het licht. Moderne refractometers zijn voorzien van een interne, elektronische temperatuurregelingscontrole om een stabiele temperatuur te verzekeren tot +/- 0,03°C, die nodig is voor nauwkeurige metingen [68].

Hoe geconcentreerder het appelsap opgeslagen wordt, hoe meer niet-enzymatische bruinkleuringsreacties optreden. Zo zal een 58°Brix concentratie stabiel zijn gedurende 18 en 12 maanden bij een temperatuur van respectievelijk 5°C en 12°C. Appelsap met een lagere concentratie zoals 45°Brix kunnen daarentegen opgeslagen worden gedurende respectievelijk 24 en 18 maanden, zonder dat significante kleurveranderingen optreden [55]. Door de concentratie aan opgeloste vaste stoffen te verhogen, m.a.w. door het watergehalte te verlagen, nemen bruinkleuringsreacties significant toe [1].

#### 2.3.2.2.6 Invloed van pH

Appelzuur heeft een katalytische werking op de Maillard-reactie. Een verhoging van het appelzuurgehalte zorgt voor een versnelde bruinkleuring tijdens de opslagperiode. De pH vermindert met 0,1 wanneer het gehalte aan appelzuur verhoogd wordt van 2 g/l tot 6 g/l [1]. De NEB blijkt niet erg gevoelig te zijn voor pH-veranderingen in het lage pH-gebied gaande van 2 tot 4 [1]. De klassieke Maillard-reactie is dus minder belangrijk bij de bruinkleuring van appelsap vanwege zijn hoge zuurgehalte [51]. De pH oefent enkel een belangrijke invloed uit op de Maillard-reactie wanneer de Amadori component gevormd is. De pH bepaalt dan de mate waarin de reacties verlopen, hetzij de 1:2 enolisatie bij lage pH waarbij uiteindelijk 5-HMF gevormd wordt of de 2:3 enolisatie bij hogere pH ter vorming van furfural [65].

## 2.4 Microbiologisch bederf van appelsap tijdens opslag

Schimmels en gisten zijn de voornaamste micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor voedselbederf. Ze worden dominerend in voedingsmiddelen wanneer de condities voor bacteriële groei minder gunstig zijn zoals lage pH, lage wateractiviteit, hoog zuur- en suikergehalte [9].

Schimmels (vb. *Penicillium*, *Byssochlamys* en *Aspergillus*) zijn meercellige micro-organismen en kunnen zich zowel geslachtelijk door middel van sporen als ongeslachtelijk voortplanten (vegetatieve wijze door schimmeldraden en zwamvlokken). De schimmeldraden worden zichtbaar bij voedselbederf [69].

Gisten (vb. *C. Lambica*, *C. Sake*, *Rhodotorula Rubra* [70]) zijn ééncellige schimmels die zich onderscheiden van de prokaryoten door het feit dat ze wel beschikken over een celkern en groter zijn. Gisten kunnen delen of vegetatief voortplanten door knopvorming. Hierbij wordt een uitstulping gevormd op het celmembraan. De celkern gaat zich delen en één van deze twee celkernen gaat dan naar de knop en snoert zich vervolgens af [69].

### 2.4.1 Sporenvormers

Hitteresistente schimmels worden gekarakteriseerd door de productie van ascosporen of gelijkende structuren die bestand zijn tegen hitte [71]. Sporenvormers vertonen dus een grote weerstand tegen een hoge temperatuur en overleven onder extreme omstandigheden. Dit betekent dat pasteurisatie niet in staat is om deze sporenvormers te doden. Sporenvormers delen en bederven op die manier levensmiddelen tijdens de opslag bij kamertemperatuur [10].

Een belangrijke opmerking hierbij is dat ascosporen van hitteresistente schimmels geactiveerd dienen te worden zodat de sporen na kieming vegetatieve microbiota vormen. Deze activatie kan d.m.v. een hiteschok, een lage pH of door ze langere tijd droog en koel te bewaren, m.a.w. in ongunstige omstandigheden. De hitteresistentie van een bepaald type sporenvormer is overigens sterk stamafhankelijk [71].

### 2.4.2 Detectie

Pasteurisatiebehandelingen kunnen microbiologisch bederf niet adequaat controleren omdat sommige hitteresistente schimmelsoorten, waarvan *Byssochlamys* de belangrijkste is, in staat zijn te overleven gedurende één of meerdere minuten bij een temperatuur van 93°C [21], [71], [72].

Voor de detectie van hittebestendige schimmels bestaan twee methoden, namelijk de petrischaalmethode en de directe incubatiemethode. Bij de petrischaalmethode wordt twee maal 50 ml van het staal overgebracht in steriele proefbuisjes en in een warmwaterbad geplaatst bij 75 tot 80°C gedurende 30 minuten. Hierbij is het belangrijk dat het oppervlak van het staal in de proefbuis volledig ondergedompeld is gedurende de warmtebehandeling. Hierna wordt iedere 50 ml staal gemengd met 10 ml voedingsbodem en overgebracht in een petrischaal. Hittebestendige schimmels zijn niet kieskeurig wat betreft hun voeding. Daarom zijn vele voedingsbodems, waaronder Malt Extract Agar (MEA), Aardappel Dextrose Agar (PDA), Orange Serum Agar (OSA) en Czapek Gist Autolysaat Agar (CYA) geschikt voor de ontkieming van de sporen en de daarop volgende vegetatieve groei [71], [72]. De petrischalen worden vervolgens losjes afgesloten in een plastieken zak om uitdroging tegen te gaan en gedurende 30 dagen bij een temperatuur van 30°C geïncubeerd. De meest levensvatbare sporen ontkiemen binnen 7 tot 10 dagen en vormen zichtbare kolonies [71]. Bij de directe incubatiemethode wordt 50 ml staal verhit in flessen gedurende 30 minuten in staande positie in een warmwaterbad bij 80°C. Hierna worden ze geïncubeerd gedurende 30 dagen bij 30°C in liggende positie om een zo groot mogelijk contactoppervlak te creëren. Het voordeel van deze methode is dat de contaminatie van sporen uit de lucht en vochtverlies geminimaliseerd worden. Het nadeel is dat de kolonies die groeien in de fles overgebracht moeten worden op een geschikte voedingsbodem voor identificatie [71], [72].

Uit onderzoek blijkt dat het gehalte aan fumaarzuur ook gebruikt kan worden als indicator voor de microbiologische kwaliteit van appels tijdens hun verwerking. De aanwezigheid van fumaarzuur in appelsap is namelijk te wijten aan microbiologische activiteit [73]. Nochtans is dit niet de enige reden voor de aanwezigheid van fumaarzuur in sap. Fumaarzuur wordt namelijk ook gevormd uit appelzuur tijdens de warmtebehandeling die toegepast wordt bij het maken van concentraat. Voor appelsap, dat gemaakt wordt uit dit concentraat, wordt een maximaal fumaarzuurniveau van 3,0 mg/l opgelegd. Er wordt verondersteld dat de chemische samenstelling van appels, voornamelijk het hoge zuurgehalte, appels gevoelig maakt voor warmte geïnduceerde vorming van fumaarzuur [73].

### 2.4.3 Patuline

Patuline wordt van nature aangetroffen in rottende appels. Het is een mycotoxine dat geproduceerd wordt door schimmels van het geslacht *Penicillium*, *Byssochlamys* en *Aspergillus*. De aanwezigheid van patuline in appelsap wordt veroorzaakt door de verwerking van rotte appels. Patuline komt terecht in het sap door zijn wateroplosbaarheid. Dit betekent dat patuline ook een indicator is van de kwaliteit van appelsap [74], [75].

Patuline is bij mensen en warmbloedige dieren al toxisch in lage dosis. Daarom wordt door de Wereld Gezondheidsorganisatie een maximale concentratie van 50 µg/l toegelaten in appelsap [74], [75].

## 2.5 Sensorische testen

Sensorische evaluatie omvat een reeks technieken voor het meten van menselijke reacties op levensmiddelen. Sensorische eigenschappen van voedingsmiddelen worden geanalyseerd en



bieden belangrijke en bruikbare informatie op voor productontwikkelaars, voedselwetenschappers en managers [76].

### **2.5.1 Sensorische eigenschappen**

De eigenschappen van een voedingsproduct worden meestal in een bepaalde volgorde waargenomen. Allereerst wordt het uiterlijk van een product beoordeeld. Dit is meestal de enige factor die interessant is voor de consument. Wanneer vluchtige componenten de neusholte passeren en gedetecteerd worden door het olfactorisch systeem (reukzintuig), wordt de geur van het product getoetst. De textuur en consistentie van een levensmiddel worden als derde eigenschap ervaren en waargenomen door sensoren in de mond, verschillend van de smaak en het chemische gevoel. Tot slot wordt de smaak behandeld. Deze omvat aroma's die vrijkomen uit een product in de mond, de smaken die veroorzaakt worden door opgeloste stoffen in de mond (zout, zoet, zuur, bitter en umami) en het chemische gevoel (pikant, metaalsmaak, enz.) [77]. Nochtans overlappen deze factoren elkaar tijdens het waarnemingsproces [77]. Zo is de smaakwaarneming een combinatie van gewaarwording in de mond, de smaak op de tong en de aromagewaarwording in de neus [78].

### **2.5.2 Soorten panels**

De proefpersonen worden onderverdeeld in vier soorten panels. Het eerste panel is het technisch controlepanel, ook expertenpanel genoemd. Het controlepanel bestaat uit 10 à 15 personen en dient verschillen tussen stalen te constateren. Aangezien dit panel stalen selecteert op basis van gevoeligheid, worden ze getraind [78].

Daarnaast bestaat ook een beschrijvend panel dat opgebouwd is uit 5 tot 20 proevers die in staat zijn om producten te profileren. Aangezien verbale begaafdheid noodzakelijk is, krijgen ze een uitgebreidere training dan het controlepanel [78].

Een derde panel omvat ongeveer 50 proevers en wordt het intern lekenpanel genoemd. Ze moeten hedonische uitspraken doen over eigen en concurrerende producten en vereisen geen voorafgaande training [78].

Tot slot bestaat ook nog het consumentenpanel. Deze groep, die bestaat uit 200 tot 300 personen, en is representatief voor de eigenlijke doelgroep van het product en vereisen daarom geen training [78].

### **2.5.3 Soorten sensorische testen**

Er bestaan zowel verschiltesten, waarbij de analist een verschil tussen stalen wilt aantonen als gelijkheidstesten, waarbij de analist een gelijkheid of equivalentie wil bewijzen [77]. Aangezien gelijkheidstesten niet worden uitgevoerd tijdens dit eindwerk, worden ze niet besproken.

De verschiltesten worden onderverdeeld in directionele en niet-directionele testen. Bij directionele testen is het de bedoeling dat de proefpersoon de stalen beoordeelt op basis van een specifieke eigenschap zoals de zoetheid van het sap, terwijl bij niet-directionele testen gevraagd wordt om een verschil aan te geven [79].

#### **2.5.3.1 Driehoekstest**

Een driehoekstest, ook triangeltest genoemd, is de meest gebruikte verschiltest en behoort tot de niet-directionele testen. Het principe van een driehoekstest is om aan de proefpersoon drie stalen te presenteren, waarvan twee afkomstig zijn van hetzelfde product en één van een ander product. De proefpersoon wordt dan gevraagd aan te duiden welk staal verschillend is [79]. De aard van het verschil hoeft echter niet bekend te zijn [78]. Minimum vijf ervaren proevers dienen deel te nemen aan de driehoekstest om een betrouwbaar resultaat op te leveren [79].

### **2.5.3.2 Duo-trio test**

Het principe van een duo-trio test is om de proefpersoon drie stalen aan te bieden, waarvan twee stalen afkomstig zijn van hetzelfde product en één van een ander product. Het eerste staal wordt benoemd als referentiestaal en de overige twee stalen zijn onderling verschillend. De proefpersoon dient aan te geven welk van beide stalen verschillend is t.o.v. het referentiestaal [79].

Indien gevraagd wordt aan te duiden welk staal verschillend is, behoort de duo-trio test tot de niet-directionele testen, terwijl ook gevraagd kan worden om op basis van een specifieke eigenschap de stalen te beoordelen. In dit laatste geval wordt de duo-trio test geclassificeerd als directionele test [79].

Een duo-trio test wordt enkel uitgevoerd met ongetrainde proefpersonen en vereist minimum 20 deelnemers [79].

### **2.5.3.3 A-niet A test**

Een A-niet A test is een niet-directionele test waarbij de proefpersoon een referentiestaal aangeboden krijgt dat vervolgens terug weggehaald wordt. Hierna wordt een tweede staal gepresenteerd en dient de proever aan te geven of dit staal al dan niet gelijk is aan het eerste staal [79].

Er dienen minimum 30 ongetrainde proefpersonen deel te nemen aan een A-niet A test opdat deze test een betrouwbaar resultaat oplevert [79].

### **2.5.3.4 n-AFC test**

De afkorting n-AFC staat voor alternatieve geforceerde keuze, waarbij de letter “n” duidt op het aantal stalen die gepresenteerd worden aan de proefpersoon (twee, drie of meer). De proefpersoon dient op basis van één criterium een staal te selecteren [77].

Een paarsgewijze vergelijkingstest is een directionele 2-AFC test. Het principe van een paarsgewijze vergelijkingstest is dat de proefpersoon twee verschillende stalen gepresenteerd krijgt en vervolgens beide stalen rangschikt volgens de intensiteit van een bepaalde eigenschap zoals de zoetheid van het sap. Deelname van minimaal zeven experts is vereist voor de uitvoering van een paarsgewijze vergelijkingstest [79].

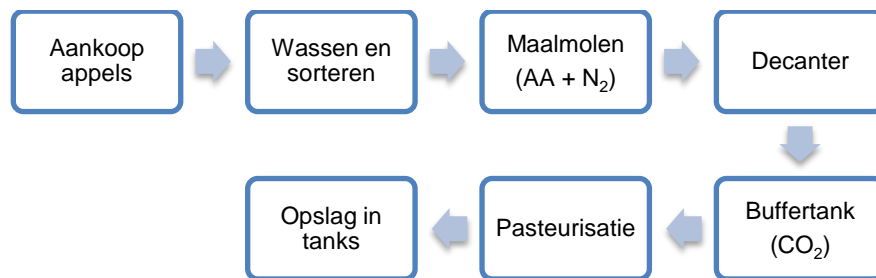
### **2.5.3.5 Voorkeurstest**

Het principe van een voorkeurstest is om aan de proefpersoon twee of meerdere stalen te presenteren. Vervolgens dient de proever zijn persoonlijke voorkeur op te geven. Indien het gaat om een vergelijking van twee stalen, spreekt men van een paarsgewijze voorkeurstest. Deze testen zijn eenvoudig en weerspiegelen het gedrag van de consument die twee producten vergelijkt. Een voorkeurstest wordt dan ook best uitgevoerd door de eigenlijke doelgroep van het product. Het nadeel van deze test is dat de proefpersoon gedwongen wordt om een voorkeur op te geven, ook al vindt hij beide stalen niet lekker. Aangezien de persoonlijke voorkeur van de proefpersonen niet standvastig is, dient een voorkeurstest enkele malen herhaald te worden [76].



### 3 Productieproces bij Konings NV

In Figuur 17 wordt een schematisch overzicht van het standaardproductieproces van troebel appelsap bij Konings NV weergegeven.



Figuur 17: Standaardproductieproces van troebel appelsap bij Konings NV

Voor de productie van appelsap buiten het oogstseizoen koopt Konings NV fruit aan dat extern gestockeerd wordt in koelkamers met een speciale atmosfeersamenstelling (CA). Na transport worden deze appels gelost in stortkuilen, waar ze tijdelijk gestockeerd worden. Via watertransport worden de appels van de stortkuil naar de fabriek geleid. Na het wassen en handmatig sorteren, worden de appels vermalen tot een maische. Dit is een puree van sap en pulp. Om de enzymatische bruinkleuring tegen te gaan, kan tijdens deze stap op vraag van de klant al dan niet AA gedoseerd worden via een doseringsketeltje dat gekoppeld kan worden aan de maalmolen. Stikstofgas ( $N_2$ ) kan ook worden toegevoegd zodat de hoeveelheid zuurstof, die kan reageren met de polyfenolen in het vruchtvlees, beperkt wordt. De procesconditie, waarbij AA en  $N_2$ -gas gedoseerd worden op de maalmolen, wordt aangeduid met de afkorting "AAM N2". Na de maalmolen wordt de maische via buizen naar een decanter geleid waar ze via een draaiend schroefmechanisme gescheiden wordt in sap en pulp. Het sap wordt via buizen getransporteerd naar een buffertank. Daarna wordt het sap gepasteuriseerd in een warmtewisselaar bij een temperatuur van  $92^\circ\text{C}$  gedurende 30 seconden om de microbiologische houdbaarheid van het sap te verlengen. De buffertank zorgt voor constante aanvoer naar de warmtewisselaar. Na de productie wordt het sap gedurende ca. twee weken gekoeld opgeslagen in niet-aseptische opslagtanks bij een temperatuur van ca.  $2^\circ\text{C}$ . Dit sap wordt vervolgens getransporteerd met tankwagens naar een andere site van Konings NV voor het afvulproces ofwel rechtstreeks naar de klant.



## 4 Materiaal en methode

### 4.1 Sensorische testen

Zowel voorkeurstesten (zie 2.5.3.5) als driehoekstesten (zie 2.5.3.1) werden gebruikt tijdens dit eindwerk. Bij een voorkeurstest diende de proefpersoon zijn persoonlijke voorkeur op te geven tussen twee verschillende stalen. Bij een driehoekstest kreeg de proefpersoon drie stalen gepresenteerd, waarvan de proefpersoon wist dat twee stalen hetzelfde waren en één verschillend was. De proever diende aan te geven welk staal volgens hem sensorisch verschillend was. Om bij een driehoekstest te bepalen of het sensorisch verschil tussen de sappen al dan niet significant was, werd gebruik gemaakt van Tabel 2. Hierbij werd steeds gewerkt met het 95% betrouwbaarheidsinterval ( $\alpha = 0,05$ ). De letter “n” staat voor het aantal leden dat deel heeft genomen aan de sensorische test. Indien het aantal correcte antwoorden kleiner is dan het getal dat teruggevonden werd in de tabel, werd besloten dat het sensorisch verschil niet significant is.

