

Određivanje vitamina C u narezanoj jabuci Cripps pink skladištenoj u kontroliranoj atmosferi i sterilnim uvjetima

Buljan, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:106797>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Petra Buljan

6493/N

ODREĐIVANJE VITAMINA C U NAREZANOJ JABUCI CRIPPS PINK
SKLADIŠTENJOJ U KONTROLIRANOJ ATMOSFERI I STERILNIM UVJETIMA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Osnove prehrambenih tehnologija

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij
Nutricionizam
Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

ODREĐIVANJE VITAMINA C U NAREZANOJ JABUCI „CRIPPS PINK“ SKLADIŠTENJOJ U KONTROLIRANOJ ATMOSFERI I STERILNIM UVJETIMA

Petra Buljan, 6493/N

Sažetak:

Ovo istraživanje bavi se utjecajem sastava atmosfere i temperature skladištenja na sadržaj vitamina C u svježe narezanoj jabuci sorte Cripps Pink u sterilnim uvjetima tijekom osam dana. Provedeno je pri kontroliranoj atmosferi sastava ~80 % N₂, 10 % CO₂ i 10 % O₂ i temperaturi između 4 i 6 °C. Mjerenje vitamina C izvršeno je HPLC metodom 0., 1., 2., 4. i 7. dan skladištenja, a sterilnost skladišne komore provjeravala se ispitivanjem prisutnosti PCA bakterija i kvasaca također 0., 1., 2., 4. i 7. dan. Dobiveni rezultati pokazuju kako je tijekom prva dva dana moguće očuvati visoku razinu vitamina C, koja nakon toga postaje zanemariva. Također je moguće očuvati sterilne uvjete skladištenja i modificiranu atmosferu tijekom svih osam dana unatoč nepotpune hermetičnosti skladišne komore.

Ključne riječi: jabuka, minimalno procesiranje, vitamin C, kontrolirana atmosfera, sterilni uvjeti

Rad sadrži: 34 stranice, 5 tablica, 9 slika i 56 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Rad predan: Rujan 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies
Nutrition
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

DETERMINATION OF VITAMIN C IN FRESH-CUT „CRIPPS PINK“ APPLE STORED IN CONTROLLED ATMOSPHERE AND STERILE CONDITIONS

Petra Buljan, 6493/N

Abstract:

This study addresses the impact of atmosphere composition and storage temperature on the vitamin C content in fresh-cut Cripps Pink apple in sterile conditions during eight days. The research was conducted in controlled atmosphere conditions of ~80 % N₂, 10 % CO₂ and 10 % O₂ with the temperature varying between 4 and 6 °C. Vitamin C was determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) and the sterility of the storage chamber was tested by analyzing the presence of PCA bacteria and yeasts on 0., 1st, 2nd, 4th and 7th day. The results show that it's possible to maintain the high levels of vitamin C during the first two days of storage, but after that it becomes negligible. It is also possible to maintain the sterile conditions of storage and modified atmosphere during all eight days, despite the incomplete hermeticity of the storage chamber.

Keywords: apple, minimal processing, vitamin C, controlled atmosphere, sterile conditions

Thesis contains: 34 pages, 5 tables, 9 pictures, 56 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph. D. Branka Levaj, Full professor

Technical support and assistance: Ph. D. Jasna Mrvčić, Associated professor

Thesis delivered: September 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Jabuka	2
2.1.1. Građa ploda jabuke	3
2.1.2. Kemijski sastav	4
2.2. Vitamin C	6
2.2.1. Vitamin C u jabuci.....	7
2.2. Minimalno procesirano voće	9
2.2.1. Minimalno procesirana jabuka	10
2.2.1.1. Utjecaj sorte	11
2.2.1.2. Utjecaj modificirane atmosfere	12
2.2.1.3. Mikrobiološka ispravnost.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijal	15
3.2. Metoda rada	16
3.2.1. Priprema uzoraka	16
3.2.2. Mikrobiološko provjeravanje sterilnosti.....	17
3.2.2. Određivanje vitamina C (HPLC)	19
3.2.3. Određivanje razine plinova u komori	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Kontrolirana atmosfera	24
4.2. Dokazivanje sterilnosti	24
4.3. Određivanje vitamina C pomoću HPLC metode	25
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Užurbani stil života, kojem zbog stresa i obaveza podliježe gotovo cijela populacija, često ostavlja traga na ljudskom zdravlju. Nije lako uz sve ostale obaveze odvojiti i dovoljno vremena za pripremu hrane, te se vrlo često konzumira hrana iz restorana tzv. brze hrane koja nije uvijek u skladu s preporukama o unosu vitamina, minerala i ostalih nutrijenata. Jedan od najpotrebnijih vitamina čiji unos se uvijek izričito preporučuje je vitamin C koji služi kao antioksidans u ljudskom organizmu, pridonoseći otpornosti organizma i liječenju bolesti, te se preporučuje njegov unos u povećanim količinama kao protumjera svakodnevnom stresu. Voće i povrće je najznačajniji izvor vitamina C, a bogato je i drugim vrijednim sastojcima. Nažalost, svježe voće i povrće nije uvijek bilo prisutno u ponudi tzv. brze hrane.

Sredinom dvadesetog stoljeća, nutricionisti su različitim istraživanjima došli do zabrinjavajućih podataka o padu konzumacije voća i povrća po stanovniku, te su uz edukacije, različite promo-materijale i marketinške kampanje pokušali osvijestiti potrošače o važnosti zdrave prehrane. Kao posljedica tih prehrambenih kampanja, došlo je do porasta industrije tzv. minimalno procesiranog voća i povrća u SAD-u i Europi. To je već oprano, narezano i zapakirano voće ili povrće što omogućuje potrošaču lagano rukovanje i konzumaciju, koja je moguća odmah, bez dodatne pripreme. Danas raste ponuda i potrošnja takvih proizvoda, često su i na jelovniku danas sve popularnijih restorana-samoposluga, te u načinima serviranja hrane kao što su catering, švedski stol i drugi.

Zbog minimalne prerade, ali ne i termičkog tretmana, enzimi i mikroorganizmi ostaju aktivni pa su takvi proizvodi vrlo podložni kvarenju. Stoga je održavanje higijene i sigurnosti proizvoda neophodno i vrlo zahtjevno, pogotovo tijekom serviranja narezanog nezapakiranog voća i povrća, te se za to traže efikasna rješenja. Jedno od mogućih rješenja je pohranjivanje narezanog voća i povrća u sterilnu, hermetički zatvorenu komoru u kojoj se održava potrebna sterilnost, temperatura i sastav atmosfere te je opremljena sustavom za ispuštanje zadane količine voća bez promjene uvjeta u komori. Da bi se ispitala funkcionalnost takve komore i održivost voća u njoj odabrana je jabuka koja je na tržištu prisutna tijekom cijele godine, a minimalnom preradom olakšava se njezina konzumacija.

Stoga je cilj ovog rada bio provjeriti sterilnost skladišnih uvjeta u komori za čuvanje nezapakiranog narezanog voća skladištenjem neživog materijala, provjeriti rad sustava za održavanje kontrolirane atmosfere u komori te udio vitamina C u jabuci skladištenoj u komori tijekom 8 dana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jabuka

Jabuka je jedno od najučestalije konzumiranih voća današnjice. Smatra se da jestiva jabuka potječe iz Centralne Azije, gdje je nastala hibridizacijom vrsta divljeg roda *Malus*, te je uznapredovala tijekom godina probiranjem od strane uzgajivača.

Jabuka (*Malus × domestica* Borkh.) prema botaničkoj klasifikacija (Thompson i sur., 2009) pripada u:

- Carstvo: Plantae
 - Koljeno: Magnoliophyta
 - Razred: Magnoliopsida
 - Red: Rosales
 - Porodica: Rosaceae
 - Rod: *Malus*
 - Vrsta: *Malus domestica*.



Slika 1. Jabuka (Anonymus, 2010.)

Jabuka raste na drvetu niskog do srednjeg rasta, s razgranatom krošnjom. Najpogodnija podloga za uzgoj jabuka je isušeno tlo, pH 6 – 7, ali je stablo vrlo prilagodljivo, te jabuke rastu na različitom tlu diljem svijeta.

Komercijalno se proizvodi u 98 zemalja, na čelu sa Kinom (48 % svjetske proizvodnje), Amerikom (6 % svjetske proizvodnje) i Turskom (4 % svjetske proizvodnje) (Anonymus 1.). Također se nalazi na trećem mjestu ukupne svjetske proizvodnje voća, te je tradicijski

najvažnija voćarska vrsta u Hrvatskoj; 36 % ukupne proizvodnje voća u Hrvatskoj otpada na jabuke (Cerjak i sur., 2010).

Prosječan potrošač u SAD-u 2001. godine konzumirao je otprilike 23 kg jabuka i proizvoda od jabuka, s time da je 60 % bilo konzumirano kao svježe voće (Collet, 2011) Što se tiče proizvodnje, u 2015. godini samo u Americi proizvedeno je 4,725,071 tona jabuka (USDA). Taj podatak ne iznenađuje, s obzirom na to da se jabuka u ljudskoj prehrani nalazi u različitim oblicima (Tablica 1.).

Tablica 1. Doprinos jabuka prehrani
(Anon.1)

1.	Proizvod	Konzumacija
2.	Svježe jabuke	65 %
3.	Sokovi i pića	15,7 %
4.	Konzervirane	12,2 %
5.	Suhe	2,1 %
6.	Zamrznute	2,1 %
7.	Svježe kriške	1,1 %

2.1.1. Građa ploda jabuke

Plod jabuke oblikom je okruglast, jezgričav, promjera obično većeg od 5 centimetara. Najčešće je zelene, žućkaste ili crvene boje.

Razlikuju se rane ili ljetne, srednje rane ili jesenske i kasne ili zimske sorte (Anon 2.)

Prosječna masa ploda jabuke je od 150 do 160 g, ali može doseći masu i od 600 g. Plodovi se mogu razlikovati prema obliku, veličini, boji, teksturi, vremenu sazrijevanja, sadržaju nutritivnih tvari itd. (Luby, 2003).

Plod jabuke se ubraja utzv. sočne plodove.

Perikarp se u sočnih plodova često diferencira u tri sloja: površinski tanki egzokarp, sočan i mesnati središnji sloj mezokarp i unutrašnji endokarp koji okružuje sjemenke. Sjemenke su izdužene, duge oko 7 mm i suženog su vrha.



Slika 2. Presjek ploda jabuke (<http://www.botanic.hr>)

Jabuka je nepravi plod jer se razvija iz vrčasto udubljenog cvjetišta, dok se iz plodnice razvija samo središnji dio jabuke do kožaste opne unutar koje se nalaze sjemenke, te se pravim plodom smatra samo taj dio jabuke.



Slika 3. Cvijet i plod jabuke (Anon. 3)

2.1.2. Kemijski sastav

Plod jabuke bogat je hranjivim sastojcima, a njihova količina ovisi o vrsti, te načinu uzgoja i vremenu berbe. Poznate su mnoge sorte, koje se međusobno razlikuju po okusu, slatkoći ili kiselosti, sočnosti i konzistenciji, a razlike među njima proizlaze iz u određenoj mjeri različitog kemijskog sastava. Ipak, osnovni kemijski sastav svih sorti jabuke je sličan.

Plod jabuke na 100 grama prosječno sadrži 85 % vode, 0,26 % proteina, 14 % ugljikohidrata i 0,17 % masti. Također sadrži 2-3 g dijetetskih vlakana na 100 grama proizvoda, što je više od 10 % preporučene dnevne količine, čineći jabuku dobrim izvorom (>10 % preporučene dnevne količine; RDA) dijetetskih vlakana.

Energetska vrijednost 100 grama jabuke iznosi oko 218 kJ (52 kcal). U tablicama 2. a), b) i c) naveden je potpuni nutritivni sastav jabuke.