**Tabel 2: Minimum aantal correcte antwoorden nodig om te besluiten dat het sensorisch verschil significant is voor een bepaald significantieniveau ( $\alpha$ ) en een aantal proefpersonen (n) in een driehoekstest [80].**

n	$\alpha$					n	$\alpha$				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
6	4	5	5	6	—	27	12	13	14	16	18
7	4	5	5	6	7	28	12	14	15	16	18
8	5	5	6	7	8	29	13	14	15	17	19
9	5	6	6	7	8	30	13	14	15	17	19
10	6	6	7	8	9	31	14	15	16	18	20
11	6	7	7	8	10	32	14	15	16	18	20
12	6	7	8	9	10	33	14	15	17	18	21
13	7	8	8	9	11	34	15	16	17	19	21
14	7	8	9	10	11	35	15	16	17	19	22
15	8	8	9	10	12	36	15	17	18	20	22
16	8	9	9	11	12	42	18	19	20	22	25
17	8	9	10	11	13	48	20	21	22	25	27
18	9	10	10	12	13	54	22	23	25	27	30
19	9	10	11	12	14	60	24	26	27	30	33
20	9	10	11	13	14	66	26	28	29	32	35
21	10	11	12	13	15	72	28	30	32	34	38
22	10	11	12	14	15	78	30	32	34	37	40
23	11	12	12	14	16	84	33	35	36	39	43
24	11	12	13	15	16	90	35	37	38	42	45
25	11	12	13	15	17	96	37	39	41	44	48
26	12	13	14	15	17	102	39	41	43	46	50

De stalen werden bij iedere sensorische test (via een 3-cijferige code) gepresenteerd aan de proefpersonen. Het aantal proefpersonen varieerde van acht tot tien ervaren deelnemers. Bij de uitvoering van een sensorische test werden gestandaardiseerde omstandigheden, wat betreft de sensorische testruimte en monstervoorbereiding- en presentatie gehandhaafd. Het sap dat gebruikt werd tijdens de sensorische test bevond zich bij kamertemperatuur (20°C). Tijdens sensorische testen werd overigens steeds een beker met koffiebonen voorzien om het reukorgaan op te frissen en een droge cracker om de smaak te neutraliseren. Daarnaast werd een beker met vers drinkwater voorzien, zodat de proefpersonen hun mond konden spoelen gedurende de test om een optimale beoordeling te geven. Tot slot werd de kleur van het licht in de testruimte ingesteld, afhankelijk van de uit te voeren test, zodat de proefpersonen geen onderscheid konden maken tussen de verschillende sappen op basis van de kleur en de glans van het sap, maar hun oordeel enkel afhing van de geur, de smaak en het mondgevoel.

Manipulatie van de kleur van het licht werd toegepast bij driehoekstesten, terwijl bij voorkeurstesten steeds gebruik gemaakt werd van wit licht.

## 4.2 Fysicochemische analyse

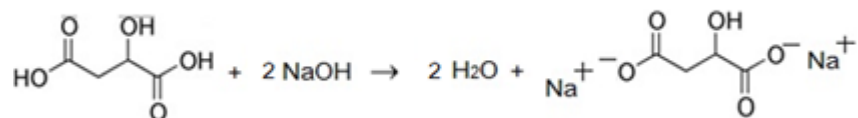
### 4.2.1 Hoeveelheid opgeloste droge stof

Om de hoeveelheid opgeloste droge stof te bepalen, werd in het laboratorium een Bellingham Stanley RFM 330 Refractometer gebruikt die de brekingsindex van vloeistoffen meet met een standaardafwijking van 0,1°Brix. De werking van een refractometer wordt uitgelegd in 2.3.2.2.5.

### 4.2.2 pH en appelzuurgehalte

De pH en het appelzuurgehalte van het sap werd in het laboratorium bepaald met een automatische titrator, genaamd TitroLine Easy van het merk Schott Instruments.

Er werd 20,00 ml staal gepipetteerd in een bekersglas en indien nodig aangelengd met gedemineraliseerd water. De initiële pH werd automatisch gemeten en het staal werd getitreerd met een aangekochte natriumhydroxideoplossing (NaOH) met een concentratie van 0,1 M totdat de vooraf ingestelde eind pH van 8,1 bekomen werd. NaOH reageert met de zuren in het sap tot water (H<sub>2</sub>O) en natriumcarboxylaten. Figuur 18 toont de reactie met appelzuur.



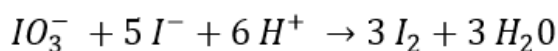
Figuur 18: Reactievergelijking van appelzuur met NaOH tot H<sub>2</sub>O en een natriummalaat

Door het toegevoegd volume NaOH te vermenigvuldigen met een conversiefactor van 0,335 werd het gehalte aan appelzuur in g/l bekomen met een standaardafwijking van 0,5 g/l. De standaardafwijking van de pH bedraagt 0,2.

### 4.2.3 Ascorbinezuurgehalte

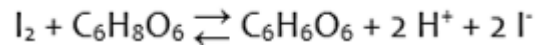
Het AA-gehalte werd in het laboratorium gemeten a.d.h.v. een jodometrische titratie. M.b.v. een maatcilinder werd 50 ml van het te onderzoeken appelsap in een erlenmeyer gebracht. Hieraan werd 5 ml van een 25% zwavelzuuroplossing (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) toegevoegd en gemengd. Vervolgens werd 1 ml van een 1% zetmeeloplossing toegevoegd als indicator [81] en opnieuw gemengd. Deze oplossing werd direct getitreerd met een 1/64 N jodide-jodaat-oplossing (1/128 M I<sub>2</sub>) [82]. Door uiteindelijk het toegevoegde volume aan jodide-jodaat-oplossing te vermenigvuldigen met een conversiefactor van 27,5 werd het gehalte ascorbinezuur bekomen in mg/l.

In zuur midden reageren jodide (I<sup>-</sup>) en jodaat (IO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tot jood (I<sub>2</sub>) en H<sub>2</sub>O [83], [84].



Figuur 19: Reactievergelijking van jodaat, jodide tot jood en water [83], [84]

De  $I_2$ , die ontstaat tijdens deze reactie, reageert vervolgens met AA, die aanwezig is in het appelsap, volgens volgende reactie [83], [84]:



Figuur 20: Reactievergelijking van jood en AA tot DHA en jodide [83], [84]

Indien alle AA is geoxideerd, wordt bij de eerste druppel jodide-jodaat-oplossing, die toegevoegd wordt, nog wel jood gevormd, maar deze kan dan niet meer reageren met AA. Deze overmaat aan  $I_2$  vormt dan samen met de al eerder toegevoegde zetmeelindicator een jood-zetmeelcomplex, dat ervoor zal zorgen dat de oplossing een zwart/blauwe kleur krijgt. Dit is het eindpunt van de titratie [83], [84].

### 4.3 Pasteuriseren

In het laboratorium werden de stalen gepasteuriseerd m.b.v. een microgolfoven van het merk Panasonic (type: Pro II NE-1840). Het te pasteuriseren sap werd overgebracht in een hitteresistente plastieken beker. Vervolgens werd deze beker in de microgolfoven geplaatst en verwarmd totdat een temperatuur van  $84^\circ\text{C}$  bereikt werd. Het verhitte sap werd overgegoten in glazen flessen. Wanneer de flessen gevuld en dichtgedraaid zijn, werden ze ondersteboven neergezet gedurende 30 seconden zodat het hete sap de hals en de onderkant van de dop van de fles steriliseerde. Vooraf zijn deze glazen flessen echter nog niet steriel. Tot slot werd het sap in de glazen flessen afgekoeld door ze te plaatsen in een koud stromend waterbad dat zich op een temperatuur van  $20^\circ\text{C}$  bevond. Dit zorgde ervoor dat de hoeveelheid  $O_2$  in de fles kleiner werd en vacuüm ontstond. Deze techniek wordt "hot-fill afvullen" genoemd.

Als een grote hoeveelheid sap gepasteuriseerd moest worden, werd een automatisch pasteurisatietoestel gebruikt van het type PAS1-PS2-81. Naast een grote tijdsbesparing bood dit toestel het voordeel dat het te pasteuriseren sap zich steeds op dezelfde exacte temperatuur van  $84^\circ\text{C}$  bevond.



## 5 Project 1: Optimalisatie van productieproces voor aseptische opslag van sap

### 5.1 Proefopzet

Bij het referentieproces (AAM N2), zoals beschreven in 3, wordt tijdens deze proefopzet AA toegevoegd op de maalmolen om de enzymatische bruinkleuring t.g.v. de activiteit van het enzym PPO te verminderen. Wanneer AA echter op een latere locatie in het productieproces toegevoegd wordt, krijgt AA minder tijd om te oxideren en afbraakproducten te vormen, die een nadelig effect kunnen uitoefenen op de organoleptische eigenschappen van het sap. Daarom wordt onderzoek uitgevoerd naar het productieproces waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank i.p.v. op de maalmolen. Deze procesconditie wordt aangeduid met de afkorting "AABP N2". Het doel van dit project is dan ook om na te gaan of de toevoeging van AA aan de buffertank aanleiding geeft tot een fysicochemisch en sensorisch stabiel sap.

#### 5.1.1 Opvolging productieproces

Om het productieproces voor aseptische opslag van sap te optimaliseren, werd eerst de productie opgevolgd waarbij AA gedoseerd werd, enerzijds op de maalmolen en anderzijds op de buffertank. Zowel de productie van appelsap, als deze van perensap werd opgevolgd. De dosering van AA gebeurde m.b.v. een doseringsketel die aangesloten werd op de betreffende locatie in het productieproces en waarin zich een waterige AA-oplossing bevond. Aangezien tijdens het productieproces aerobe afbraak optreedt van AA, kan door de klant een eindconcentratie van 300 à 400 ppm AA in het appelsap gevraagd worden. Om dit te realiseren werd het AA-gehalte tijdens de productie opgevolgd door direct na de pasteurisatiebehandeling om de 15 minuten staal te nemen. De concentratie aan AA in dit staal werd hierna bepaald via een jodometrische titratie om een indicatie te bekomen van de concentratie aan AA aanwezig in het sap. Op die manier werd een eventuele afwijking van het AA-gehalte onmiddellijk gedetecteerd en indien nodig werd de dosering van AA bijgestuurd. Nadat het volledige productieproces afgelopen was, werd een laatste keer staal genomen waarvan opnieuw het AA-gehalte gemeten werd. Deze concentratie werd vervolgens vergeleken met de concentratie die verwacht werd indien geen aerobe AA-afbraak zou optreden, m.a.w. de toegevoegde AA-concentratie. Deze vergelijking werd gemaakt om na te gaan bij welke procesconditie meer AA-afbraak optreedt.

#### 5.1.2 Verouderingsexperimenten

Na de opvolging van het productieproces werd gestart met een sensorische driehoekstest onmiddellijk na de productie om na te gaan of al dan niet een significant sensorisch verschil bestaat tussen beide sappen. Deze driehoekstest werd uitgevoerd in de voorziene degustatieruimte. Zowel experts als consumenten namen deel aan deze test. Indien deze driehoekstest een significant sensorisch verschil uitwees, werd een voorkeurstest uitgevoerd. Deze voorkeurstest zal opnieuw uitgevoerd worden in de voorziene degustatieruimte en enkel het expertenpanel neemt hieraan deel.

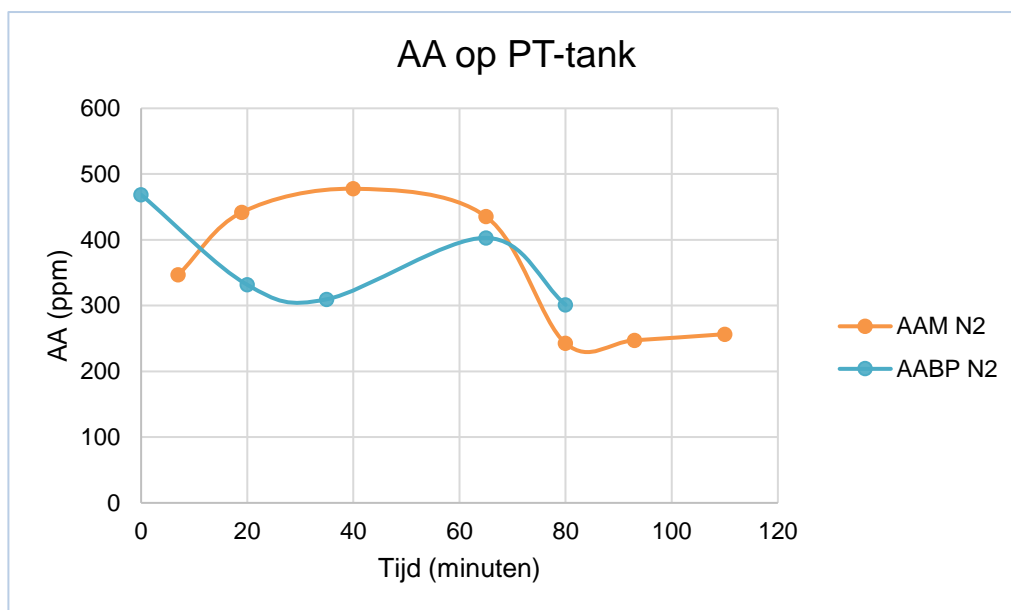
Twee weken later werd eenzelfde voorkeurstest uitgevoerd tussen deze sappen. De sappen werden onder dezelfde procescondities als de eerder beschreven voorkeurstest geproduceerd, doch op een verschillend tijdstip. Om zo veel mogelijk proefpersonen te bereiken, werden de stalen naar de proefpersonen gebracht i.p.v. de degustatieruimte te gebruiken. Dat betekent dat zowel het expertenpanel als het consumentenpanel deelnam aan deze voorkeurstest.

Hierna werd de stabiliteit van het sap afkomstig van beide procescondities in veroudering nagegaan. Versnelde veroudering werd geïnduceerd door het sap op te slaan in een warmtekamer. Hierbij werd verondersteld dat één week opslag in een warmtekamer van 32°C overeenkomt met een opslag van drie weken bij kamertemperatuur (20°C). Voordat de stalen in de warmtekamer geplaatst werden, werd het sap gepasteuriseerd m.b.v. de microgolfoven en hot-fill afgevuld in glazen flessen. De stalen werden gedurende vier weken wekelijks geanalyseerd op basis van fysicochemische parameters waarbij de hoeveelheid opgeloste droge stof, de pH, het appelzuurgehalte en het AA-gehalte gemeten werden. Daarnaast werd iedere week a.d.h.v. sensorische voorkeurstesten tussen beide sappen bepaald welke procesconditie de voorkeur kreeg. De wekelijkse voorkeurstesten werden uitgevoerd in de voorziene degustatieruimte met het expertenpanel van het bedrijf.

## 5.2 Resultaten en discussie

### 5.2.1 Opvolging productieproces

Het AA-gehalte van het AAM N2- en AABP N2-sap na de pasteurisatiebehandeling, dat iedere 15 minuten gemeten werd tijdens de opvolging van het productieproces, wordt getoond in Figuur 21 en de bijhorende meetgegevens worden weergegeven in bijlage B.

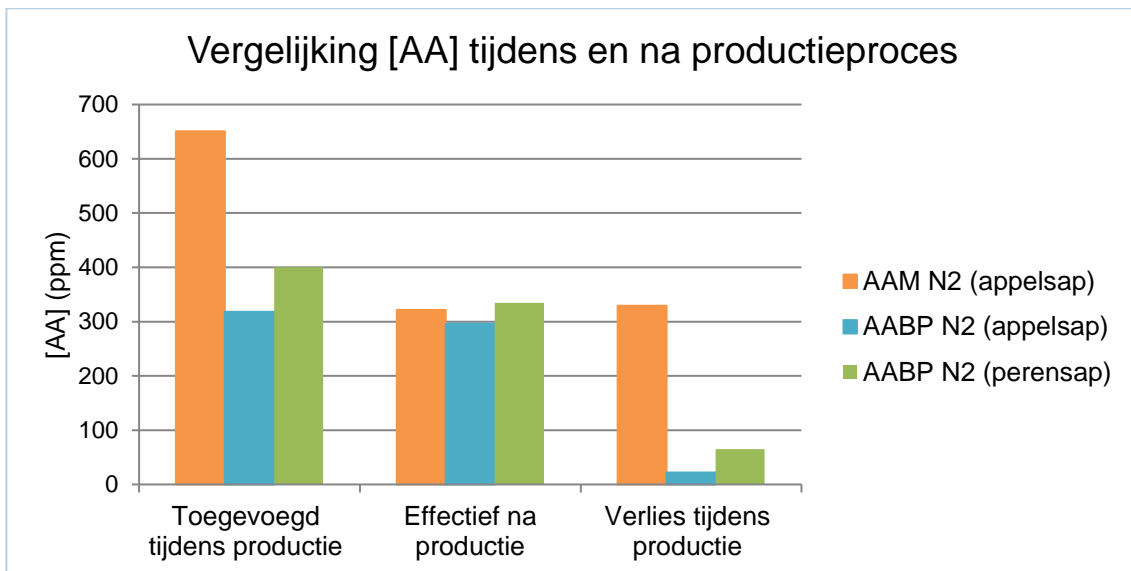


**Figuur 21: Verloop AA-gehalte tijdens productieproces van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2**

Op Figuur 21 is zichtbaar dat het AA-gehalte min of meer constant blijft tijdens het productieproces. De daling na 65 minuten bij de productie van het AAM N2-sap werd veroorzaakt doordat de stand van het doseringsketeltje lager werd gezet.

In Figuur 22 (meetresultaten zie bijlage B) wordt weergegeven welke concentratie aan AA toegevoegd werd tijdens het productieproces op de betreffende locatie, welke concentratie aan AA effectief teruggevonden werd na de productie van het sap en tot slot het verlies aan AA tijdens de productie (verlies = toegevoegd – effectief).





Figuur 22: Toegevoegde en effectieve AA-concentratie en AA-verlies tijdens opvolging productieproces

Dit histogram toont dat tijdens het productieproces, waarbij AA gedoseerd wordt op de maalmolen (AAM N2), een beduidend grotere hoeveelheid AA vereist is om een constante concentratie aan AA rond 300 ppm te bekomen in het eindproduct, in vergelijking met het productieproces waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank (AABP N2). Zo bleek 8 kg AA vereist te zijn voor de productie van 10 000 liter AAM N2-sap. Wanneer AA toegevoegd wordt op de buffertank treedt veel minder verlies op t.g.v. oxidatieve afbraak omdat AA minder tijd krijgt om te oxideren. Hierdoor is dus een aanzienlijk lagere hoeveelheid aan AA nodig om eenzelfde constante concentratie van 300 ppm AA te bekomen in het eindproduct.

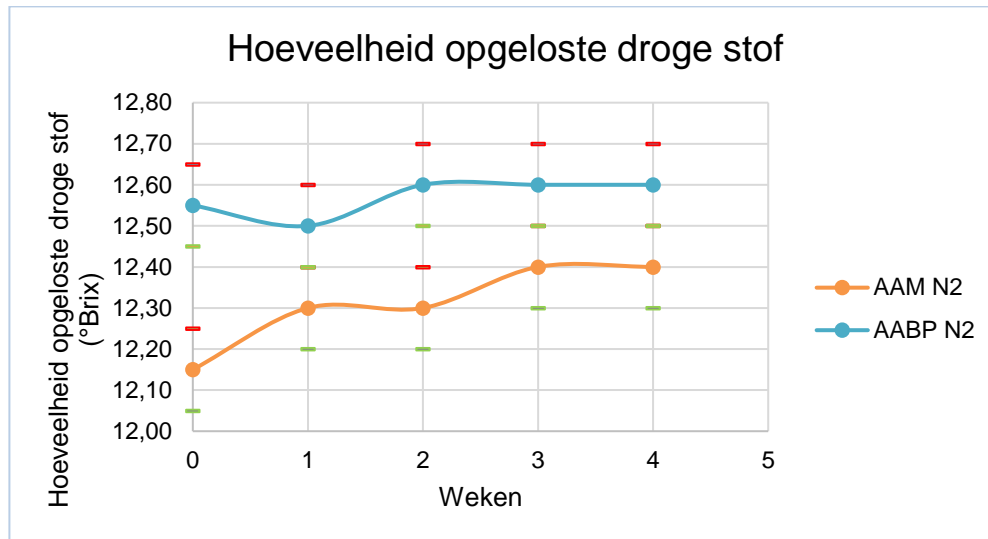
Tijdens het productieproces, waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank, werd opgemerkt dat het sap na de decanter een bruine kleur vertoonde. Het sap na de buffertank vertoonde echter opnieuw een lichtere kleur. Dit bevestigt dat de bruinkleuringsreactie t.g.v. PPO-activiteit omkeerbaar is door toevoeging van een reductiemiddel zoals AA (zie 2.3.2.1.1). Dit is tevens het bewijs dat de toevoeging van AA op de buffertank nuttig is om bruinkleuring tegen te gaan.

## 5.2.2 Verouderingsexperimenten

### 5.2.2.1 Fysicochemische analyse

#### 5.2.2.1.1 Hoeveelheid opgeloste droge stof

De hoeveelheid opgeloste droge stof gedurende vier weken opslag in de warmtekamer bij 32°C wordt weergegeven in Figuur 23.



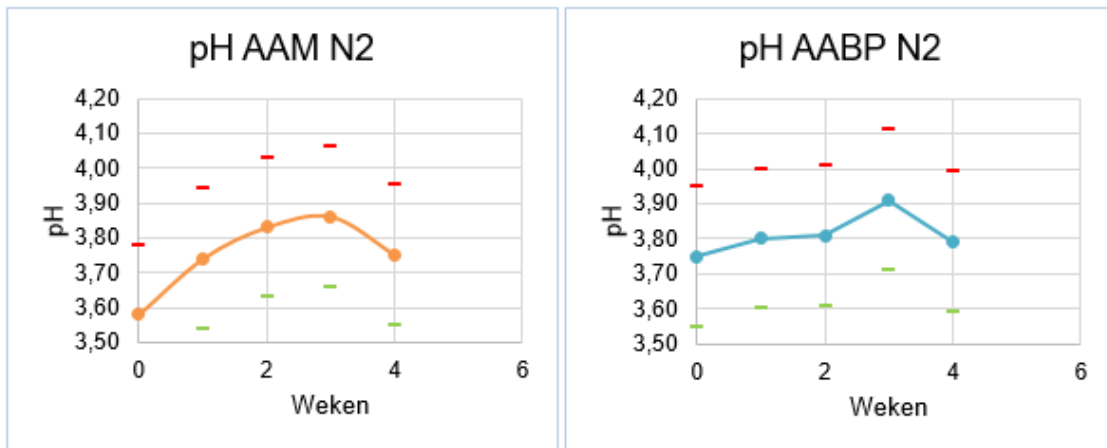
Figuur 23: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Het gehalte aan opgeloste droge stof schommelt tussen 12,10 en 12,60°Brix. De boven- en ondergrenzen worden aangeduid door respectievelijk rode en groene streepjes. Deze grenzen geven aan dat het sap afkomstig van de procesconditie AAM N2 een significante stijging van de hoeveelheid opgeloste droge stof vertoont na één week opslag in de warmtekamer bij 32°C. Deze significante Brix-stijging kan te wijten zijn aan verdunningsfouten tijdens het hot-fill afvullen van de glazen flessen bij het pasteuriseren. Daarnaast is het aangeraden om iedere meting in duplo of triplo uit te voeren om de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid na te gaan.

De hoeveelheid opgeloste droge stof van het AABP N2-sap blijft echter wel constant gedurende de volledige opslagperiode. Daarnaast vertoont dit sap hogere Brix-waarden dan het AAM N2-sap. Nochtans werd het sap geproduceerd uitgaande van dezelfde lading appels. Het verschil in hoeveelheid opgeloste droge stof leidt echter wel tot een verschil in zoet-zuurverhouding tussen de sappen, wat blijkt uit de sensorische testen (zie 5.2.2.2).

#### 5.2.2.1.2 pH en appelzuurgehalte

De meetresultaten van de pH en het appelzuurgehalte gedurende vier weken opslag in de warmtekamer bij 32°C zijn terug te vinden in bijlage B. In Figuur 24 wordt het pH-verloop weergegeven van de sappen afkomstig van de condities AAM N2 en AABP N2 gedurende vier weken opslag in de warmtekamer bij 32°C.



**Figuur 24: pH-verloop van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C**

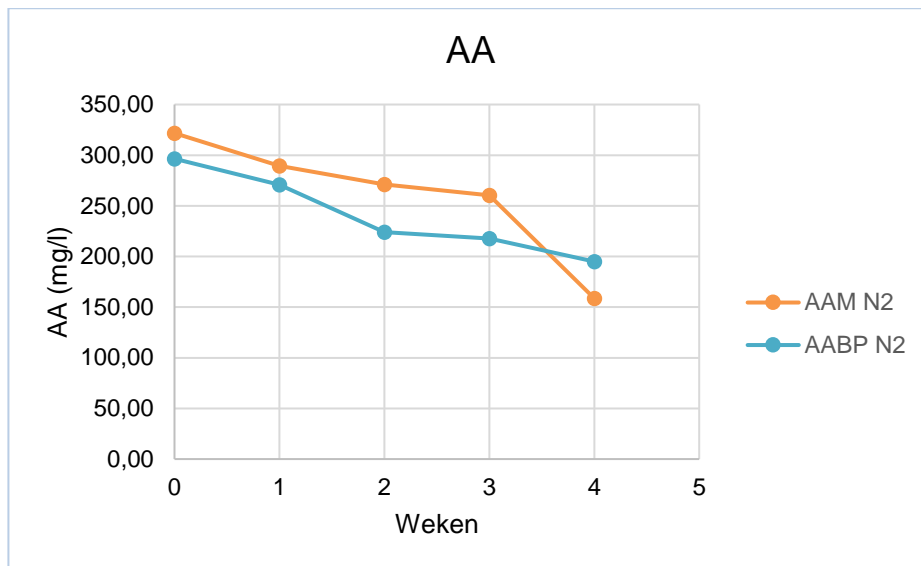
De pH-waarden van de sappen variëren tussen 3,58 en 3,91. Zowel de pH van het AAM N2-sap als die van het AABP N2-sap vertonen een lichte stijging gedurende de opslagperiode. De boven- en ondergrenzen, aangeduid door respectievelijk rode en groene streepjes, geven echter aan dat deze stijging niet significant is. Tijdens de opslagperiode kan anaerobe afbraak optreden waarbij AA omgezet wordt in furfural (zie 2.3.1.2). Aangezien de pH van furfural (3,5 – 4,5 [85]) hoger is dan deze van AA (2,1 – 2,6 [41]), zal deze afbraak zorgen voor een pH-stijging.

Het appelzuurgehalte van de sappen bereikt een minimumwaarde van 3,64 g/l en een maximumwaarde van 4,27 g/l. Zowel het appelzuurgehalte van het AAM N2-sap als dit van het AABP N2-sap blijven constant gedurende de volledige opslagperiode van vier weken in de warmtekamer bij een temperatuur van 32°C.

Een pH-stijging zou overeen moeten komen met een daling van het appelzuurgehalte. Nochtans vertoont het appelzuurgehalte geen stijging of daling gedurende de opslagtermijn. Appelsap bevat echter nog andere zuren, waaronder AA en citroenzuur, die de pH van het sap beïnvloeden.

#### 5.2.2.1.3 AA-gehalte

In Figuur 25 wordt het AA-gehalte weergegeven van de sappen afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende vier weken opslag in de warmtekamer bij een temperatuur van 32°C. De bijhorende meetresultaten zijn terug te vinden in bijlage B.



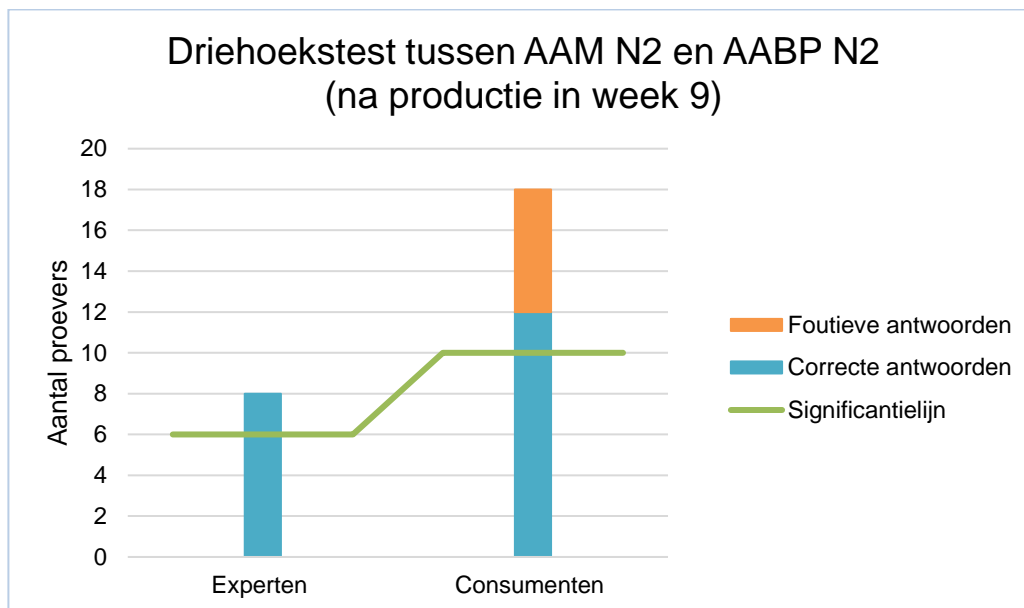
**Figuur 25: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C**

Het AA-gehalte neemt wekelijks lichtjes af. Deze afbraak kan enerzijds te wijten zijn aan de NEB. In aanwezigheid van aminozuren zullen AA, DHA en hun eventueel gevormde afbraakproducten verder reageren door deel te nemen aan de Maillard-reactie (zie 2.3.2.2.3). Om deze veronderstelling te bevestigen dient de kleur van de sappen gemeten te worden i.f.v. de tijd. De kleur van vruchtensappen wordt onder andere gemeten met kleurkaarten. Bovendien wordt in de literatuur vermeldt dat de NEB toeneemt naarmate de opslagperiode vordert. Het verlies aan AA kan anderzijds ook veroorzaakt worden door anaerobe afbraak tot furfural, wat een negatieve invloed uitoefent op de smaak van het appelsap.

Na de pasteurisatiebehandeling zit bij benadering geen zuurstof meer opgelost in het sap. Er kan echter wel nog een kleine hoeveelheid zuurstof aanwezig zijn in de hals van de fles, dat AA kan oxideren.

### 5.2.2.2 Sensorische testen

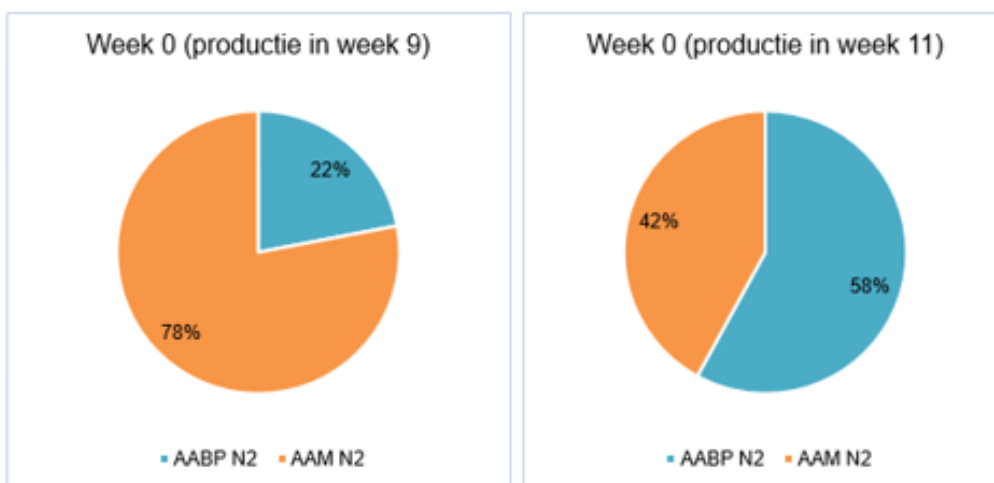
Het resultaat van de sensorische driehoekstest, die uitgevoerd werd onmiddellijk na de productie, wordt weergegeven in Figuur 26.



Figuur 26: Resultaat driehoekstest tussen sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AAM N2 onmiddellijk na productie

De nulhypothese ( $H_0$ -hypothese) gaat ervan uit dat een significant sensorisch verschil bestaat tussen de sappen, afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2. De alternatieve hypothese ( $H_1$ -hypothese) veronderstelt geen significant verschil tussen beide sappen. De oranje balk duidt het aantal foutieve antwoorden aan, daar waar de blauwe balk het aantal correcte antwoorden weergeeft. De groene lijn geeft aan hoeveel correcte antwoorden minimaal gegeven moeten worden opdat het sensorisch verschil significant is. Deze waarden worden gehaald uit de significantietabel. Van de consumenten hadden 12 van de 18 proevers een correct antwoord gegeven, daar waar alle 8 de experten het correcte staal aanduiden. Aangezien het aantal correcte antwoorden in beide gevallen hoger is dan het significantieniveau kan statistisch met 95% zekerheid besloten worden dat het sensorisch verschil significant is. Het resultaat van deze driehoekstest geeft dus aan dat de  $H_0$ -hypothese behouden moet blijven voor het aantonen van een significant verschil tussen het AAM N2- en het AABP N2-sap.

Aangezien de driehoekstest een significant verschil uitwees, werd een voorkeurstest uitgevoerd. Het resultaat van deze test wordt weergegeven in Figuur 27 (links). Uit het resultaat van deze test bleek een uitgesproken voorkeur (78%) te bestaan voor het AAM N2-sap. Dit sap werd gekenmerkt door een frissere geur en een betere zoet-zuurverhouding, terwijl het AABP N2-sap een afwijkende smaak vertoonde. Daarnaast werd opgemerkt dat het AAM N2-sap een dunnere textuur had dan het AABP N2-sap. Dit kan verklaard worden door de hogere Brix-waarden van het AABP N2-sap.

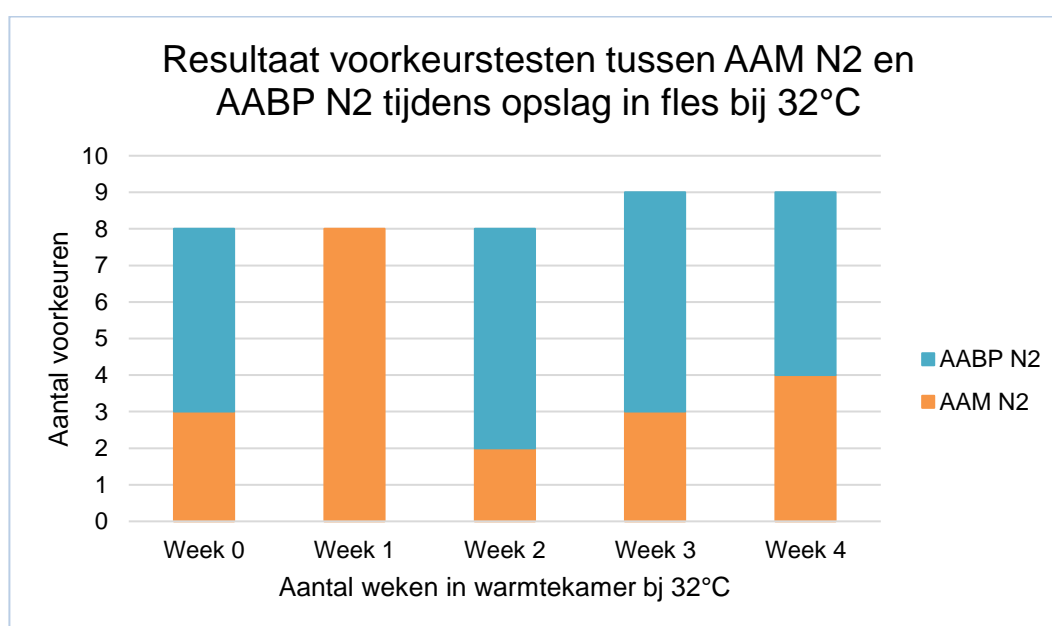


**Figuur 27: Resultaat voorkeurstest tussen sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AAM N2 onmiddellijk na productie in week 9 (links) en in week 11 (rechts)**

Het resultaat van de voorkeurstest, die twee weken later uitgevoerd werd, wordt weergegeven in Figuur 27 (rechts). Deze test resulteerde in een andere conclusie, namelijk een lichte voorkeur (58%) voor het AABP N2-sap. Dit sap bleek meer appelaroma te bevatten wat resulteert in een aangename geur en een meer uitgesproken appelsmaak. Nochtans vertoont het AAM N2-sap een lichtere kleur, maar dit weegt niet op tegen haar minder goede smaak.

Het sensorisch verschil tussen beide voorkeurstesten is mogelijk te wijten aan het gebruik van een verschillende appelvariëteit bij de productie van het sap. De locatie waar de proeverij plaatsvindt, kan ook een effect uitoefenen op de persoonlijke voorkeur van een individu [86]. Aangezien aan deze laatste voorkeurstest (productie week 11) een groter aantal proefpersonen deelnam, wordt verder gewerkt met deze resultaten.

In Figuur 28 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de wekelijks uitgevoerde voorkeurstesten tijdens het verouderingsexperiment.



**Figuur 28: Resultaat van de wekelijks uitgevoerde voorkeurstesten tussen sappen afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C**

Na één week opslag bleek de voorkeur volledig (100%) uit te gaan naar het AAM N2-sap. Dit sap werd dan ook gekarakteriseerd door een frissere en zoetere smaak. Uit de fysicochemische analyse van het AAM N2-sap bleek dat na één week opslag een significante stijging van het gehalte aan opgeloste droge stof optreedt. Uit het resultaat van deze sensorische voorkeurstest blijkt dus dat deze Brix-stijging overeenkomt met een toename van de intensiteit van de zoetheid van het sap.

Na twee weken opslag in de warmtekamer was de voorkeur volledig omgedraaid en verkoos 75% van de proevers het AABP N2-sap, ondanks zijn meer donkere kleur. Meerdere proefpersonen gaven aan dat dit sap een aangenamere geur en tevens een vollere, zoetere smaak had. Deze sensorische waarneming komt overeen met de resultaten van de fysicochemische analyse waaruit bleek dat het AABP N2-sap een hoger gehalte aan opgeloste droge stof bevat dan het AAM N2-sap. Hogere Brix-waarden resulteren namelijk in een zoetere smaak.

Na drie weken opslag in de warmtekamer verkoos 67% nog steeds het AABP N2-sap, ondanks zijn meer donkere kleur. Opnieuw bleek het AABP N2-sap een zoetere, frissere en fruitigere smaak te bevatten dan het AAM N2-sap.

Na vier weken opslag in de warmtekamer verkoos opnieuw de meerderheid van de proefpersonen (56%) het AABP N2-sap vanwege zijn nog steeds frissere en minder verouderde smaak.

### 5.3 Conclusie

Uit de fysicochemische analyse blijkt dat de hoeveelheid opgeloste droge stof van het AAM N2-sap significant toeneemt na één week opslag in de warmtekamer, terwijl deze van het sap, waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank niet significant wijzigt. De pH en het appelzuurgehalte van beide sappen blijven overigens ook constant in functie van de tijd. Het AA-gehalte van zowel het AAM N2- als het AABP N2-sap nemen lichtjes af naarmate de opslagperiode vordert. Deze afbraak is deels te wijten aan de NEB en deels aan de anaerobe (en aerobe) afbraak van AA.