Tablica 2. a) Prosječni osnovni kemijski sastav jabuke na 100 g ploda (USDA)

Sastojak	Mjerna jedinica	Količina
Energija	kcal	52,00
Voda	g	85,56
Proteini	g	0,26
Masti	g	0,170
Ugljikohidrati	g	13,81
Prehrambena vlakna	g	2,4

Tablica 2. b) Mineralni sastav jabuke na 100 g ploda (USDA)

Minerali		
Kalcij	mg	6,0
Željezo	mg	0,12
Magnezij	mg	5,0
Fosfor	mg	11,0
Kalij	mg	107,0
Natrij	mg	1,0
Cink	mg	0,04

Tablica 2. c) Vitaminski sastav jabuke na 100 g ploda (USDA)

Vitamini		
Vitamin C	mg	4,6
Tiamin	mg	0,017
Riboflavin	mg	0,026
Niacin	mg	0,091
Vitamin B6	mg	0,041
Folati	μg	3,0
Vitamin A, RAE	μg	3,0
Vitamin A, IU	IU	54
Vitamin E	Mg	0,18
Vitamin K	μg	2,2

2.2. Vitamin C

Vitamin C, to jest askorbinska kiselina (AA), je organski spoj topljiv u vodi koji u ljudskom organizmu djeluje kao prirodni antioksidans. Značajan je po svojoj ulozi u biokemijskim procesima poput transporta elektrona, sinteze kolagena, apsorpcije željeza, te zbog sudjelovanja u zaštiti stanica od oksidacijskog stresa uzrokovanog slobodnim kisikovim radikalima i poboljšanja imunostava. Čovjek ne može endogeno sintetizirati askorbinsku kiselinu, stoga je potrebno unositi ju svakodnevno u organizam prehranom (Drouin i sur., 2011).



Slika 4. Strukturna formula vitamina C (Anon 4.)

Glavni izvor vitamina C su voće i povrće, posebno citrusi, jagode, paprike, rajčice, kupus i špinat i drugi (Padayatty i sur., 2003). Prisutan je i u životinjskim izvorima, ali u zanemarivoj količini.

Preporuke za unos vitamina C iznose 80 mg na dan, a najveći dopušteni dnevni unos iznosi čak 500 mg (Pravilnik o dodacima prehrani, Narodne novine br. 46, 2011), iz razloga što se smatra da stres u svakodnevnom modernom životu zahtijeva povećan unos vitamina C.

Nedostatak vitamina C uzrokuje avitaminozu, koja kao posljedicu može imati anemiju, oslabljen imunološki sustav, krvave desni te skorbut.

Vitamin C je prisutan u dva oblika, askorbinskoj kiselini i njenoj oksidiranoj formi, dehidroaskorbinskoj kiselini (Davies i sur., 1991). Ukupna razina ta dva oblika je konstantna tijekom rasta ploda, no odnos askorbinska/dehidroaskorbinska povećava se na 95/5 kada voće dozrije (Mapson, 1970).

2.2.1. Vitamin C u jabuci

Sadržaj vitamina C u voću i povrću može biti uvjetovan raznim faktorima, kao što su genotipska razlika, klimatski uvjeti prije berbe, zrelost i metoda branja, te postupanje s plodom nakon branja (skladištenje i prerada). Na primjer, što je bila viša količina svjetlosti tijekom doba rasta biljke, u njenom tkivu će biti prisutna veća razina vitamina C. Dušikova su gnojiva pak poznata po tome da smanjuju razinu vitamina C u biljci. Retencija vitamina C smanjena je mehaničkim oštećenjem biljke (Lee i sur., 2000). Također je bitno voditi računa o temperaturi i uvjetima skladištenja; gubitak askorbinske kiseline pospješuje se skladištenjem na visokim temperaturama pri duljem vremenu, a gubitak je moguće smanjiti čuvanjem plodova pri atmosferi smanjenog kisika, s koncentracijom do 10 % ugljikova dioksida (Kader, 2000)

Zahvaljujući svim tim faktorima, nivo varijabilnosti u količini askorbinske kiseline između plodova jabuka iste sorte, ali različite godine berbe, može biti jako velik (Delmotte, 1984).

Prema mnogim provedenim istraživanjima (Mapson, 1970; Fisher, 1999) jabuka sadrži između 2 i 30 mg askorbinske kiseline na 100 g svježeg proizvoda. Ta se koncentracija postupno smanjuje od kore prema središtu ploda (Machlin, 1990), a utvrđeno je i da se u crvenom dijelu kore nalazi dvostruko više askorbinske kiseline nego u zelenom dijelu (Tavernier, 1946).

Razlika između koncentracije askorbinske kiseline u različitim sortama jabuke česti je predmet istraživanja.

Jedno od takvih istraživanja provedeno je u Italiji (Vrhovsek i sur., 2004), a rezultati su pokazali da su sorte Renetta, Morgenduft, Golden Delicious i Braeburn bogate askorbinskom kiselinom (više od 5.4-8.1 mg askorbinske kiseline na 100 g svježe jabuke), dok je sadržaj AA u ostalim sortama bio višestruko puta manji (npr. Red Delicious, 0,7 mg/100 g; Royal Gala, 0,4 mg/100 g).

Znanstvenici s britanskog i nizozemskog sveučilišta su u zajedničkom istraživanju određivali askorbinsku kiselinu u kašama pripremljenim od devet sorti jabuke (Australian Sundowner, Granny Smith, Royal Gala, Pink Lady, Red Delicious, Sturmer, Braeburns, Sundowners, Pacific Queen), te su odredili prosječnu vrijednost 6 mg askorbinske kiseline u 100 g svježe jabuke (Proteggente i sur., 2002).

Bouayed i suradnici (2011) su vršili istraživanje cjelokupnog antioksidacijskog kapaciteta jabuka na sedam sorti jabuke uzgojenih u Luksemburgu (Grauapfel, Roter Trierer Weinapfel, Graham Apfel, Florina, Eifeler Rambour, Topaz, i Goldparmanete) te se pokazalo da 100 g jabuke ima ukupnu antioksidacijsku vrijednost ekvivalentnu 270-1142 mg vitamina C.

U istraživanju utjecaja zrelosti ploda na razinu askorbinske kiseline u sorti Baldwin zabilježen je pad koncentracije s vremenom dozrijevanja. Zeleni plod sadržavao je askorbinsku kiselinu u količini od 18,7 mg/100 g, a zreli 12,4 mg. (Zubeckis, 1962)

Za razliku od rezultata tog istraživanja, Kovač i suradnici (2008) su dobili nešto drugačije vrijednosti baveći se utjecajem vremena berbe na parametre kvalitete sorte Cripps Pink. Oni su primijetili da razina vitamina C raste sa zrelošću ploda, to jest da je količina vitamina C niža u plodu koji je ubran 199 dana nakon cvjetanja – 5,33 mg/100 g, za razliku od ploda ubranog 217 dana nakon cvjetanja – 6,58 mg/100 g.

Šic Žlabur i suradnici (2013) su tijekom svog istraživanja određivali količinu vitamina C u pireu od jabuke (s korom) u sortama Golden Delicious, Idared, Jonagold i Cripps Pink, te su dobili najveću vrijednost kod sorte Cripps Pink (5,36 mg/100 g svježe jabuke), a najmanju kod sorte Idared (4,33 mg/100 g svježe jabuke)

Istraživanjem provedenim u Grčkoj (Drogoudi i sur., 2007) određivan je udio askorbinske kiseline u sortama Fuji, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagored, Mutsu, Starkrimson i Fyriki, pri čemu je najviši udio određen u sorti Fyriki (4,4 mg/100 g svježeg voća, bez kore), dok su ostale varirale oko 3 mg/100 g.

Veršec (2014) je u svom radu određivala razinu vitamina C u različitim sortama jabuka (Fuji, Granny Smith, Gala i Cripps Pink). Dobiveni rezultati ukazali su da je razina vitamina C u usplođu jednaka u sortama Fuji, Gala i Cripps Pink (0,06 mg/100 g), a najniža u sorti Granny Smith (0,03 mg/ 100 g), dok je razina vitamina C u kori uvjerljivo najveća u sorti Gala (6,35 mg/100 g), a najniža u Granny Smith (0,61 mg/100 g).

Priložena istraživanja potvrđuju kako razina askorbinske kiseline u istoj sorti jabuke može značajno varirati, te je teško precizno odrediti unos askorbinske kiseline, što je još jedan od faktora koji kompliciraju utvrđivanje dnevnih preporuka unosa količine jabuka obzirom na vitamin C.

2.2. Minimalno procesirano voće

Svježe rezani plodovi su jedan od najtraženijih artikala u trgovinama diljem zemalja zapadne Europe i SAD-a u posljednjih deset godina. Sirovo i minimalno procesirano voće i povrće prodaje se potrošaču u „ready-to-eat“ obliku, pri čemu ne sadrži umjetne konzervanse ili antimikrobne supstance (Garrett, 2002).

Vrijednost svježe rezanih proizvoda je u njihovoj svježini i jednostavnosti za konzumaciju.

Minimalno procesiranje voća i povrća uključuje probiranje, pranje, sortiranje, guljenje, rezanje, sjeckanje i pakiranje. (Lee i sur., 2003).

Takvi su proizvodi zbog oštećenja stanica pri obradi skloni kvarenju. Dolazi do povećane enzimске aktivnosti, te su dobar supstrat za razmnožavanje mikroorganizama.

To čini njihovo očuvanje izuzetno zahtjevnim, za razliku od relativno jednostavnog procesa proizvodnje. Kako bi ostali stabilni tijekom određenog vremenskog perioda (minimalno 7 dana za maloprodajne lance i 3-4 za catering) potrebno je udovoljiti cijelom nizu zahtjeva. Važan je izbor optimalne sirovine, a glavni kriteriji su (Varoquaux, 1991):

1. Iskorištenje preradom
2. Niska osjetljivost na fiziološke poremećaje i mikrobiološke bolesti
3. Mehanička otpornost tkiva
4. Otpornost na povišenu koncentraciju CO₂ i/ili nisku koncentraciju kisika
5. Visok sadržaj šećera
6. Mala brzina disanja
7. Posebni zahtjevi.

Nadalje, potrebno je osigurati kvalitetu vode za pranje sirovine, te ju obrađivati na optimalan način. Na primjer, moguće je smanjiti oštećenje stanica korištenjem izrazito oštih noževa. Također je moguće koristiti postupke koji smanjuju ili sprječavaju procese posmeđivanja kojem je voće i povrće sklono. Pažnju je potrebno posvetiti i uvjetima pakiranja (sastav atmosfere može znatno utjecati na proizvod, na primjer smanjena razina kisika), te samom ambalažnom materijalu koji omogućuje održavanje inicijalne atmosfere zapljinjene tijekom pakiranja. Ključna stvar je da proizvod tijekom čitavog transportnog lanca treba biti skladišten u optimalnim uvjetima čuvanja što uz sve navedeno znači pri sniženim temperaturama (do 8 °C) (Lamikarna, 2002)

2.2.1. Minimalno procesirana jabuka

Problem koji se javlja kod minimalnog procesiranja jabuka, kao i drugog voća, jest oštećenje tkiva obradom (rezanje, guljenje, i dr.), koje vodi do pojačane respiracije, što rezultira smanjenom trajnosti u odnosu na plodove koji se skladište cijeli.

U narezanoj jabuci osim povećane respiracije dolazi do pojave tamnjenja površine ploški.

Do toga dolazi uslijed enzimskog posmeđivanja koje je uzrokovano oksidacijom fenolnih komponenti pomoću polifenol oksidaze u prisutnosti kisika. Posmeđivanje se ubrzano odvija kada je plod fizički oštećen guljenjem ili rezanjem (Nicolas i sur., 1994), što je neizbježno pri minimalnom procesiranju voća. Naime, ozljede tkiva omogućavaju interakciju polifenol oksidaze i fenolnih komponenti inače odvojenih staničnim materijalom u netaknutom plodu uz kontakt sa zrakom-kisikom.

Obzirom da je boja proizvoda važan faktor kvalitete u očima potrošača, a smeđe kriške jabuke estetski se smatraju neprivlačnima, razvoj industrije i potražnje za minimalno procesiranim proizvodima potaknuo je različita istraživanja, tražeći optimalan način pripreme jabuke za procesiranje.

Organske kiseline kao što je limunska se često koriste za kontroliranje fizioloških promjena u tkivima svježe rezanih plodova.

Askorbinska kiselina se često koristi za sprječavanje oksidacijskih reakcija, kao što je posmeđivanje (Gil i suradnici, 1998).