Uit de wekelijks uitgevoerde sensorische voorkeurstesten blijkt na twee weken opslag in de warmtekamer bij 32°C, wat overeenkomt met zes weken opslag bij kamertemperatuur (20°C), een voorkeur te bestaan voor het sap waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank. AABP N2 heeft namelijk een frissere, zoetere smaak dan het AAM N2-sap. Dit wordt bevestigd door de hogere Brix-waarden van het AABP N2-sap. Nochtans beschikt het AAM N2-sap over een lichtere kleur.





## 6 Project 2: Bepaling maximale opslagperiode van aseptisch opgeslagen sap

### 6.1 Proefopzet

Aangezien het referentiesap, geproduceerd volgens het standaardproductieproces van Konings NV, ca. twee weken opgeslagen kan worden bij een temperatuur van 2°C in een niet-aseptische tank alvorens transport en aangezien de vervaardiging van referentiesap veel kosten met zich meedraagt vanwege de hoge kostprijs van extern opgeslagen fruit, is het referentieproces op dit moment niet ideaal. Daarom wordt onderzoek verricht naar aseptische opslag van sap. Momenteel is echter nog niet geweten welke de maximale opslagtermijn is voor dit sap. Het doel van dit project is dan ook om de maximale opslagtermijn voor aseptisch opgeslagen sap te bepalen. De sappen waarbij AA gedoseerd wordt enerzijds op de maalmlen (AAM N2) en anderzijds op de buffertank (AABP N2) worden besproken.

Om de maximale opslagperiode te bepalen voor aseptisch sap, werd na nul, drie en zes maanden staal genomen van sap dat aseptisch opgeslagen werd in BIB's bij een temperatuur van 5,5°C. Hierop werden fysicochemische analyses uitgevoerd, waarbij de hoeveelheid opgeloste droge stof, de pH, het appelzuurgehalte en het AA-gehalte gemeten werden. Daarnaast werden sensorische voorkeurstesten uitgevoerd tussen de sappen afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2 na nul, drie en zes maanden opslag in de BIB's. De voorkeurstest die uitgevoerd werd onmiddellijk na de productie werd reeds beschreven (zie 5.2.2.2). Zowel de voorkeurstest na drie maanden opslag in de BIB als deze na zes maanden opslag werd uitgevoerd in de voorziene degustatieruimte. Aan de voorkeurstest na drie maanden opslag nam zowel het consumenten- als het expertenpanel deel, daar waar aan de voorkeurstest na zes maanden opslag enkel het expertenpanel meedeed.

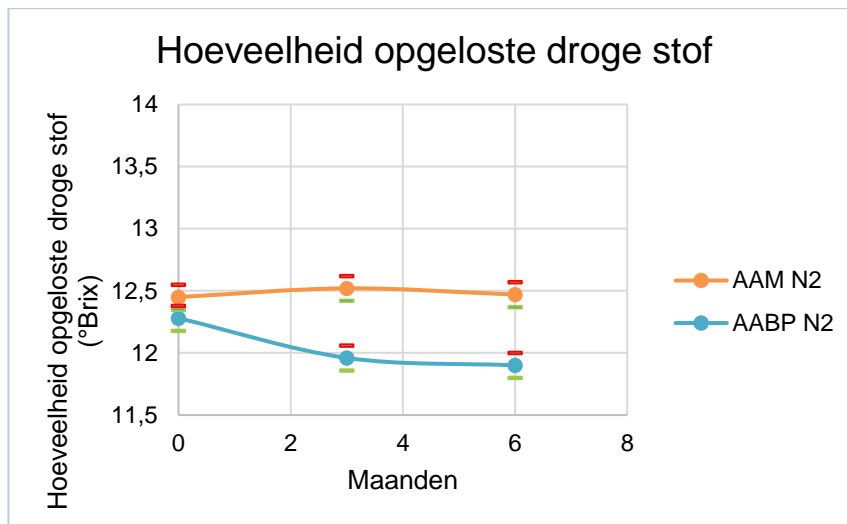
### 6.2 Resultaten en discussie

#### 6.2.1 Fysicochemische analyse

De bekomen meetresultaten worden weergegeven in bijlage C.

##### 6.2.1.1 *Hoeveelheid opgeloste droge stof*

In Figuur 29 wordt de hoeveelheid opgeloste droge stof weergegeven van de sappen, afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2, gedurende zes maanden opslag in aseptische BIB's bij een temperatuur van 5,5°C.



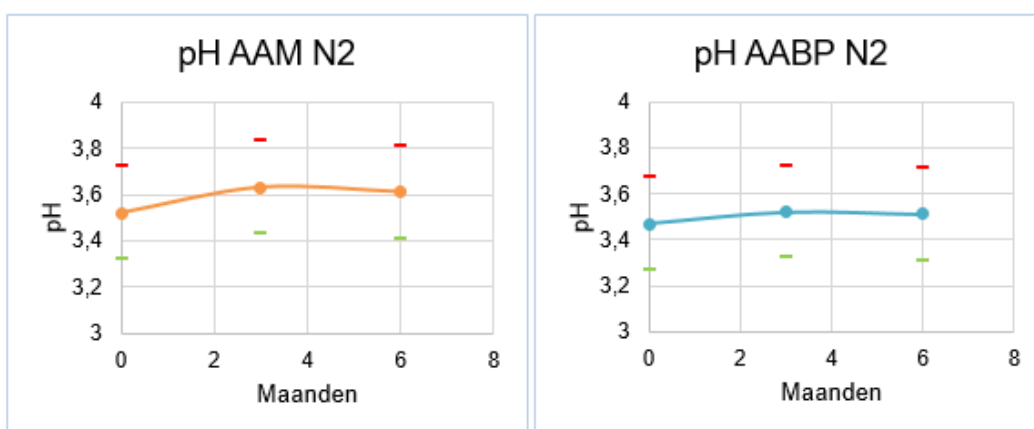
**Figuur 29: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C**

De hoeveelheid opgeloste droge stof schommelt van 11,90 tot 12,52°Brix. Het appelsap afkomstig van de procesconditie AABP N2 vertoont een lager gehalte aan opgeloste droge stof dan het AAM N2-sap. Dit verschil zal een effect uitoefenen op de zoet-zuurverhouding van de sappen en kan verklaard worden door het gebruik van verschillende appelvariëteiten bij de vervaardiging van de sappen.

Uit de boven- en ondergrenzen, aangeduid door respectievelijk rode en groene streepjes, blijkt dat het AABP N2-sap een significante daling vertoont na drie maanden opslag in de BIB, terwijl het gehalte aan opgeloste droge stof van het AAM N2-sap constant blijft gedurende de volledige opslagperiode van zes maanden. De daling kan veroorzaakt worden door het feit dat de BIB's niet gehomogeniseerd worden tijdens stockage. Hierdoor bestaat de kans dat op de bodem van de BIB sedimenten gevormd zijn.

### 6.2.1.2 pH en appelzuurgehalte

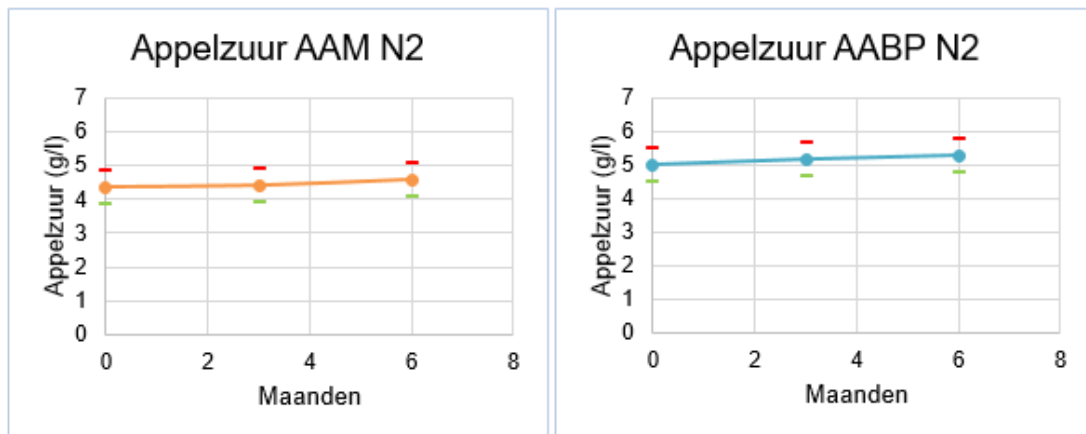
De pH en het appelzuurgehalte van de sappen, afkomstig van de procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende zes maanden opslag in BIB's bij 5,5°C, worden weergegeven in respectievelijk Figuur 30 en Figuur 31.



**Figuur 30: pH van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C**

De pH-waarden van de sappen variëren tussen 3,47 en 3,63. Bij beide sappen wordt een lichte stijging waargenomen gedurende de opslagperiode van zes maanden in de BIB's. De boven- en ondergrenzen, aangeduid door respectievelijk rode en groene streepjes, geven echter aan dat deze stijging niet significant is.

De toename van de pH kan veroorzaakt worden door het optreden van chemische reacties waarbij zure componenten verbruikt worden en de pH toeneemt. Tijdens de opslagperiode kan namelijk anaerobe afbraak van AA tot furfural optreden. Aangezien AA een lagere pH heeft dan furfural, leidt deze afbraakreactie tot een stijging van de pH [41], [85].



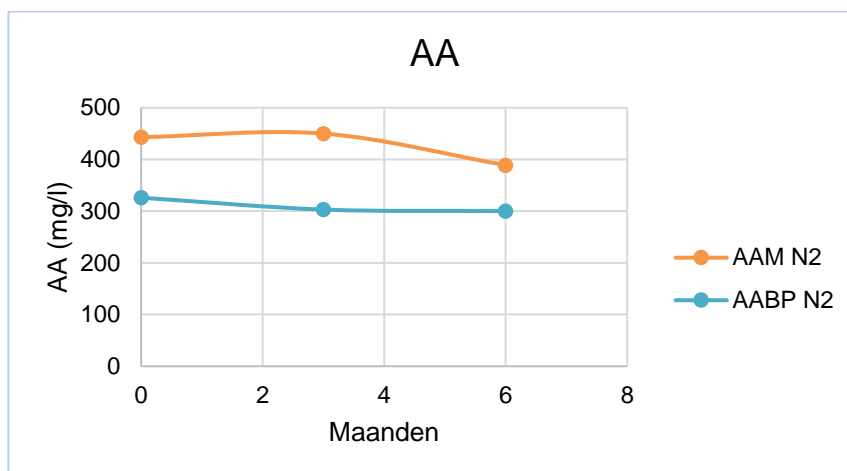
**Figuur 31: Appelzuurgehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 (links) en AABP N2 (rechts) gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C**

Het appelzuurgehalte van de sappen bereikt een minimumwaarde van 4,34 g/l en een maximumwaarde van 5,28 g/l. Het sap afkomstig van de procesconditie AAM N2 vertoont een lager appelzuurgehalte dan het sap afkomstig van de procescondities AABP N2. Dit verschil kan veroorzaakt worden door het gebruik van een verschillende appelvariëteit bij de productie van de sappen. De boven- en ondergrenzen geven echter aan dat er geen significante verandering optreedt van het appelzuurgehalte gedurende de volledige opslagperiode.

Opmerkelijk is het feit dat bij een stijging van de pH een daling van het appelzuurgehalte verwacht wordt. Nochtans komt dit niet overeen met de bekomen meetresultaten. Appelsap bevat naast appelzuur echter nog andere zuren, waaronder citroenzuur en AA, die de pH kunnen beïnvloeden.

### 6.2.1.3 AA-gehalte

Het verloop van het AA-gehalte van de sappen gedurende een opslagperiode van zes maanden in BIB's bij een temperatuur van 5,5 °C wordt weergegeven in Figuur 32.

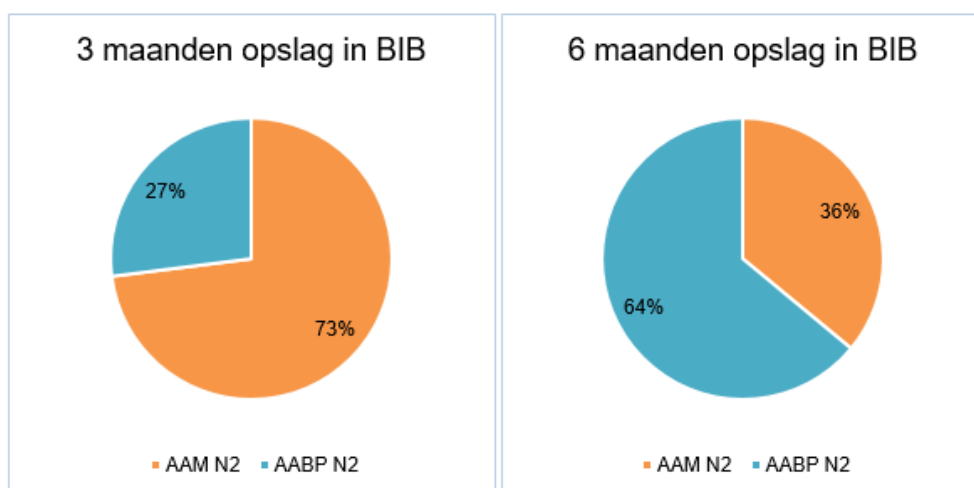


Figuur 32: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AABP N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C

Het AA-gehalte in het AABP N2-sap is lager dan in het AAM N2-sap. Dit is te wijten aan een hogere dosering van AA tijdens het productieproces aangezien bij de procesconditie AAM N2 meer aerobe AA-afbraak optreedt dan bij de procesconditie AABP N2. In Figuur 32 is tevens zichtbaar dat het AA-gehalte van beide sappen nagenoeg constant blijft gedurende zes maanden opslag in BIB's bij een opslagtemperatuur van 5,5°C. Er is slechts een zeer lichte daling in het AA-gehalte waarneembaar bij beide sappen. Deze daling van het AA-gehalte kan te wijten zijn aan de NEB. AA, DHA en hun eventueel gevormde afbraakproducten kunnen mogelijk verder reageren door deel te nemen aan de Maillard-reactie. Om deze hypothese te bevestigen, dient de kleur van de sappen gemeten te worden i.f.v. de tijd. De kleur van vruchtensappen kan onder andere gemeten worden via kleurkaarten. Het verlies aan AA kan ook veroorzaakt worden door anaerobe afbraak tot furfural. De grootste daling aan AA is zichtbaar bij het AAM N2-sap tussen drie en zes maanden opslag. Dit komt tevens overeen met de grotere pH-stijging die zichtbaar is bij het AAM N2-sap tussen drie en zes maanden opslag in de BIB.

### 6.2.2 Sensorische testen

Het resultaat van de voorkeurstest tussen de verse sappen, d.w.z. onmiddellijk na de productie, werden reeds besproken (zie 5.2.2.2). Hieruit bleek dat een lichte voorkeur (58%) bestond voor het AABP N2-sap. De resultaten van de voorkeurstesten na drie en zes maanden opslag in BIB's worden weergegeven in Figuur 33.



**Figuur 33: Resultaten sensorische voorkeurstesten tussen sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 na 3 en na 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C**

Het resultaat van de voorkeurstest tussen de sappen na drie maanden opslag in de BIB gaf aan dat de meerderheid van de proefpersonen, namelijk 73%, het AAM N2-sap prefereerde. Het AAM N2-sap bleek een zoetere smaak en een aangenaamere geur te hebben. Nochtans wordt het AABP N2-sap beschreven als een fris sap, waarschijnlijk vanwege zijn zure smaak.

Uit de voorkeurstest, uitgevoerd na zes maanden opslag in de BIB, bleek de voorkeur met 64% uit te gaan naar het AABP N2-sap omwille van zijn frissere, zuurdere smaak. Nochtans kreeg het AAM N2-sap een betere beoordeling wat betreft de geur van het sap.

De verandering van de voorkeur na drie en na zes maanden opslag kan verklaard worden door het feit dat bij het AAM N2-sap meer afbraakproducten, zoals furfural, gevormd worden die een nadelig effect uitoefenen op de sensorische eigenschappen van het sap. Dit wordt tevens bevestigd door de eerder besproken sterkere stijging van de pH en grotere daling van het AA-gehalte, die waargenomen worden bij het AAM N2-sap.

Om het resultaat van deze voorkeurstesten te bevestigen, kan het nuttig zijn om de uitgevoerde voorkeurstesten te herhalen. De voorkeur van een persoon kan namelijk verschillen van dag tot dag. Zo kan iemand de ene dag meer zin hebben in iets zoets en de andere dag in iets zuurder. Bovendien is het belangrijk dat gestandaardiseerde omstandigheden gehandhaafd worden, zoals een panel met dezelfde proefpersonen, in eenzelfde omgeving, op hetzelfde tijdstip van de dag, enz. [76], [86]. Om aan iedere sensorische test identiek dezelfde proefpersonen te laten deelnemen, is niet haalbaar vanwege parttimewerknemers en vanwege talloze sensorische testen die uitgevoerd moesten worden voor het realiseren van dit eindwerk.

### 6.3 Conclusie

De fysicochemische parameters van de sappen, waaronder de hoeveelheid opgeloste droge stof, de pH, het appelzuurgehalte en het AA-gehalte, ondergaan geen significante verandering gedurende zes maanden opslag in een BIB bij een temperatuur van 5,5 °C.

Uit de resultaten van de voorkeurstesten blijkt dat zowel onmiddellijk na de productie als na zes maanden opslag in een BIB de voorkeur uitgaat naar het sap waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank, terwijl na drie maanden opslag de meerderheid van de proefpersonen het

sap verkiest waarbij AA gedoseerd werd op de maalmolen. Verder onderzoek is dus nodig om een eenduidig besluit te vormen. Door het sap gedurende een langere periode te onderzoeken, zal een concreter besluit gevormd kunnen worden. Het kan namelijk zijn dat de voorkeurstest na negen maanden opslag in BIB's bij 5,5°C uitwijst dat de voorkeur voor het AABP N2-sap zich herhaald. Deze veronderstelling wordt gemaakt op basis van het feit dat bij het AAM N2-sap meer afbraakproducten gevormd worden die de sensorische eigenschappen van het sap nadelig beïnvloeden. Daarnaast kan het nuttig zijn om de reeds uitgevoerde voorkeurstesten te herhalen omdat de proefpersonen vaak niet consistent zijn wat betreft hun voorkeur.

## 7 Project 3: Bepaling ideale blend in fles

### 7.1 Proefopzet

Zoals reeds vermeld, wordt referentiesap (AAM N2) geproduceerd volgens het algemeen toegepast productieproces bij Konings NV. Aangezien dit sap ca. twee weken opgeslagen kan worden bij een temperatuur van 2°C in een niet-aseptische tank alvorens transport, wordt onderzoek uitgevoerd naar aseptische opslag van sap. Het doel van dit project is om na te gaan wat de impact is van het blenden van vers referentiesap met aseptisch opgeslagen sap op de kwaliteit van het sap tijdens veroudering. Het is de bedoeling dat deze blend zo goed mogelijk de sensorische eigenschappen van het referentiesap benadert.

Voor de ontwikkeling van de blends werd aseptisch opgeslagen sap gebruikt dat reeds zes maanden opgeslagen was in BIB's bij een temperatuur van 5,5°C. Er werden twee soorten blends gemaakt, enerzijds met aseptisch opgeslagen AAM N2-sap en anderzijds met aseptisch opgeslagen AABP N2-sap.

#### 7.1.1 Bepaling ideale blendsamenstelling

Er werden blends ontwikkeld met diverse concentraties aseptisch opgeslagen sap en referentiesap. Op deze manier werd onderzocht welke maximale hoeveelheid aseptisch opgeslagen sap met referentiesap ingeblend kon worden. De ideale blendsamenstelling werd bepaald a.d.h.v. sensorische driehoekstesten tussen de betreffende blend en het daarbij horende referentiesap. Voor beide blends werd een eerste driehoekstest uitgevoerd met een blend die 20% aseptisch opgeslagen sap en 80% vers referentiesap bevat. Wanneer uit de sensorische driehoekstest bleek dat een significant sensorisch verschil bestond tussen de blend en het referentiesap, werd het percentage aan aseptisch opgeslagen sap met 10% verlaagd en omgekeerd.

Daarnaast werd ook een fysicochemische analyse uitgevoerd op de blend en het overeenkomstige referentiesap. Er mogen namelijk geen grote verschillen optreden in hoeveelheid opgeloste droge stof, pH, appelzuurgehalte en AA-gehalte tussen de blend en het referentiesap.

#### 7.1.2 Verouderingsexperiment

Nadat de optimale blends bepaald werden, werd nagegaan hoe deze zich gedragen bij veroudering t.o.v. het referentiesap. Versnelde veroudering werd geïnduceerd door de stalen te stockeren in de eerder vermelde warmtekamer bij een temperatuur van 32°C (zie 5.1.2). Vooraleer de stalen in de warmtekamer geplaatst werden, werden ze gepasteuriseerd m.b.v. het automatisch pasteurisatietoestel en hot-fill afgevuld in glazen flessen. De stalen werden gedurende vijf weken opgevolgd.

##### 7.1.2.1 Fysicochemische analyse

Iedere week werden de stalen fysicochemisch geanalyseerd waarbij de hoeveelheid opgeloste droge stof, de pH, het appelzuurgehalte en het AA-gehalte gemeten werden.

##### 7.1.2.2 Sensorische testen

###### 7.1.2.2.1 Vergelijking blend AAM N2 en referentiesap

Naast de fysicochemische analyses werden wekelijks sensorische driehoekstesten uitgevoerd tussen de blend AAM N2 en het daarbij horende referentiesap. Indien een significant sensorisch verschil waargenomen werd tussen beide sappen, werd een voorkeurstest uitgevoerd om na te gaan welk sap de voorkeur krijgt na een bepaalde opslagperiode. Iedere

sensorische test werd uitgevoerd in de voorziene degustatieruimte en enkel het expertenpanel nam eraan deel.

#### 7.1.2.2.2 Vergelijking blend AABP N2 en referentiesap Analoog aan 7.1.2.2.1.

#### 7.1.2.2.3 Vergelijking blends

Tot slot werd na nul en na drie weken opslag in de warmtekamer bij 32°C een voorkeurstest uitgevoerd tussen beide blends onderling om na te gaan welke blend de voorkeur krijgt na een bepaalde opslagperiode. Hierbij wordt aan de proefpersonen gevraagd om een score (van nul tot vijf) te geven wat betreft de kleur, de geur, de smaak en de nasmaak van ieder sap. De bekomen resultaten worden statistisch verwerkt. Hierbij werden beide blends onderling na nul en na drie weken opslag in de warmtekamer met elkaar vergeleken.

Daarnaast werd ook nagegaan hoe iedere blend afzonderlijk zich gedraagt bij veroudering door de resultaten van iedere blend na nul weken opslag te vergeleken met deze na drie weken opslag in de warmtekamer.

Eerst werd een F-toets uitgevoerd om de spreiding op de meetresultaten te vergelijken. De standaardafwijking, ook standaarddeviatie genoemd, is een maat voor de spreiding van de meetresultaten [87]. Deze werd rechtstreeks berekend m.b.v. Excel.

De  $H_0$ -hypothese van de F-toets gaat ervan uit dat beide groepen dezelfde variantie (= kwadraat van standaardafwijking) hebben, daar waar de  $H_1$ -hypothese uitgaat van een verschillende variantie [87]. M.b.v. Excel werd de overschrijdingskans (P-waarde) berekend. Wanneer deze P-waarde groter is dan de vooropgestelde waarde ( $\alpha = 0,05$ ), dan wordt de  $H_0$ -hypothese behouden [87].

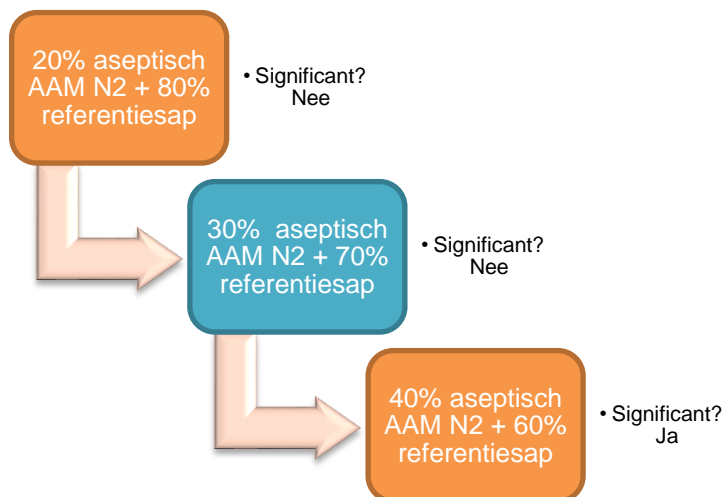
Hierna werd een T-toets uitgevoerd om na te gaan of een verschil bestaat tussen de gemiddelden. De  $H_0$ -hypothese van de T-toets wordt als volgt geformuleerd: "Beide groepen hebben hetzelfde gemiddelde en behoren tot dezelfde verdeling". De  $H_1$ -hypothese veronderstelt dan weer het tegenovergestelde [87]. Bij de uitvoering van de T-toets werd uitgegaan van een tweezijdige verdeling omdat nagegaan wordt of al dan niet een verschil aanwezig is tussen de sappen. De P-waarde van de T-toets werd opnieuw rechtstreeks berekend m.b.v. Excel. Indien deze waarde groter is dan de vooropgestelde waarde, dan moet de  $H_0$ -hypothese behouden blijven.



## 7.2 Resultaten en discussie

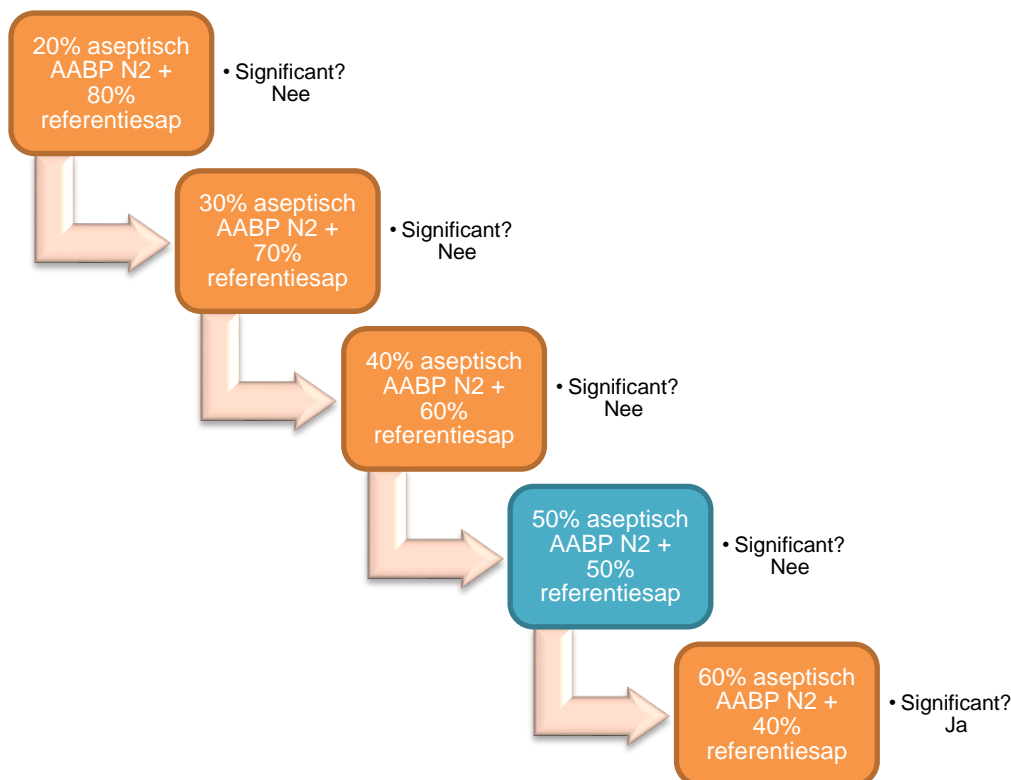
### 7.2.1 Bepaling ideale blendsamenstelling

De uitgevoerde driehoekstesten met hun overeenkomstige resultaat voor de blend met aseptisch AAM N2-sap worden weergegeven in Figuur 34 en deze voor de blend met AABP N2-sap in Figuur 35.



Figuur 34: Resultaat sensorische driehoekstesten voor bepaling blend AAM N2

Uit het resultaat van de eerste driehoekstest tussen de blend, die 20% aseptisch AAM N2-sap bevat, en het referentiesap bleek het sensorisch verschil niet significant te zijn. Het percentage aan aseptisch opgeslagen sap kon dus verhoogd worden naar 30%. Ook deze driehoekstest wees geen significantie uit. De driehoekstest waarbij de blend met 40% aseptisch AAM N2-sap vergeleken werd met het referentiesap resulteerde echter wel in een significant sensorisch verschil. De verdere verouderingstesten werden dus uitgevoerd met de blend die 30% aseptisch opgeslagen AAM N2-sap bevat.



**Figuur 35: Resultaat sensorische driehoekstesten voor bepaling blend AABP N2**

Voor de bepaling van de optimale blendsamenstelling met het aseptisch opgeslagen sap waarbij AA gedoseerd werd op de buffertank, waren meerdere driehoekstesten vereist om de optimale blendsamenstelling te bekomen. Uit de driehoekstest met de blend die 20% AABP N2-sap bevat, bleek geen significant sensorisch verschil aanwezig te zijn tussen de blend en het referentiesap. Vervolgens werden driehoekstesten uitgevoerd met sap dat 30, 40, 50 en 60% aseptisch AABP N2-sap bevat. Uiteindelijk werd geconcludeerd dat toevoeging van 50% aseptisch AABP N2-sap het hoogst mogelijk percentage is opdat geen significant sensorisch verschil bestaat tussen de blend en het referentiesap. Deze blend werd dan ook gebruikt voor de verdere verouderingstesten.

Het feit dat bij het AABP N2-sap meer aseptisch opgeslagen sap met referentiesap ingeblend kon worden, wordt verklaard doordat bij de procesconditie AAM N2 meer afbraakproducten van AA gevormd worden tijdens het productieproces in vergelijking met de procesconditie AABP N2. Omdat AA later gedoseerd wordt bij de procesconditie AABP N2, krijgt AA minder tijd om te oxideren en afbraakproducten te vormen die een negatieve invloed uitoefenen op de sensorische eigenschappen van het sap.

Uit de resultaten van de fysicochemische analyse van de blends en de bijhorende referentiesappen bleken geen opmerkelijke verschillen aanwezig te zijn. De afwijkingen zijn dan ook te wijten aan fouten van de meetinstrumenten en menselijke handelingen.

## 7.2.2 Verouderingsexperiment

### 7.2.2.1 Fysicochemische analyse

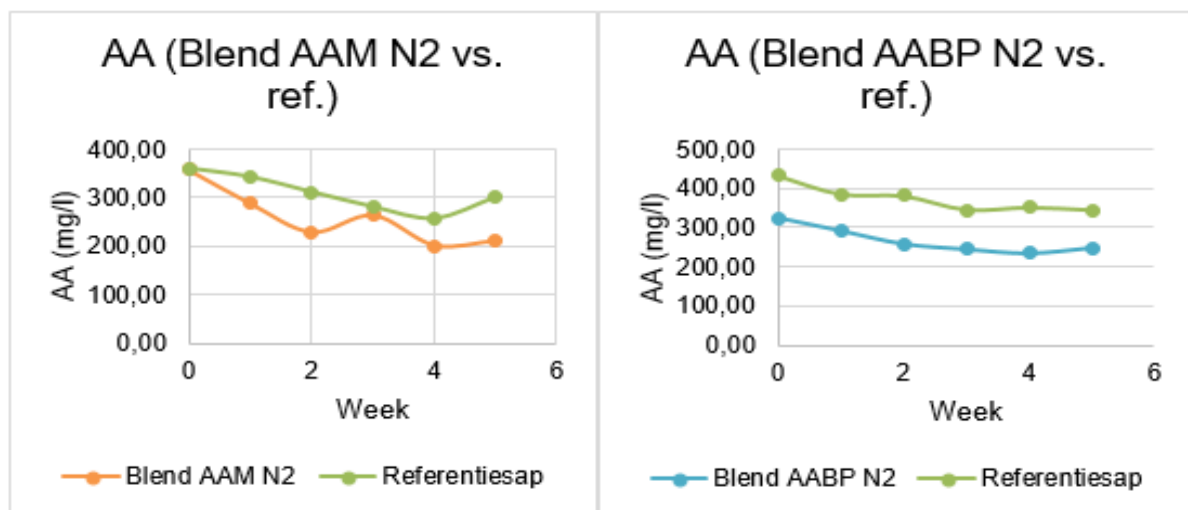
De bekomen meetresultaten worden weergegeven in bijlage D.

#### 7.2.2.1.1 Hoeveelheid opgeloste droge stof, pH en appelzuurgehalte

De fysicochemische parameters, waaronder het gehalte aan opgeloste droge stof, de pH en het appelzuurgehalte van zowel de blends als het daarbij horende referentiesap vertonen geen significante verandering gedurende vijf weken opslag in de warmtekamer bij 32°C.

#### 7.2.2.1.2 AA-gehalte

Het AA-gehalte van de blends en het daarbij horende referentiesap gedurende vijf weken opslag in de warmtekamer bij een temperatuur van 32°C wordt weergegeven in Figuur 36.



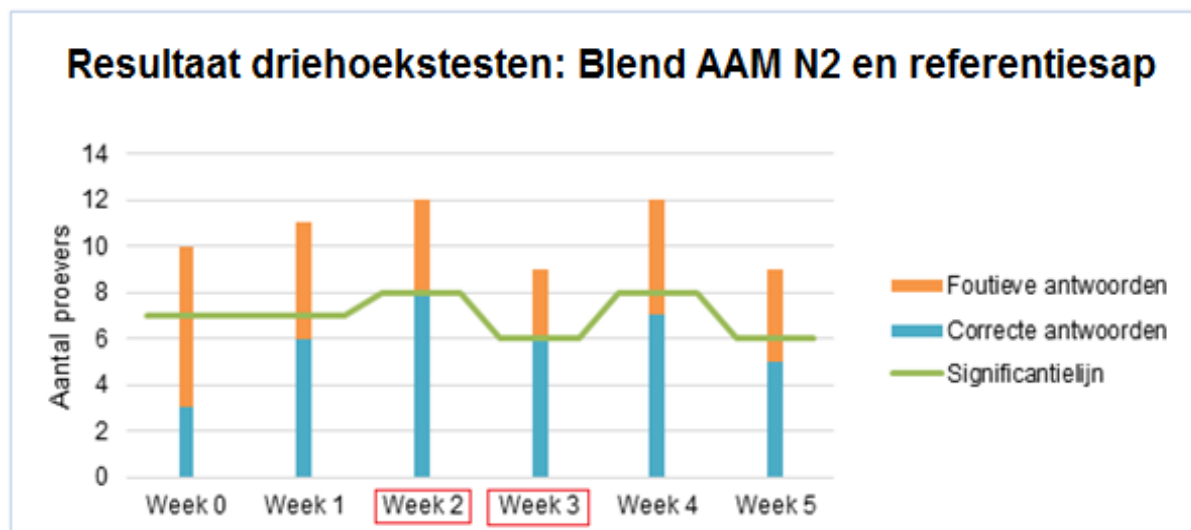
Figuur 36: AA-gehalte van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap (links) en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap (rechts) gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Het gehalte aan AA van elk sap neemt wekelijks lichtjes af. Zowel de NEB als de anaerobe (en aerobe) afbraak kunnen leiden tot een daling van het AA-gehalte (zie 5.2.2.1.3). De lichte stijging die zichtbaar is bij het AAM N2-sap na vier weken opslag in de warmtekamer kan te wijten zijn aan een menselijke handelingsfout. Het AA-gehalte werd namelijk gemeten m.b.v. een jodometrische titratie waarbij de kans bestaat dat de titratie niet altijd beëindigd wordt bij dezelfde kleuromslag.

### 7.2.2.2 Sensorische testen

#### 7.2.2.2.1 Vergelijking blend AAM N2 en referentiesap

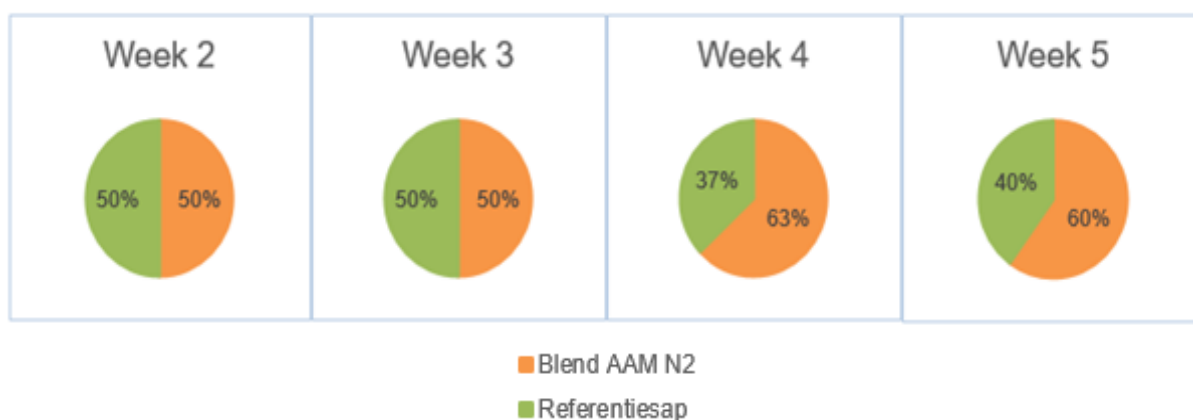
In Figuur 37 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van alle sensorische driehoekstesten, die wekelijks uitgevoerd werden tijdens het verouderingsexperiment.



Figuur 37: Overzicht van sensorische driehoekstesten tussen blend AAM N2 en daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

In het histogram wordt a.d.h.v. een rode kader weergegeven welke driehoekstesten significantie uitwezen. Na twee en drie weken opslag in de warmtekamer bleek een significant sensorisch verschil aanwezig te zijn tussen de blend en het referentiesap. Tussen nul en twee weken opslag in de warmtekamer werd het referentiesap gekarakteriseerd met een schilsmmaak. Vanaf drie weken opslag werd dit door de meeste proefpersonen (67%) ervaren als een verouderde, waterige smaak.

Aangezien na twee en drie weken opslag in de warmtekamer de blend significant sensorisch verschilde van het referentiesap, werden voorkeurstesten uitgevoerd tussen de blend en het referentiesap (zie Figuur 38).