Lee i sur. (2002) su proveli istraživanje na jabukama sorte Fuji ubranima u Koreji pri čemu su utvrdili da su kriške jabuke potapane u četiri različite otopine, različitih koncentracija askorbinske i limunske kiseline te karagena nakon dva tjedna skladištenja sve bile dobrih senzorskih svojstava, produljenog roka trajnosti, te reduciranog broja mezofilnih bakterija u odnosu na kontrolni uzorak koji je bio potapan u destiliranu vodu.

Rad Soliva-Fortuny i suradnika (2001) dokazao je eksponencijalni pad aktivnosti polifenol oksidaze tijekom 3 mjeseca skladištenja komadića jabuka sorte Golden Delicious prethodno uronjenih u otopinu 1 % askorbinske kiseline i 0,5 % kalcijeva klorida, s odličnim očuvanjem boje i do 11 dana pri uvjetima modificirane atmosfere od 90.5 % N₂ + 7 % CO₂ + 2.5 % O₂.

2.2.1.1. Utjecaj sorte

Poznato je preko deset tisuća različitih sorti jabuka diljem svijeta, što odabir prave sorte ne čini tako jednostavnim.

Jabuke koje se konzumiraju svježe trebaju biti bogate biološki aktivnim spojevima, kao što su askorbinska kiselina i fenolni spojevi, naročito katehini i proantocijanidini koji su veoma jaki antioksidansi (Podsedeck i sur., 2000).

Kim i sur. (1993) proveli su istraživanje kojem je cilj bilo odrediti najpovoljnije sorte za preradu. Istraživanje je bilo provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama, na dvanaest sorti jabuka. Korištene sorte bile su Cortland, Empire, Golden Delicious, Idared, Liberty, McIntosh, Monroe, Mutsu, New York 674, Rhode Island Greening, Delicious i Rome. Temeljeno na zadanim parametrima, niti jedna sorta nije se pokazala idealnom za minimalno procesiranje. Na primjer, Liberty je bila sorta koja se pokazala najprihvatljivijom što se tiče očuvanja teksture i tvrdoće, ali nije u potpunosti zadovoljila kriterij što se tiče promjene boje. S druge strane sorta New York 674 je bila najpovoljnija što se tiče boje, ali je pokazivala veliki gubitak tvrdoće. Zaključak njihovog istraživanja bio je da su se sorte New York 674, Cortland, Golden Delicious, Empire i Delicious ipak pokazale malo pogodnijima za minimalno procesiranje od ostalih sorti.

Istraživanje provedeno od strane Veberiča i suradnika (2010) u Sloveniji bavilo se utjecajem skladištenja na kvalitetu jabuka sorti Golden Delicious i Jonagold. Pokazalo je da plod jabuke sorte Golden Delicious pokazuje bolje očuvanje čvrstoće, te je stoga pogodnija za dulje skladištenje. Kao što je poznato, čvrstoća je bitna kod minimalnog procesiranja, te je stoga sorta Golden Delicious pogodnija za preradu u fresh-cut jabuku od sorte Jonagold.

Khanizadeh i suradnici (2007) su svoje istraživanje usmjerili na usporedbu novih sorti (Ambrosia, Aurora Golden Gala, Crispin, Eden, i Honeycrisp) sa sortama koje se u Kanadi već standardno koriste u minimalnom procesiranju (Empire i Cortland) po pitanju očuvanja boje, te su njihovi rezultati pokazali da relativno nova sorta Eden pokazuje najbolje očuvanje boje (manjak posmeđivanja) tijekom jednog i tri mjeseca skladištenja, a i da vrijednosti parametara mogu ovisiti o lokalitetu uzgoja (istraživanje provedeno na jabukama uzgajanima na dvije lokacije).

U Nizozemskoj je pak provedeno istraživanje na sortama Jonagold, Elstar, Golden Delicious i Cox's Orange (Van der Sluis i sur., 2001), pri kojem se pratila aktivnosti i koncentracija polifenolnih spojeva u navedenim sortama. Sorta Jonagold pokazala je najveću antioksidacijsku aktivnost, praćena sortom Elstar, te zatim Cox's Orange i Golden Delicious, čineći ju pritom najboljom za preradu.

Altisent i suradnici (2014) su se također bavili usporedbom tradicionalnih sorti (Golden Smoothie i Granny Smith) s novim, poboljšanim sortama (Modi, Ariane, Fuji Kiku 8 i Pink Lady). Pratila su se mnoga svojstva, kao što su fizikalno-kemijska svojstva, enzimska aktivnost, disanje, pogodnost za preradu, procjena potrošača itd. Tradicionalne sorte pokazale su veću brzinu disanja od novih, a sve nove sorte pokazale su izvanrednu senzorsku kvalitetu, pri čemu su sorte Modi i Ariane pokazale i najvišu količinu ukupnih fenola i vitamina C. Sortu Fuji Kiku 8 nakon sedam dana skladištenja potrošači su ocijenili kao najprihvatljiviju, a potom sortu Pink Lady. Sve ispitivane sorte pokazale su se pogodne za minimalno procesiranje osim sorte Ariane, zbog izrazitog posmeđivanja tijekom skladištenja.

Sorta kojom se bavi ovo istraživanje, Cripps Pink, jedna od najmlađih sorti u uzgoju, dobivena je križanjem sorti Golden Delicious i Lady Williams, stoga nije začuđujuće da je ona veoma pogodna za minimalno procesiranje. Još jedna bitna prednost ove sorte je što pokazuje jako dug vijek skladištenja (Anon 5.).

2.2.1.2. Utjecaj modificirane atmosfere

Kao što je poznato, na rok trajnosti proizvoda utječe čitav niz faktora, kao što su svjetlost, temperatura, vlaga, prisutnost kisika i drugi. Kao što je već rečeno, narezano voće ima jače izraženu respiraciju u odnosu na cijele plodove i zato ima kraću trajnost. Disanje voća je moguće usporiti i primjenom atmosfere sa smanjenim udjelom kisika i povećanim udjelom ugljikova dioksida u odnosu na sastav zraka. Time vrijeme skladištenja minimalno procesiranih proizvoda može biti produženo (Soliva- Fortoney, 2001).

Stoga se pri minimalnom procesiranju unutar pakiranja proizvoda osigurava modificirana atmosfera, kako bi se produžio rok skladištenja i osigurala kvaliteta samog proizvoda.

Što se tiče utjecaja modificirane atmosfere na parametre kvalitete proizvoda, postoje razna istraživanja kako na trajnost, tako i na kemijski sastav jabuka.

Istraživanje Aguayo i sur. (2009) se usporedno bavi mjerenjem količine polifenola u jabukama sorte Mariri Red s Novog Zelanda u atmosferi zraka i modificiranoj atmosferi tijekom 28 dana, sa zaključkom da pakiranje u modificiranoj atmosferi rezultira manjim gubitkom polifenola i askorbinske kiseline nego pakiranje u atmosferi zraka.

Anese i sur. (1996) su se bavili utjecajem raznih modificiranih atmosfera na kvalitetu minimalno procesirane jabuke Golden Delicious, te su njihovi rezultati pokazali da je pakiranje u vakuumu ili u smjesi plinova 20 % CO₂/80 % N₂ povoljnije od pakiranja u zraku ili čistom N₂ što se tiče očuvanja mikrobiološke kvalitete proizvoda.

Gil i suradnici (1998) nisu pronašli nikakvu znatnu razliku u ukupnom polifenolnom sadržaju narezane jabuke skladištene u atmosferi zraka i one skladištene pri 0 kPa kisika.

Kader (2000) pak navodi da niska koncentracija O₂ smanjuje kvarenje jabuke i gubitak askorbinske kiseline u svježem proizvodu, kao i povišena razina CO₂ do 10 % koja također smanjuje gubitak askorbinske kiseline, no njena viša koncentracija može ubrzati njen gubitak. S druge strane, CO₂ bogata atmosfera može biti pogodna u odgađanju posmeđivanja i mikrobiološkog rasta na nekim namirnicama.

Istraživanje koje su proveli Cocci i suradnici (2006) imalo je za cilj procijeniti učinak tretmana potapanja jabuka u antioksidanse i izlaganja istih modificiranoj atmosferi na udio askorbinske kiseline tijekom osam dana skladištenja pri 4°C. Korištena sorta bila je Golden Delicious, ubrana u Italiji. Jabuke su oguljene i narezane, te potopljene u otopinu 1 %-tne askorbinske kiseline i 1 %-tne limunske kiseline. Kao kontrola su se koristile neumakane jabuke. Za modificiranu atmosferu koristila se smjesa 90 % N₂O, 5 % CO₂ i 5 % O₂, a kao kontrola zrak. Istraživanje je pokazalo da su namakane jabuke pakirane u modificiranoj atmosferi pokazale bržu degradaciju askorbinske kiseline, što se slaže s istraživanjem koje je proveo Bangerth (1977) u kojem dolazi do zaključka da povišene koncentracije CO₂ mogu imati negativan učinak na očuvanje askorbinske kiseline.

Rocculi i suradnici (2004) su dokazali pogodnost korištenja modificirane atmosfere u minimalnom procesiranju voća. Oni su proveli istraživanje na sorti Golden Delicious. Za inhibiciju polifenol oksidaze korištena je otopina limunske i askorbinske kiseline, te kalcijeva klorida, a uzorci su bili podijeljeni u četiri skupine, ovisno o modificiranoj atmosferi u kojoj su se nalazili. Prva, kontrolna skupina bio je zrak, druga 90 % N₂, 5 % CO₂ i 5 % O₂, treća 90 % N₂O, 5 % CO₂ i 5 % O₂ i četvrta 65 % N₂O, 25 % Ar, 5 % CO₂ i 5 % O₂. Uzorci su

spremljeni u hladnjak na 4°C tijekom 12 dana. Dobiveni rezultati pokazali su da modificirana atmosfera s argonom, dušikom (I) oksidom, niskom koncentracijom kisika i ugljikova dioksida u kombinaciji s potapanjem jabuka u antioksidacijsku otopinu može održati svježinu i kvalitetu jabuka tijekom 12 dana, zbog najvećeg učinka na smanjivanje metaboličkih aktivnosti, to jest potvrdili su da korištenje modificirane atmosfere sa smanjenom koncentracijom kisika i povećanom koncentracijom ugljikovog dioksida može biti povoljno za održavanje kvalitete i produljivanje vremena skladištenja jabuka.

Pregledom literature moguće je zaključiti da se korištenjem pravog omjera plinova u modificiranoj atmosferi može značajno produžiti duljinu skladištenja minimalno procesiranoga voća, te njihovu kvalitetu.

2.2.1.3. Mikrobiološka ispravnost

Porast konzumacije svježe pripremljenih proizvoda nažalost je rezultirao povećanom učestalošću oboljenja povezanih sa sirovim voćem i povrćem. Protektivne barijere uklanjaju se sa svježe rezanog voća i povrća, potencijalno povećavajući njihovu izloženost mikrobiološkoj kontaminaciji, povećavajući time rizik od zdravstvenih poteškoća. Bitno je izbjegavati bilo kakvu kontaminaciju voća tijekom procesiranja i rukovanja, te proizvod odmah po završetku obrade mora biti smješten u hladni lanac, sve do trenutka konzumacije. Naime, uz nove načine serviranja hrane, kao što je npr. švedski stol u samoposlužnom restoranu, teško je održavanje odgovarajućih uvjeta. Iz priloženih istraživanja vidljivo je da pogrešno rukovanje proizvodom može lako dovesti do rasta nepoželjnih patogena, no isto tako postoje načini za inhibiciju istoga, ukoliko se sa proizvodom rukuje oprezno i uz odgovarajuće mjere (Leverentz, 2003)

Međutim, razne patogene bakterije, kao što su *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* i *Staphylococcus aureus*, kao i neke linije *Escherichia Coli* mogu biti prisutne na svježem voću unutar minimalno procesiranih proizvoda (Beuchat, 2002).