Figuur 38: Resultaat voorkeurstesten tussen blend AAM N2 en daarbij horend referentiesap na 2, 3, 4 en 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Uit beide testen bleek geen voorkeur aanwezig te zijn (50%-50%). Het referentiesap werd echter beschreven als een frisser sap, ondanks zijn verouderde smaak. Daarnaast heeft het referentiesap een beter appelaroma t.o.v. de blend.

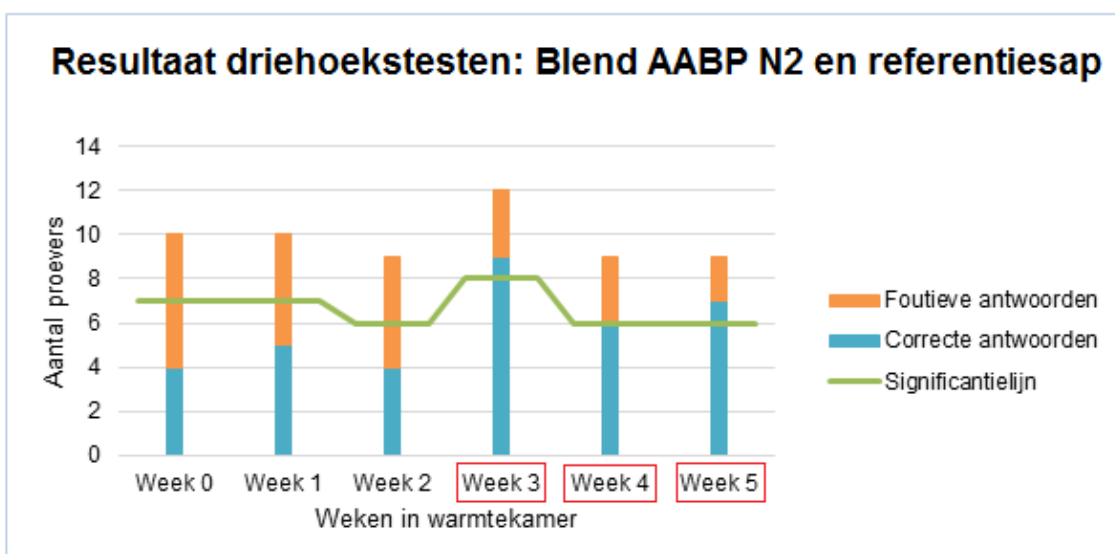
Het significant sensorisch verschil dat bestaat tussen de blend en het referentiesap na twee en drie weken opslag in de warmtekamer is echter zodanig klein dat één proefpersoon het verschil kan maken. Daarom wordt het aangeraden om de sensorische driehoekstesten uit te voeren met zo veel mogelijk proefpersonen en wordt ook best een herhaling van deze sensorische testen uitgevoerd om de bekomen resultaten te bevestigen. Wegens tijdsgebrek was dit echter niet mogelijk.

Omdat het niet logisch is dat na vier en vijf weken opslag in de warmtekamer geen significant verschil bestaat tussen de blend en het referentiesap, werden alsnog voorkeurstesten uitgevoerd. Uit de voorkeurstest tussen de blend en het referentiesap na vier weken opslag in de warmtekamer bleek echter een lichte voorkeur (63%) aanwezig te zijn voor de blend. De blend werd gekenmerkt door een betere zoet-zuurverhouding, terwijl het referentiesap bestempeld werd met een niet fruitige, onrijpe smaak. Nochtans krijgt het referentiesap wel de voorkeur wat betreft de kleur van het sap. Deze beoordelingen kunnen verklaard worden doordat het gehalte aan opgeloste droge stof van de blend na drie weken opslag in de warmtekamer een lichte daling vertoont, daar waar deze van het referentiesap constant blijft. De lichte daling in het gehalte aan opgeloste droge stof van de blend kan te wijten zijn aan het optreden van de Maillard-reactie, waarbij suikers reageren met aminozuren ter vorming van bruine pigmenten, de melanoïdinen (zie 2.3.2.2.1). Dit wordt tevens bevestigd door de voorkeur voor de lichtere kleur van het referentiesap.

De voorkeurstest tussen de blend en het referentiesap na vijf weken opslag in de warmtekamer geeft aan dat de voorkeur voor de blend zich herhaalt. 60% van de proefpersonen verkiest namelijk de blend vanwege zijn aangenaamere smaak.

#### 7.2.2.2.2 Vergelijking blend AABP N2 en referentiesap

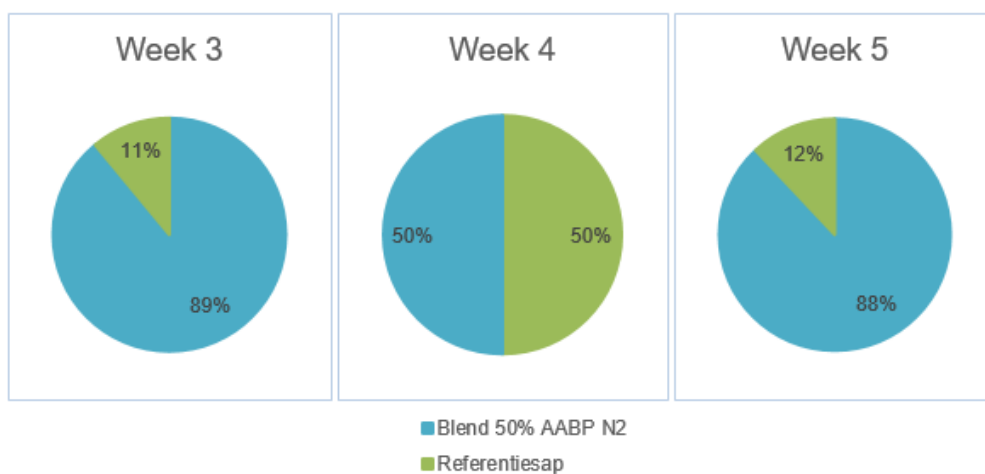
In Figuur 39 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van alle driehoekstesten tussen de blend AABP N2 en het referentiesap, die uitgevoerd werden tijdens het verouderingsexperiment.



**Figuur 39: Overzicht van sensorische driehoekstesten tussen blend AABP N2 en daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C**

De sensorische driehoekstesten die een significant verschil aantoonde tussen de blend en het referentiesap worden in het histogram opnieuw aangeduid m.b.v. een rode kader. Na drie, vier en vijf weken opslag in de warmtekamer bij 32°C werd een significant sensorisch verschil tussen de sappen vastgesteld. Het referentiesap had een afwijkende, ongewenste geur en een verouderde, onfris smaak. Aangezien geen opvallende veranderingen waargenomen worden uit de resultaten van de fysicochemische analyse van de blend en het referentiesap na drie weken opslag in de warmtekamer, kan dit resultaat berusten op toeval. Een sensorische test wordt namelijk sterk beïnvloedt door menselijke gedragingen waarbij vermoeidheid, irritatie en gewenning een belangrijke rol spelen [76], [86]. Om een zo betrouwbaar mogelijk resultaat op te leveren, wordt aangeraden om de driehoekstest te herhalen. Wegens tijdsgebrek was dit echter niet haalbaar.

Aangezien vanaf drie weken opslag in de warmtekamer bij een temperatuur van 32°C significantie waargenomen werd, werden voorkeurstesten uitgevoerd (zie Figuur 40).



**Figuur 40: Resultaat voorkeurstesten tussen blend AABP N2 en daarbij horend referentiesap na 3, 4 en 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C**

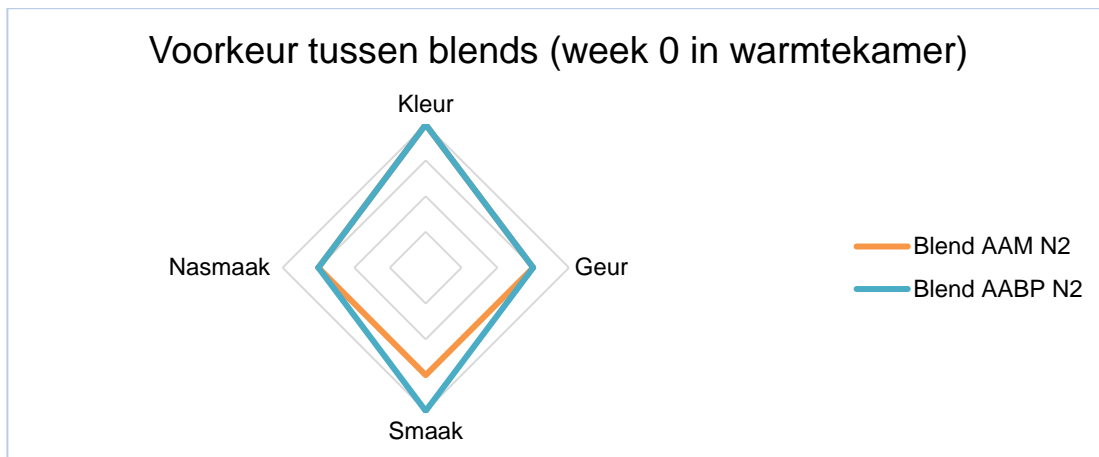
Uit de sensorische test na drie weken opslag in de warmtekamer bleek een uitgesproken voorkeur (89%) voor de blend. De blend zou een frissere, zoetere smaak en tevens een aangener aroma bevatten, terwijl het referentiesap een verouderde smaak en een minder gewenste geur vertoont. Het aseptisch opgeslagen sap, dat gebruikt werd voor het ontwikkelen van de blends, werd geperst tijdens het oogstseizoen. Tijdens het oogstseizoen hebben appels de beste kwaliteit, wat resulteert in een kwalitatief beter sap, vandaar de voorkeur voor de blend.

Uit de voorkeurstest na vier weken opslag in de warmtekamer bleek geen voorkeur aanwezig te zijn (50%-50%).

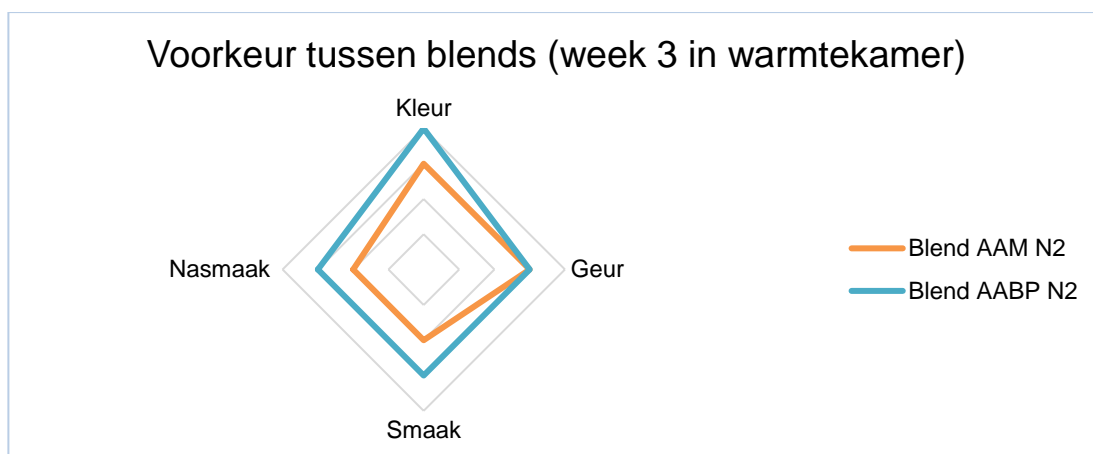
De voorkeurstest na vijf weken opslag in de warmtekamer resulteerde echter opnieuw in een uitgesproken voorkeur (88%) voor de blend AABP N2, omwille van zijn frissere, zuurdere smaak. Beiden sappen werden daarentegen wel bestempeld als verouderd.

#### 7.2.2.2.3 Vergelijking blends

De resultaten van de voorkeurstest tussen de blends onderling zowel na nul als na drie weken opslag in de warmtekamer worden weergegeven in bijlage D. Figuur 41 toont het radardiagram van de voorkeurstest tussen de blends na nul weken opslag in de warmtekamer en Figuur 42 deze na drie weken opslag in de warmtekamer.



Figuur 41: Radardiagram: Voorkeur tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C



Figuur 42: Radardiagram: Voorkeur tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Zowel na nul weken opslag als na drie weken opslag in de warmtekamer gaat de algemene voorkeur uit naar de blend AABP N2. Deze blend blijkt naast een betere geur en kleur, een frissere en fruitigere smaak te hebben dan de blend AAM N2. Deze laatste blend werd dan ook gekarakteriseerd door een schillige, verouderde smaak en een minder aangename geur. Dit kan verklaard worden door het feit dat wanneer AA later gedoseerd wordt in het productieproces, d.w.z. op de buffertank i.p.v. op de maalmolen, AA minder tijd krijgt om via aerobe degradatie afbraakproducten te vormen die een negatief effect uitoefenen op de organoleptische eigenschappen van het sap.

De resultaten van de statistische verwerking van de sensorische voorkeurstesten, waarbij acht proefpersonen een score (van nul tot vijf) moesten opgeven wat betreft de kleur, de geur, de smaak en de nasmaak van het sap, na nul weken opslag in de warmtekamer worden weergegeven in Tabel 3 en na drie weken opslag in de warmtekamer in Tabel 4.

Tabel 3: Statistische verwerking van resultaten van beide blends na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Gem. blend AAM N2 (week 0)	St. afw.	Gem. blend AABP N2 (week 0)	St. afw.	P-waarde F-toets	P-waarde T-toets
<b>Kleur</b>	3,750	0,707	4,250	0,463	0,286	0,116
<b>Geur</b>	3,375	0,916	3,375	0,744	0,596	1,000
<b>Smaak</b>	3,375	0,744	3,625	0,916	0,596	0,559
<b>Nasmaak</b>	3,125	1,356	3,000	0,756	0,146	0,823

Tabel 4: Statistische verwerking van resultaten van beide blends na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Gem. blend AAM N2 (week 3)	St. afw.	Gem. blend AABP N2 (week 3)	St. afw.	P-waarde F-toets	P-waarde T-toets
<b>Kleur</b>	3,000	0,926	3,625	0,744	0,578	0,159
<b>Geur</b>	2,750	1,035	3,375	0,916	0,756	0,222
<b>Smaak</b>	2,125	1,126	3,250	1,035	0,830	0,056
<b>Nasmaak</b>	2,250	1,165	3,125	1,126	0,931	0,149

In bovenstaande tabellen wordt het gemiddelde van de sensorische scores van iedere eigenschap weergegeven na nul en drie weken opslag in de warmtekamer. Daarnaast wordt de bekomen standaardafwijking en P-waarden van respectievelijk de F-toets en de T-toets weergegeven.

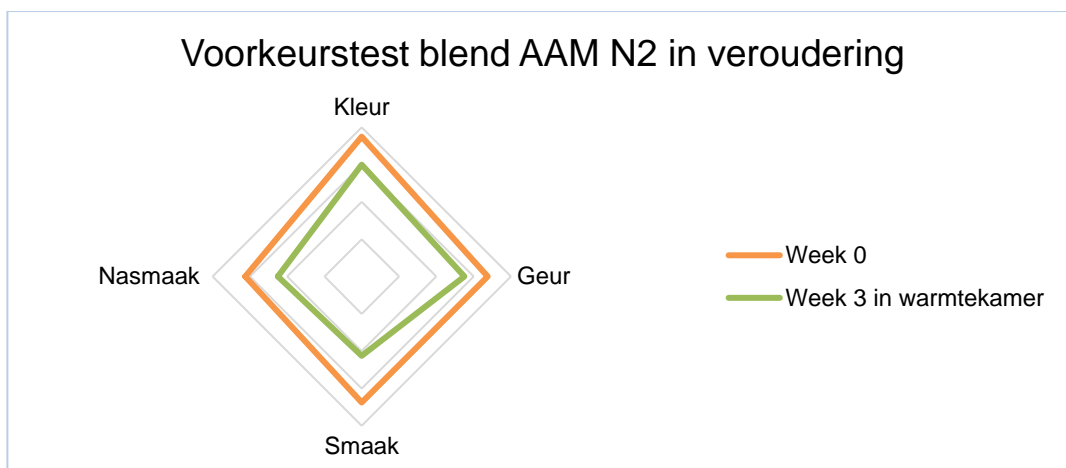
Aangezien iedere P-waarde van de F-toets groter is dan 0,05, kan de  $H_0$ -hypothese behouden blijven. Er kan dus geconcludeerd worden dat de blends onderling, zowel na nul weken als na drie weken opslag in de warmtekamer, geen significant verschillende variantie hebben. Dat betekent dus dat de verschillen tussen de scores van iedere eigenschap bij iedere blend afzonderlijk, niet significant verschillen t.o.v. de andere blend.

Aangezien de F-toets uitwees dat beide blends, zowel na nul als na drie weken, geen significant verschillende variantie hebben, werd een T-toets uitgevoerd tussen twee steekproeven met gelijke variantie. Elke P-waarde van de T-toets was groter dan het betrouwbaarheidsniveau  $\alpha$ . Dat betekent dat de  $H_0$ -hypothese behouden mag blijven en dat de gemiddelden van beide groepen gelijk zijn.

Uit de voorkeurstest blijkt echter toch een voorkeur te bestaan voor de blend AABP N2. Nochtans kan niet statistisch bewezen worden dat er ook daadwerkelijk een verschil is tussen beide blends. Daarvoor zouden nogmaals testen uitgevoerd moeten worden, maar dan met meerdere proefpersonen.

Daarnaast wordt nagegaan of een significant verschil bestaat tussen de blends in veroudering. De resultaten van iedere blend na nul weken opslag in de warmtekamer worden hiervoor vergeleken met deze na drie weken opslag. De resultaten van blend AAM N2 worden weergegeven in het radardiagram in Figuur 43 en in Tabel 5. De resultaten van AABP N2 in het radardiagram in Figuur 44 en Tabel 6.





Figuur 43: Radardiagram: Voorkeur blend AAM N2 na 0 weken en 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

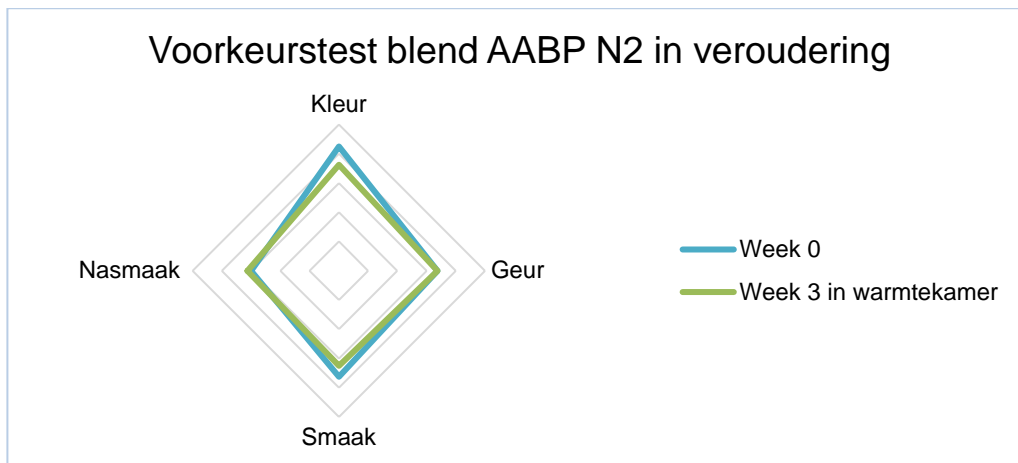
Tabel 5: Statistische verwerking van resultaten van blend AAM N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Gem. blend AAM N2 (week 0)	St. afw.	Gem. blend AAM N2 (week 3)	St. afw.	P-waarde F-toets	P-waarde T-toets
<b>Kleur</b>	3,750	0,707	3,000	0,926	0,494	0,111
<b>Geur</b>	3,375	0,916	2,750	1,035	0,756	0,217
<b>Smaak</b>	3,375	0,744	2,125	1,126	0,297	0,019
<b>Nasmaak</b>	3,125	1,356	2,250	1,165	0,698	0,087

Aangezien iedere P-waarde van de F-toets groter is dan het betrouwbaarheidsniveau  $\alpha$ , dient de  $H_0$ -hypothese behouden te blijven. De blend AAM N2 na nul weken opslag en na drie weken opslag in de warmtekamer hebben geen significant verschillende variantie. De verschillen tussen de scores van iedere eigenschap na nul weken verschillen dus niet significant van deze na drie weken opslag in de warmtekamer bij 32°C.