U istraživanju provedenom u Latviji (Juhneica i sur., 2016) na jabukama sorte Auksis dokazano je da skladištenje u zraku ima drugačiji učinak na rast mikroorganizama nego modificirana atmosfera. Naime, jabuke skladištene u zraku pokazale su tijekom 6 mjeseci dvostruki porast bakterija i kvasaca i trostruki porast plijesni u usporedbi s početnim vrijednostima. Što se tiče jabuka skladištenih u atmosferi „ultra-low-oxygen“ (1 %), primjetna

je stagnacija broja mikroorganizama tijekom perioda skladištenja od 6 mjeseci, sa neznatnim padom broja CFU aerobnih bakterija.

Luo i suradnici (1996) proveli su istraživanje na jabuci Red Delicious, tretiranoj četirima otopinama u svrhu određivanja antimikrobne aktivnosti. Rezultati su pokazali da je broj anaerobnih bakterija nakon 8 tjedana bio dvostruko veći u uzorcima tretiranim vodom, za razliku od onih tretiranih askorbinskom kiselinom, a uzorci tretirani kombinacijom askorbinske kiseline i heksilrezorcinola pokazali su čak devet puta manji broj bakterija od kontrolnog uzorka.

Istraživanje Alegre i sur. (2010) bavilo se utvrđivanjem efekta temperature na rast patogenih bakterija (*E. Coli O157:H7*, *Salmonella* i *Listeria innocua*) na dvije sorte (Granny Smith, Golden Delicious) jabuka. Njihov je rad pokazao da pri temperaturama od 20 i 25 °C *Salmonella* doseže svoj maksimalni rast već za 24 sata, a *E. Coli* i *L. Innocua* nakon 48 sati skladištenja, dok pri nižoj temperaturi (5°C) *E. Coli* i *Salmonella* ne pokazuju nikakav rast, a *L. Innocua* neznatan. Također se pokazalo da sorte jabuka s nižom pH vrijednošću ploda pokazuju smanjen rast bakterije *E. Coli O157:H7*.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

Pri izradi rada, kao sirovina je korištena jabuka sorte Cripps Pink. Jabuke su nabavljene iz trgovačke mreže u veljači 2016.

Provedba istraživanja

Istraživanje je provedeno u dva dijela.

U prvom dijelu provodila se provjera sterilnosti skladišne komore mikrobiološkom analizom pohranjenih aluminijskih čepova.

Kako bi se osiguralo da skladišna komora nema utjecaj na kvalitetu ploda jabuke spremljenog u nju, bilo je nužno dokazati da nakon pranja i dezinfekcije komore te tijekom idućih osam dana (ekvivalent skladištenja jabuke kasnije tijekom istraživanja) ne dolazi do kontaminacije komore mikroorganizmima putem zraka koji eventualno prodire u samu komoru. Nakon pranja klorovodičnom kiselinom i natrijevim hidroksidom te dezinfekcije i ispiranja vodom, u

komoru su pohranjeni prethodno autoklavirani aluminijski čepovi za epruvete koji su poslužili kao neživi materijal na kojem se pratio broj mikroorganizama tijekom 8 dana.

U drugom dijelu istraživanja pratio se utjecaj uvjeta skladištenja u komori tijekom 8 dana na udio vitamina C u jabuci pripremljenoj na niže opisan način.

Uzorci su se oba dijela istraživanja izuzimali 0., 1., 2., 4., i 7. dan skladištenja.

Na početku mjerenja temperatura komore iznosila je 6 °C te koncentracija O₂ 11,9 %, a CO₂ 10,1 %. Navedeni početni uvjeti tijekom 8 dana skladištenja su se održavali. Za održavanje sastava plinova koristila se boca s mješavinom plinova (10 % O₂, 10 % CO₂ i 80 % N₂),.

3.2. Metoda rada

3.2.1. Priprema uzoraka

Kemikalije korištene za pripremu otopine za sprječavanje enzimskog posmeđivanja

- L(+) askorbinska kiselina, p.a. (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Limunska kiselina, monohidrat, p.a. (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 0.1 % klorovodična kiselina (HCl/H₂O)
- 1 M natrijev hidroksid (NaOH)

Postupak

Masa jabuka prije početka obrade iznosila je 4,05 kg. Jabuke su oprane, oguljene te im je uklonjena sjemena loža pomoću metalnog rezača. Preostala masa sirovine iznosila je 2,07 kg. Jabuke su ručnim rezačem izrezane na 8 kriški pri čemu je odstranjena sjemena loža. Svaka ploška je dalje prerezana na dva dijela. Rezanje se provodilo u posudi u kojoj je jabuka bila uronjena u prethodno pripremljenu otopinu limunske i askorbinske kiseline (0,2 % limunske i 1 % askorbinske kiseline). Narezani komadići bili su još dodatno potopljeni u navedenu otopinu. Nakon dvije minute jabuke su ocijeđene i prenesene u komoru za skladištenje.

Komora za skladištenje prethodno je oprana tri puta, prvo otopinom kiseline (0.1 % klorovodična kiselina HCl/H₂O), zatim lužine (1 M natrijev hidroksid) i na kraju isprana destiliranom vodom, kako bi se osigurala njena sterilnost.

3.2.2. Mikrobiološko provjeravanje sterilnosti

Pribor i aparatura za pripremu hranjivih podloga i testiranje sterilnosti

- Aluminijski čepovi za epruvete ($m = 2,526g \pm 0,1$)
- Komercijalna vaga
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH)
- Vortex (MS2 Minishaker IKA)
- Laminar
- Inkubator (PCA 35°C / YM 31.4°C)
- pH metar (S20 SevenEasy, Mettler-Toledo)
- Menzura od 1000ml
- Pipeta od 10ml
- Propipeta
- Mikropipeta volumena od 10 do 1000 μ L
- Staklene i plastične epruvete
- Erlenmeyerove tikvice od 500ml
- Čaša volumena 100ml
- Petrijeve zdjelice
- Autoklav (Sutjeska-fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd)
- Plamenik
- Metalna pinceta
- Metalna žličica
- Plastične kante
- Spužve
- Krpe

Kemikalije korištene za pripremu mikrobioloških podloga u svrhu provjeravanja sterilnosti

- Pepton (Liofilchem, Italija)
- Ekstrakt kvasca (Biolife, Milano, Italija)
- Ekstrakt slada (Biolife, Milano, Italija)

- Glukoza (Biolife, Milano, Italija)
- Agar (Liofilchem, Italija)
- Trypton (Biolife, Milano, Italija)
- 20 % sulfatna kiselina i 10 % amonijeva lužina za ujednačavanje pH
- Cikloheksamid (30 μ L u PCA)
- Antibiotik (30 μ L u YMA)
- Destilirana voda
- Natrijev klorid (NaCl)

Princip

Korištene hranjive podloge su Plate count agar (PCA) i Yeast malt agar (YM) podloge.