Vervolgens werd een gepaarde T-toets uitgevoerd omdat het gaat om dezelfde blends, enkel na een verschillende opslagtermijn. Uit de bekomen P-waarden van de T-toets kan besloten worden dat de blend AAM N2 geen significant verschil vertoonde tussen nul weken en drie weken opslag in de warmtekamer wat betreft de kleur, de geur en de nasmaak. De smaak blijkt echter wel significant veranderd te zijn na drie weken opslag in de warmtekamer. Uit de sensorische voorkeurstest werd het referentiesap zowel na nul als na drie weken gekenmerkt door een schilsmak. Na drie weken bleek het sap echter wel een verouderde smaak te hebben. Dit kan te wijten zijn aan anaerobe afbraak van AA tot componenten die de smaak van het sap nadelig beïnvloeden, zoals furfural (zie 2.3.1.2).

Uit het radardiagram (Figuur 43) van de voorkeurstest tussen de blend AAM N2 na nul en na drie weken opslag in de warmtekamer blijkt echter een duidelijke voorkeur aanwezig te zijn voor de blend AAM N2 na nul weken opslag in de warmtekamer. Statistisch kan enkel een significant verschil bewezen worden wat betreft de smaak tussen de blend na nul en na drie weken opslag in de warmtekamer. Het is dus nodig om deze voorkeurstest te herhalen met meerdere proefpersonen.



Figuur 44: Radardiagram: Voorkeur blend AABP N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Tabel 6: Statistische verwerking van resultaten van blend AABP N2 na 0 en na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Gem. blend AABP N2 (week 0)	St. afw.	Gem. blend AABP N2 (week 3)	St. afw.	P-waarde F-toets	P-waarde T-toets
<b>Kleur</b>	4,250	0,463	3,625	0,744	0,234	0,049
<b>Geur</b>	3,375	0,744	3,375	0,916	0,596	1,000
<b>Smaak</b>	3,625	0,916	3,250	1,035	0,756	0,549
<b>Nasmaak</b>	3,000	0,756	3,125	1,126	0,315	0,802

Aangezien iedere P-waarde van de F-toets groter is dan 0,05, dient de  $H_0$ -hypothese behouden te blijven en vertoont de blend AABP N2 na nul weken opslag geen significant verschillende variantie met deze na drie weken opslag in de warmtekamer.

De hierop volgende gepaarde T-toets wees uit dat de geur, de smaak en de nasmaak van de blend AABP N2 niet significant veranderen na drie weken opslag in de warmtekamer. De kleur blijkt echter wel significant veranderd te zijn na drie weken opslag. Om dit te bevestigen zou de kleur gemeten moeten worden in functie van de tijd.

Statistisch kan dus enkel bewezen worden dat de kleur significant verandert na drie weken opslag in de warmtekamer. Uit het radardiagram (Figuur 44) bleek geen uitgesproken voorkeur voor de blend AABP N2 na nul en na drie weken opslag in de warmtekamer. Op het radardiagram is echter wel zichtbaar dat de grootste verandering in functie van de tijd optreedt bij de kleur.

### 7.2.3 Conclusie

Aangezien minder ongewenste oxidatieproducten aanwezig zijn in sap afkomstig van de procesconditie AABP N2 doordat AA minder tijd krijgt om te oxideren, kan bij de blend AABP N2 50% aseptisch opgeslagen sap ingeblend worden met referentiesap. De blend AAM N2 kan maximaal 30% aseptisch opgeslagen sap bevatten zonder dat een significant sensorisch verschil opgemerkt wordt tussen de blend en het referentiesap.

Uit de verouderingstesten bleek dat het AA-gehalte van zowel de blends als het daarbij horende referentiesap wekelijks met een kleine hoeveelheid afneemt. Deze daling is te wijten

aan NEB, anaerobe en aerobe AA-afbraak, die optreden tijdens de opslagperiode. De overige fysicochemische parameters, waaronder de hoeveelheid opgeloste droge stof, de pH en het appelzuurgehalte, bleven echter wel constant tijdens de volledige opslagperiode.

Uit de sensorische driehoekstesten tussen de blends en de daarbij horende referentiesappen, die uitgevoerd werden tijdens het verouderingsexperiment, kon besloten worden dat beide blends zich sensorisch hetzelfde gedragen in vergelijking met het overeenkomstige referentiesap.

Uit de sensorische voorkeurstesten waarbij de blends vergeleken worden met hun verouderde versie blijkt dat de blend AABP N2 zich sensorisch stabiel gedraagt dan de blend AAM N2. Bij de blend AAM N2 is namelijk een uitgesproken voorkeur aanwezig voor de blend na nul weken opslag, terwijl geen voorkeur bestaat tussen de blend AABP N2 na nul en deze na drie weken opslag in de warmtekamer bij 32°C. Dit kan verklaard worden door het feit dat bij het AABP N2-sap minder afbraakproducten gevormd werden in het sap die de organoleptische eigenschappen ervan nadelig beïnvloeden.



## 8 Algemene conclusie

Toevoeging van AA aan de buffertank i.p.v. dosering op de maalmolen, geeft aanleiding tot een stabielere sap. Dit blijkt enerzijds uit de fysicochemische analyses, die uitgevoerd werden tijdens het verouderingsexperiment bij de optimalisatie van het productieproces om sap aseptisch op te slaan. Het resultaat van de wekelijks uitgevoerde sensorische voorkeurstesten tussen de verouderde sappen van de procescondities, waarbij AA gedoseerd werd eenmaal op de maalmolen en andermaal op de buffertank, bevestigde anderzijds dat na veroudering de voorkeur uitgaat naar het sap waarbij AA gedoseerd wordt op de buffertank.

Wat betreft de maximale opslagperiode van aseptisch opgeslagen sap in BIB's kan geen concreet besluit gevormd worden. De fysicochemische analyses geven nochtans aan dat het sap zich stabiel gedraagt gedurende zes maanden opslag in de BIB's. De voorkeurstesten duiden dan weer geen bepaalde voorkeur aan. Het sap dient daarom gedurende een langere opslagperiode fysicochemisch en sensorisch opgevolgd te worden.

Het inblenden van aseptisch opgeslagen sap met referentiesap heeft een positieve impact op de kwaliteit van het sap tijdens veroudering. Uit de wekelijks uitgevoerde fysicochemische analyses bleek dat zowel de blends als de daarbij horende referentiesappen zich analoog gedragen in de tijd. De sensorische voorkeurstesten tonen echter aan dat na een opslagperiode van twee weken in de warmtekamer bij een temperatuur van 32°C, wat overeenkomt met zes weken bij kamertemperatuur, de voorkeur uitgaat naar de blends. Dit wordt verklaard doordat de blends aseptisch opgeslagen sap bevatten dat geperst werd tijdens het oogstseizoen. Tijdens het oogstseizoen hebben de appels namelijk de beste kwaliteit. De blend AABP N2 blijkt zich bovendien stabiel te gedragen dan de blend AAM N2, wat verklaard kan worden door de vorming van afbraakproducten in het AAM N2-sap tijdens het productieproces en de opslagperiode die een nadelig effect uitoefenen op de organoleptische eigenschappen van het appelsap.



## Bibliografie

- [1] J. E. Lozano, *Fruit Manufacturing*, United States of America: Springer , 2006.
- [2] E. Kupferman, „Controlled atmosphere storage of apples and pears,” Tree fruit research and extension center, Washington State University , 2001.
- [3] C. Fagundes, B. A. M. Carciofi en A. R. Monteiro, „Estimate of respiration rate and physicochemical changes of fresh-cut apples stored under different temperatures,” *Food Science and Technology*, vol. 1, nr. 33, pp. 60-67, 2013.
- [4] J. A. Bartz en J. K. Brecht, *Postharvest physiology and pathology of vegetables*, Florida: Marcel Dekker, 2003.
- [5] M. Meyers, *Biochemie: Metabolismen [cursus]*, Diepenbeek: UHasselt, 2017.
- [6] W. H. Root en D. M. Barrett, *Apples and apple processing*, CRC Press LLC , 2005.
- [7] A. Records en K. Sutherland, „The decanter centrifuge,” in *Decanter Centrifuge Handbook*, Elsevier Advanced Technology, 2001, pp. 2-3.
- [8] G. R. Bell, D. D. Symons en J. R. Pearse, „Mathematical model for solids transport power in a decanter centrifuge,” *Chemical Engineering Science*, nr. 107, pp. 114-122, 2014.
- [9] M. Buntinx, *Conditioneringstechnieken [cursus]*, Diepenbeek: UHasselt, 2016.
- [10] J. Raso, M. L. Calderon, M. Gongora, G. B. Canovas en B. G. Swanson, „Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields,” *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, nr. 31, pp. 668-672, 1998.
- [11] S. Aguilar-Rosas, M. Ballinas-Casarrubias, G. Nevarez-Moorillon, O. Martin-Belloso en E. Ortega-Rivas, „Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: effects on physicochemical properties and flavou compounds,” *Journal of Food Engineering*, pp. 1-6, 2007.
- [12] H. S. Burdurlu en F. Karadeniz, „Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates,” *Food Chemistry*, nr. 80, pp. 91-97, 2003.
- [13] Y. Liu , X. Song Hu, X. Yan Zhao en C. Zhang, „Inactivation of polyphenol oxidase from watermelon juice by high pressure carbon dioxide treatment,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 2, nr. 50, pp. 317-324, 2013.
- [14] A. Suarez-Jacobo, J. Saldo, R. Gervilla, C. E. Rufer, B. Guamis en A. X. Roig-Sagués, „Aseptically packaged UHPH-treated apple juice: Safety and quality parameters during storage,” *Journal of Food Engineering*, nr. 109, pp. 291-300, 2012.

- [15] C. D. Zook, M. E. Parish, R. J. Braddock en M. O. Balaban, „High pressure inactivation kinetics of *saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices,” *Journal of Food Science*, nr. 64, pp. 533-535, 1999.
- [16] F. Noci, J. Riener, M. Walkling-Ribeiro, D. Cronin, D. Morgan en J. Lyng, „Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice,” *Journal of Food Engineering*, nr. 85, pp. 141-146, 2007.
- [17] G. A. Evrendilek, Z. Jin, K. Ruhlman, X. Qiu, Q. Zhang en E. Richter, „Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, nr. 1, pp. 77-86, 2000.
- [18] H. Vega-Mercado , M. M. Gongora-Nieto, G. V. Barbosa-Canvas en B. G. Swanson, *Handbook of food preservation*, Oxford: Taylor & Francis Group, 2007.
- [19] E. P. Black, P. Setlow, A. D. Hocking, C. M. Stewart, A. L. Kelly en D. G. Hoover, „Response of spores to high-pressure processing,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, nr. 6, pp. 103-119, 2007.
- [20] V. Ferragut, M. Hernandez-Herrero , M. T. Veciana-Nogues, M. Borrás-Suarez, J. Gonzalez-Linares, M. C. Vidal-Carou en B. Guamis , „Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics,” *Society of Chemical Industry*, nr. 95, pp. 953-961, 2015.
- [21] T. R. Graumlich, J. E. Marcy en J. Adams, „Aseptically packaged orange juice and concentrate: A review of the influence of processing and packaging conditions on quality,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , nr. 34, pp. 402-405, 1986.
- [22] M. Ansari en A. Datta, „An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems,” *ICHEME*, nr. 81, pp. 57-65, 2003.
- [23] WFLO , „Fruit juice, Citrus juice,” WFLO, Florida, 2008.
- [24] A. Lopez-Gomez, M. Ros-Chumillas en Y. Y. Belisario-Sanchez, „Packaging and the Shelf Life of Orange Juice,” *Food Engineering and Agricultural Equipment Department*, pp. 179-198, 2010.
- [25] J. R. David, R. H. Graves en T. Szemplenski, *Handbook of Aseptic Processing and Packaging*, CRC Press , 2013.
- [26] C. M. Lopes en M. I. Felisberti, „Composite of low density polyethylene and aluminum obtained from the recycling of postconsumer aseptic packaging,” *Journal of Applied Polymer Science*, nr. 101, pp. 3183-3191, 2006.
- [27] S. K. Group, „Smurfit Kappa,” Smurfit Kappa Group, 2017. [Online]. Available: [http://www.smurfitkappa.com/vHome/be-nl/Products/Paginas/BaginBox\\_BIB.aspx](http://www.smurfitkappa.com/vHome/be-nl/Products/Paginas/BaginBox_BIB.aspx). [Geopend 21 Maart 2017].



- [28] Netpak, „Netpak,” Netpak, [Online]. Available: <http://netpak.com/en/bag-in-box/>. [Geopend 21 Maart 2017].
- [29] Y. Han, A. M. Guentert, R. S. Smith, R. H. Linton en P. E. Nelson, „Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage,” *Food Microbiology*, nr. 16, pp. 53-61, 1999.
- [30] S. P. Kidd, Stress response in pathogenic bacteria, Australia: CABI, 2011.
- [31] L. N. Bouman, J. A. Bernards en H. Boddeke, Medische fysiologie, Houten : Springer, 2008.
- [32] A. Begic-Akagic, N. Spaho, F. Gasi, P. Drkenda, A. Vranac , M. Meland en B. Salkic, „Sugar and organic acid profiles of the traditional and international apple cultivars for processing,” *Journal of Hygienic Engineering and Design*, pp. 190-196.
- [33] R. Riekstina-Dolge, Z. Kruma, D. Karklina en F. Dimins, „Physical-chemical parameters of latvian apple juices and their suitability for cider production,” *Food and Biotechnological Engineering*, nr. 8, pp. 263-267, 2014.
- [34] Onder Glas, Fotosynthese: de basis van alle productie, 19-21: Onder Glas, 2008.
- [35] C. W. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. Plata-Oviedo en R. M. Peralta, „Phenolic compounds in fruits – an overview,” *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 1-22, 2012.
- [36] H.-D. Belitz, W. Grosch en P. Schieberle, Food Chemistry, Germany : Springer, 2009.
- [37] D. Tanrioven en A. Eksi, „Phenolic compounds in pear juice from different cultivars,” *Food Chemistry*, nr. 93, pp. 89-93, 2005.
- [38] A. Gliszczynska-Swiglo en B. Tyrakowska, „Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity,” *Journal of Food Science*, nr. 68, pp. 1844-1849, 2003.
- [39] A. Hopia en M. Heinonen, „Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate,” *AOCS Press*, vol. 1, nr. 76, pp. 139-144, 1999.
- [40] L. Suntornsuk, W. Gritsanapun, S. Nilkamhank en A. Paochom, „Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, nr. 28, pp. 849-855, 2002.
- [41] LabChem, „Ascorbic Acid Safety Data Sheet,” LabChem , 2012.
- [42] H. S. Burdurlu, N. Koca en F. Karadeniz, „Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage,” *Journal of Food Engineering* , pp. 1-6, 2006.
- [43] I. Klimczak, M. Malecka, M. Szlachta en A. Gliszczynska-Swiglo, „Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices,” *Journal of Food Composition and Analysis* , pp. 60-967, 2007.

- [44] E. G. Ball, „Studies on oxidation-reduction ascorbic acid,” *The Journal of Biological Chemistry*, nr. 118, pp. 219-239, 1937.
- [45] F. O. Silva, „Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography,” *Food Control*, nr. 16, pp. 55-58, 2005.
- [46] U. o. Canterbury, „Determination of vitamin C concentration by titration,” University of Canterbury, Christchurch.
- [47] A. D. Caro, A. Piga, V. Vacca en M. Agabbio, „Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage,” *Food Chemistry*, nr. 84, pp. 99-105, 2004.
- [48] J.-P. Yuan en F. Chen, „Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC dual detection,” *Food Chemistry*, nr. 64, pp. 423-427, 1999.
- [49] M. C. Sanchez-Mata, M. Camara-Hurtado, C. Diez-Marques en M. E. Torija-Isasa, „Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans,” *European Food Research and Technology*, nr. 210, pp. 220-225, 2000.
- [50] C. Ratti, „Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review,” *Journal of Food Engineering*, nr. 49, pp. 311-319, 2001.
- [51] S. S. Bharate en S. B. Bharate, „Non-enzymatic browning in citrus juice: chemical markers, their detection and ways to improve product quality,” *Journal of Food Science and Technology*, nr. 51, pp. 2271-2288, November 2014.
- [52] J.-P. Yuan en F. Chen, „Degradation of ascorbic acid in aqueous solution,” *Journal of agriculture food chemicals*, nr. 46, pp. 5078-5082, 1998.
- [53] Y. Corvis, M.-C. Menet, P. Négrier, M. Lazerges en P. Espeau, „The role of stearic acid in ascorbic acid protection from degradation: a heterogeneous system for homogeneous thermodynamic data,” *New journal of chemistry*, nr. 37, pp. 761-768, 2012.
- [54] T. Kurata en Y. sakurai, „Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction,” *Agricultural and Biological Chemistry*, nr. 31, pp. 170-176, 2014.
- [55] J. Kanner, J. Fishbein, P. Shalom, S. Harel en I. Ben-Gera, „Storage stability of orange juice concentrate packaged aseptically,” *Journal of Food Science*, nr. 47, pp. 429-431, 1982.
- [56] M. Roig, J. Bello, Z. Rivera en J. Kennedy, „Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice,” *Food Research International*, nr. 32, pp. 609-619, 1999.

- [57] R. V. Tikekar, R. C. Anantheswaran en L. F. LaBorde, „Ascorbic acid degradation in a model apple juice system and in apple juice during ultraviolet processing and storage,” *Journal of Food Science*, nr. 76, pp. 62-71, 2011.
- [58] A. Dehelean en D. A. Magdas , „Analysis of mineral and heavy metal content of some commercia fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry,” *The Scientifical World Journal*, nr. 2013, pp. 1-7, 2013.
- [59] A. Hanaki, „Copper-catalyzed oxidation of ascorbic acid,” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 9, nr. 17, pp. 1839-1846, 1969.
- [60] D. M. Barrett, L. Somogyi en H. S. Ramaswamy, *Processing fruits: Science and technology*, CRC PRESS, 2004.
- [61] A. Nzekwe en E. Nzekwe, „Determiration of vitamin C and metal ions in different fruit juice samples from Ekwulobia, Anabra State,” Science Technology Department, Anambra State.
- [62] M. T. Khan en A. Martell, „Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen,” *Journal of the American Chemical Society* , vol. 16, nr. 89, pp. 4176-4185, 1967.
- [63] G. Zemel, C. Sims, M. Marshall en M. Balaban, „Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice,” *Journal of food science* , nr. 55, pp. 562-563, 1990.
- [64] A. Yemenicioglu, M. Ozkan en B. Cemerogly, „Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form,” *Journal of Food Science*, nr. 62, pp. 508-510, 1997.
- [65] H. Nursten, *The maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.
- [66] A. Kruss, „Refractometer – Brix measurement in the juice and beverage industry,” Optronic GmbH, Hamburg.
- [67] V. Biemann, J. Gillan, N. Perkins, A. Skidmore, S. Godden en K. Leslie, „An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle,” *Journal of Dairy Science*, nr. 93, pp. 3713-3721, 2010.
- [68] I. Sackmann en F. Gottsleben, „Brix measurement of fruit juices containing pulp of other particles,” *Drink Technology and Marekting*, pp. 16-19, 2014.
- [69] M. Frederix, *Focus voeding - Toegepaste Microbiologie [cursus]*, Diepenbeek: UC Leuven Limburg, 2015-2016.
- [70] V. H. Tournas, J. Heeres en L. Burgess, „Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices,” *Food Microbiology* , nr. 23, pp. 684-688, 2006.

- [71] L. Beuchat en J. Pitt, „Detection and enumeration of heat-resistant molds,” in *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, APHA Press, pp. 217-222.
- [72] W. Hatcher en D. Murdock, „A simple method for screening fruit juices and concentrates for heat resistant mold,” *Florida State Horticultural Society*, nr. 89, pp. 202-204, 1976.
- [73] V. Gökman en J. Acar, „An investigation on the relationship between patulin and fumaric acid in apple juice concentrates,” Department of Food Engineering, Hacettepe University, 1998.
- [74] H. M. Gashlan, „High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia,” *Scientific Research and Essay*, nr. 4, pp. 69-72, 2009.
- [75] V. Sewram, J. Nair, T. Nieuwoudt en N. Leggot, „Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry,” *Journal of Chromatography*, nr. 897, pp. 365-374, 2000.
- [76] H. . T. Lawless en H. Heymann, *Sensory evaluation of food*, Springer, 2010.
- [77] M. C. Meilgaard, G. V. Civille en B. T. Carr, *Sensory evaluation techniques*, CRC Press, 2007.
- [78] P. Dirinck en I. Dirinck, *Smaak begrijpen en meten: succesfactor voor het commercialiseren van levensmiddelen [cursus]*, Zwijnaarde: Sens Net , 2016.
- [79] V-G Sensory Quality Survey , *Workshop: Concreet aan de slag met sensoriek [cursus]*, Deinze: V-G Sensory Quality Survey, 2014.
- [80] „Triangeltest of driehoekstest,” Flanders Food, 24 11 2011. [Online]. Available: <http://www.flandersfood.com/artikel/2011/11/24/triangeltest-driehoekstest>. [Geopend 25 Maart 2017].
- [81] L. Suntornsuk, W. Gritsanapun, S. Nilkamhank en A. Paochom, „Quantitation of vitamin C content in herbal juice using,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, nr. 28, p. 849–855, 2002.
- [82] „Iodine iodate 1/64N (1/128M) concentrate solution for 1 ltr,” Loba Chemie, 1 oktober 2016. [Online]. Available: <http://www.lobachemie.com/concentrate-volumetric-solutions-4200K/iodine-iodate-164n-1128m-concentrate-solution-for-1-ltr-CASNO-153507-24-5.aspx>. [Geopend 18 maart 2017].
- [83] „Determination of vitamin C concentration by titration,” University of Canterbury, Christchurch.
- [84] C. R. Silva, J. A. Simoni, C. H. Collins en P. L. O. Volpe, „Ascorbic acid as a standard for iodometric titrations,” *Journal of Chemical Education*, vol. 10, nr. 76, pp. 1421-1422, oktober 1999.

- [85] F. Scientific, „2-Furaldehyde Safety Data Sheet,” Fisher Scientific, 2014.
- [86] H. T. Lawless en H. Heymann, Sensory evaluation of food: principles and practices, New York: Springer , 2010.
- [87] J. Klaessens, Statistiek, validatie en meetonzekerheid, Utrecht: Syntax Media , 2013.
- [88] Cobell, „Acidity correction tables for correcting refractometric brix,” Cobell, Europe, 2011.



## Bijlagen

### Bijlage A: Correctietabel °Brix-waarden

Tabel 7: Correctietabel °Brix-waarden (citroenzuur) [88]

Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix
0.00	0.00	7.40	1.42	14.80	2.78
0.20	0.04	7.60	1.46	15.00	2.81
0.40	0.08	7.80	1.50	15.20	2.85
0.60	0.12	8.00	1.54	15.40	2.89
0.80	0.16	8.20	1.58	15.60	2.93
1.00	0.20	8.40	1.62	15.80	2.97
1.20	0.24	8.60	1.66	16.00	3.00
1.40	0.28	8.80	1.69	16.20	3.03
1.60	0.32	9.00	1.72	16.40	3.06
1.80	0.36	9.20	1.76	16.60	3.09
2.00	0.39	9.40	1.80	16.80	3.13
2.20	0.43	9.60	1.83	17.00	3.17
2.40	0.47	9.80	1.87	17.20	3.21
2.60	0.51	10.00	1.91	17.40	3.24
2.80	0.54	10.20	1.95	17.60	3.27
3.00	0.58	10.40	1.99	17.80	3.31
3.20	0.62	10.60	2.03	18.00	3.35
3.40	0.66	10.80	2.06	18.20	3.38
3.60	0.70	11.00	2.10	18.40	3.42
3.80	0.74	11.20	2.14	18.60	3.46
4.00	0.78	11.40	2.18	18.80	3.49
4.20	0.81	11.60	2.21	19.00	3.53
4.40	0.85	11.80	2.24	19.20	3.56
4.60	0.89	12.00	2.27	19.40	3.59
4.80	0.93	12.20	2.31	19.60	3.63
5.00	0.97	12.40	2.35	19.80	3.67
5.20	1.01	12.60	2.39	20.00	3.70
5.40	1.04	12.80	2.42	20.20	3.73
5.60	1.07	13.00	2.46	20.40	3.77
5.80	1.11	13.20	2.50	20.60	3.80
6.00	1.15	13.40	2.54	20.80	3.84
6.20	1.19	13.60	2.57	21.00	3.88
6.40	1.23	13.80	2.61	21.20	3.91
6.60	1.27	14.00	2.64	21.40	3.95
6.80	1.30	14.20	2.68	21.60	3.99
7.00	1.34	14.40	2.72	21.80	4.02
7.20	1.38	14.60	2.75	22.00	4.05

Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix
22.20	4.09	29.60	5.39	<b>37.00</b>	6.70
22.40	4.13	29.80	5.42	37.20	6.74
22.60	4.17	<b>30.00</b>	5.46	37.40	6.77
22.80	4.20	30.20	5.49	37.60	6.81
<b>23.00</b>	4.24	30.40	5.53	37.80	6.84
23.20	4.27	30.60	5.57	<b>38.00</b>	6.88
23.40	4.30	30.80	5.60	38.20	6.91
23.60	4.34	<b>31.00</b>	5.64	38.40	6.95
23.80	4.38	31.20	5.67	38.60	6.99
<b>24.00</b>	4.41	31.40	5.71	38.80	7.02
24.20	4.44	31.60	5.74	<b>39.00</b>	7.06
24.40	4.48	31.80	5.78	39.20	7.09
24.60	4.51	<b>32.00</b>	5.81	39.40	7.13
24.80	4.54	32.20	5.85	39.60	7.16
<b>25.00</b>	4.58	32.40	5.89	39.80	7.20
25.20	4.62	32.60	5.92	<b>40.00</b>	7.23
25.40	4.66	32.80	5.96	40.20	7.27
25.60	4.69	<b>33.00</b>	5.99	40.40	7.31
25.80	4.73	33.20	6.03	40.60	7.34
<b>26.00</b>	4.76	33.40	6.06	40.80	7.38
26.20	4.79	33.60	6.10	<b>41.00</b>	7.41
26.40	4.83	33.80	6.13	41.20	7.45
26.60	4.86	<b>34.00</b>	6.17	41.40	7.48
26.80	4.90	34.20	6.20	41.60	7.52
<b>27.00</b>	4.94	34.40	6.24	41.80	7.55
27.20	4.97	34.60	6.28	<b>42.00</b>	7.59
27.40	5.00	34.80	6.31	42.20	7.62
27.60	5.03	<b>35.00</b>	6.35	42.40	7.66
27.80	5.06	35.20	6.38	42.60	7.70
<b>28.00</b>	5.10	35.40	6.42	42.80	7.73
28.20	5.14	35.60	6.45	<b>43.00</b>	7.77
28.40	5.18	35.80	6.49	43.20	7.80
28.60	5.22	<b>36.00</b>	6.52	43.40	7.84
28.80	5.25	36.20	6.56	43.60	7.87
<b>29.00</b>	5.28	36.40	6.60	43.80	7.91
29.20	5.31	36.60	6.63	<b>44.00</b>	7.94
29.40	5.35	36.80	6.67	44.20	7.98



Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix	Anhydrous Citric Acid, %w/w	Correction to be added, °Brix
44.40	8.02	49.80	8.97	55.20	9.93
44.60	8.05	<b>50.00</b>	9.01	55.40	9.97
44.80	8.09	50.20	9.04	55.60	10.00
<b>45.00</b>	8.12	50.40	9.08	55.80	10.04
45.20	8.16	50.60	9.12	<b>56.00</b>	10.07
45.40	8.19	50.80	9.15	56.20	10.11
45.60	8.23	<b>51.00</b>	9.19	56.40	10.15
45.80	8.26	51.20	9.22	56.40	10.15
<b>46.00</b>	8.30	51.40	9.26	56.60	10.18
46.20	8.33	51.60	9.29	56.80	10.22
46.40	8.37	51.80	9.33	<b>57.00</b>	10.25
46.60	8.41	<b>52.00</b>	9.36	57.20	10.29
46.80	8.44	52.20	9.40	57.40	10.32
<b>47.00</b>	8.48	52.40	9.44	57.60	10.36
47.20	8.51	52.60	9.47	57.80	10.39
47.40	8.55	52.80	9.51	<b>58.00</b>	10.43
47.60	8.58	<b>53.00</b>	9.54	58.20	10.46
47.80	8.62	53.20	9.58	58.40	10.50
<b>48.00</b>	8.65	53.40	9.61	58.60	10.54
48.20	8.69	53.60	9.65	58.80	10.57
48.40	8.73	53.80	9.68	<b>59.00</b>	10.61
48.60	8.76	<b>54.00</b>	9.72	59.20	10.64
48.80	8.80	54.20	9.75	59.40	10.68
<b>49.00</b>	8.83	54.40	9.79	59.60	10.71
49.20	8.87	54.60	9.83	59.80	10.75
49.40	8.90	54.80	9.86	<b>60.00</b>	10.78
49.60	8.94	<b>55.00</b>	9.90	60.20	10.82

## Bijlage B: Optimalisatie van productieproces voor aseptische opslag van sap

Tabel 8: Meetresultaten opvolging productieproces

	Tijd (min)	AA op PT-tank (ppm)
<b>Test referentieproces</b>	0	79,20 (uitschieter)
	7	346,78
	19	441,93
	40	477,68
	65	435,33
	80	242,55
	93	247,23
	110	256,58
<b>Test vit. C op buffertank</b>	0	468,60
	20	331,65
	35	309,65
	65	403,00
	80	301,21

Tabel 9: Toegevoegde en effectieve AA-concentratie en AA-verlies tijdens opvolging productieproces

	AAM N2 (appelsap)	AABP N2 (appelsap)	AABP N2 (perensap)
Toegevoegde [AA] tijdens productie (ppm)	650,76	318,31	399,99
Effectieve [AA] na productie (ppm)	321,75	296,45	334,68
Verlies aan [AA] tijdens productie	329,01	21,86	65,32

Tabel 10: Hoeveelheid opgeloste droge stof van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Week	AAM N2			AABP N2		
	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens
0	12,25	12,15	12,05	12,65	12,55	12,45
1	12,40	12,30	12,20	12,60	12,50	12,40
2	12,40	12,30	12,20	12,70	12,60	12,50
3	12,50	12,40	12,30	12,70	12,60	12,50
4	12,50	12,40	12,30	12,70	12,60	12,50

Tabel 11: pH en appelzuurgehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Week	AAM N2					
	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,78	3,58	3,38	4,58	4,08	3,58
1	3,94	3,74	3,54	4,63	4,13	3,63
2	4,03	3,83	3,63	4,68	4,18	3,68
3	4,06	3,86	3,66	4,77	4,27	3,77
4	3,95	3,75	3,55	4,73	4,23	3,73
Week	AABP N2					
	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,95	3,75	3,55	4,43	3,93	3,43
1	4,00	3,80	3,60	4,40	3,90	3,40
2	4,01	3,81	3,61	4,16	3,66	3,16
3	4,11	3,91	3,71	4,14	3,64	3,14
4	3,99	3,79	3,59	4,29	3,79	3,29

Tabel 12: AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 4 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Week	AA (mg/l)	
	AAM N2	AABP N2
0	321,75	296,45
1	289,58	270,88
2	271,15	224,13
3	260,43	217,80
4	158,68	194,98

## Bijlage C: Bepaling maximale opslagperiode van aseptisch opgeslagen sap

Tabel 13: Hoeveelheid opgeloste droge stof, pH, appelzuurgehalte en AA-gehalte van sappen afkomstig van procescondities AAM N2 en AABP N2 gedurende 6 maanden opslag in BIB bij 5,5°C

	0 maanden		3 maanden		6 maanden	
	AAM N2	AABP N2	AAM N2	AABP N2	AAM N2	AABP N2
Bovengrens	12,55	12,38	12,62	12,06	12,57	12
<b>Brix (g/100g sap)</b>	12,45	12,28	12,52	11,96	12,47	11,9
Ondergrens	12,35	12,18	12,42	11,86	12,37	11,8
Bovengrens	3,72	3,67	3,83	3,72	3,81	3,71
<b>pH</b>	3,52	3,47	3,63	3,52	3,61	3,51
Ondergrens	3,32	3,27	3,43	3,32	3,41	3,31
Bovengrens	4,84	5,5	4,89	5,66	5,07	5,78
<b>Appelzuur (g/l)</b>	4,34	5	4,39	5,16	4,57	5,28
Ondergrens	3,84	4,5	3,89	4,66	4,07	4,78
<b>AA (mg/l)</b>	443	326	450	303	389	300

## Bijlage D: Bepaling ideale blend in fles

Tabel 14: Hoeveelheid opgeloste droge stof van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Blend AAM N2			Blend AABP N2		
Week	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens
0	12,4	12,3	12,2	12,3	12,2	12,1
1	12,4	12,3	12,2	12,3	12,2	12,1
2	12,4	12,3	12,2	12,3	12,2	12,1
3	12,5	12,4	12,3	12,4	12,3	12,2
4	12,4	12,3	12,2	12,4	12,3	12,2
5	12,5	12,4	12,3	12,4	12,3	12,2
	Referentiesap AAM N2			Referentiesap AABP N2		
Week	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens	Bovengrens	°Brix (g/100g sap)	Ondergrens
0	12,3	12,2	12,1	12,5	12,4	12,3
1	12,3	12,2	12,1	12,5	12,4	12,3
2	12,3	12,2	12,1	12,5	12,4	12,3
3	12,4	12,3	12,2	12,6	12,5	12,4
4	12,4	12,3	12,2	12,5	12,4	12,3
5	12,3	12,2	12,1	12,5	12,4	12,3

Tabel 15: pH en appelzuurgehalte van blend AAM N2 met daarbij horende referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

	Blend AAM N2					
Week	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,77	3,57	3,37	4,90	4,40	3,90
1	3,77	3,57	3,37	4,97	4,47	3,97
2	3,92	3,72	3,52	4,87	4,37	3,87
3	3,97	3,77	3,57	5,00	4,50	4,00
4	3,90	3,70	3,50	5,00	4,50	4,00
5	3,80	3,60	3,40	4,99	4,49	3,99
	Referentiesap AAM N2					
Week	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,90	3,70	3,50	4,90	4,40	3,90
1	3,90	3,70	3,50	4,92	4,42	3,92
2	3,88	3,68	3,48	4,94	4,44	3,94
3	4,04	3,84	3,64	5,14	4,64	4,14
4	4,01	3,81	3,61	5,11	4,61	4,11
5	3,83	3,63	3,43	5,03	4,53	4,03

Blend AABP N2						
Week	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,71	3,51	3,31	5,22	4,72	4,22
1	3,69	3,49	3,29	5,30	4,80	4,30
2	3,75	3,55	3,35	5,24	4,74	4,24
3	3,86	3,66	3,46	5,25	4,75	4,25
4	3,80	3,60	3,40	5,29	4,79	4,29
5	3,90	3,70	3,50	5,26	4,76	4,26
Referentiesap AABP N2						
week	Bovengrens	pH	Ondergrens	Bovengrens	Appelzuur (g/l)	Ondergrens
0	3,98	3,78	3,58	4,75	4,25	3,75
1	3,97	3,77	3,57	4,76	4,26	3,76
2	3,79	3,59	3,39	4,76	4,26	3,76
3	3,85	3,65	3,45	4,90	4,40	3,90
4	3,87	3,67	3,47	4,89	4,39	3,89
5	3,85	3,65	3,45	4,87	4,37	3,87

Tabel 16: AA-gehalte van blend AAM N2 met daarbij horend referentiesap en van blend AABP N2 met daarbij horend referentiesap gedurende 5 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

AA (mg/l)		
Week	Blend AAM N2	Blend AABP N2
0	358,05	323,68
1	288,20	291,50
2	228,25	258,50
3	263,45	245,30
4	200,75	235,13
5	210,65	248,60
AA (mg/l)		
Week	Referentiesap AAM N2	Referentiesap AABP N2
0	359,43	434,23
1	341,83	386,10
2	310,75	381,43
3	280,23	345,68
4	256,58	351,45
5	300,58	344,85

Tabel 17: Resultaten voorkeurstest tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 0 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Persoon	Blend AAM N2				Blend AABP N2			
	Kleur	Geur	Smaak	Nasmaak	Kleur	Geur	Smaak	Nasmaak
1	4	2	2	1	4	4	4	4
2	4	3	4	5	5	4	5	3
3	3	3	3	2	4	2	4	3
4	4	4	4	4	4	3	3	3
5	3	3	3	2	4	4	4	3
6	4	4	4	4	4	3	2	2
7	3	3	3	3	4	4	4	4
8	5	5	4	4	5	3	3	2

Tabel 18: Resultaten voorkeurstest tussen blend AAM N2 en blend AABP N2 na 3 weken opslag in fles in warmtekamer bij 32°C

Persoon	Blend AAM N2				Blend AABP N2			
	Kleur	Geur	Smaak	Nasmaak	Kleur	Geur	Smaak	Nasmaak
1	4	3	3	3	4	4	4	4
2	3	3	2	4	4	4	3	3
3	2	2	1	1	3	3	3	3
4	3	3	2	2	4	3	2	2
5	2	2	1	1	2	2	2	1
6	4	5	4	3	4	5	5	4
7	4	2	1	1	4	3	3	4
8	2	2	3	3	4	3	4	4



# Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:  
**Optimalisatie van procescondities voor productie en opslag van aseptisch appelsap**

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**  
Jaar: **2017**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Wijnants, Cindy**

Datum: **12/06/2017**