PCA podloga služi određivanju aerobnih bakterija. Sastoji se od triptona, ekstrakta kvasca, glukoze, agara i vode. Njen pH nakon korekcije pomoću sulfatne kiseline i amonijeve lužine iznosi 7,2. Pripremljenoj podlozi dodaje se 30 μ L cikloheksamida kako bi se inhibirao eventualni rast kvasaca.

YM podloga služi rastu kvasaca i plijesni, to jest anaerobnih organizama. Sastoji se od ekstrakta kvasca, ekstrakta slada, peptona, glukoze, agara i vode. Njen pH nakon korekcije iznosi 6,2. Pripremljenoj podlozi dodaje se 30 μ L antibiotika, kako bi se inhibirao eventualni rast bakterija i pojačala selektivnost.

Postupak određivanja

Pripremljene podloge izlivena su u Petrijeve zdjelice, te zatim ostavljene da se ohlade i očvrstnu. Pospremljene su u laminar, gdje su u sterilnim uvjetima čekale uzorke za nacjepljivanje.

Iz komore se izuzimao uzorak (jedan aluminijski čep) iz komore bez eventualne kontaminacije otvaranjem komore koji je zatim stavljen u epruvetu s fiziološkom otopinom, provodilo se miješanje na vorteksu, te je 1 mL otopine nacjepljeno na hranjive podloge za rast bakterija i kvasaca u Petrijevim zdjelicama koje su inkubirane tijekom 48 sati pri odgovarajućoj temperaturi.

Nacjepljeni uzorak na PCA podlozi inkubira se na 35°C tijekom 48 sati, nakon čega se očitava broj poraslih bakterija u određenom volumenu uzorka.

Nacjepljeni uzorak na YM podlozi inkubira se na 31°C tijekom 48 sati, nakon čega se očitava broj poraslih kvasaca u određenom volumenu uzorka.

3.2.2. Određivanje vitamina C (HPLC)

Pribor i aparatura

- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Mikser (VacSy Zepter International Inc.)
- Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- Vortex MS2 Minishaker IKA
- Centrifuga (HETTICH, ROTOFIX 32)
- pH metar Mettler Toledo Seven easy
- HPLC Varian ProStar System opremljen sa: ProStar Solvent Delivery Modulom 230, injektorom Rheodyne 7125, detektorom Prostar 330 UV/VIS – Photodiode Array Detector (PDA)
- Filteri za pokretnu fazu, Nylon 66 Membranes; 0,45 μm, 47 mm Diameter, Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
- Kolona, Nucleosil C-18, 5 μm, 250 x 4,6 mm I.D., Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
- Predkolona Nucleosil C-18, 5 μm, 10 x 4,6 mm I.D., Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
- Odmjerne tikvice, volumena 10, 50 i 100 mL
- Pipete volumena 10 mL
- Mikropipete volumena 100 μL i 1000 μL
- Plastična ladica za vaganje

Kemikalije korištene za HPLC metodu određivanja vitamina C

- Metafosforna kiselina, kristalići kiseline
- Metafosforna kiselina, 2,5 %-tna
- Fosforna kiselina, 85 %-tna
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), 2,5 mM, pH 3,0
- Standard askorbinske kiseline, c=5 g/L

Uzorak je prije provođenja ekstrakcije homogeniziran pomoću štapnog miksera. Zatim je na analitičkoj vagi odvagano 2 g uzorka $\pm 0,0001$ g u plastičnoj kivetu, te je potom u nju pipetirano 10 mL metafosforne kiseline (2,5 %). Kivetaje zatim promiješana na vorteks uređaju. Kada je postupak ponovljen za sve uzorke, kivetesu stavljene u uređaj za centrifugu te su centrifugirane pri 3500rpm/10 min. Supernatant je iz kivetedekantiran preko filter papira u odmjerne tikvice volumena 10mL. Odmjerne tikvice u kojima je nedostajalo supernatanta dopunjene su do oznake metafosfornom kiselinom.

Dobiveni ekstrakt služio je za kromatografsko određivanje, te je bitno da je pripremljen neposredno prije kromatografske analize.

Iz pripremljenih ekstrakata zatim se vršilo određivanje askorbinske kiseline pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV/Vis PDA detekciju.

Ta se metoda temelji na izokratskoj eluaciji, pri čemu je kao mobilna faza korišten kalijev dihidrogenfosfat ($c= 25\text{mmol/L}$; $\text{pH}=3$).

Uvjeti kromatografskog određivanja askorbinske kiseline:

<u>Kolona:</u>	Nucleosil 100-5C18, 5 μm (250 \times 4,6 mm I.D.)
<u>Mobilna faza:</u>	Kalijev dihidrogenfosfat (25 mmol/L), pH 3,0
<u>Protok:</u>	1 mL/min
<u>Detektor:</u>	UV/VIS/PDA
<u>Temperatura:</u>	22 °C
<u>Vrijeme trajanja:</u>	15 min
<u>Injektirani volumen:</u>	20 μL
<u>Vrijeme uravnoteženja kolone:</u>	2 min

Vrijeme trajanja HPLC analize smanjeno je na deset minuta, zbog literaturnih podataka o retencijskom vremenu askorbinske kiseline koje iznosi nešto više od pet minuta (Gazdik i sur., 2008.). Nakon eluacije prva četiri utorka, primijećeno je da je retencijsko vrijeme askorbinske kiseline tek nešto više od tri minute, pa se vrijeme trajanja analize smanjilo na osam minuta.

Identifikacija askorbinske kiseline proizlazi iz usporedbe retencijskog vremena (t_R , vrijeme zadržavanja u koloni) s retencijskim vremenom standarda, te usporedbom karakterističnih UV/VIS spektara. Mjerenje askorbinske kiseline provodi se pri 245 nm.

Račun

Kvantitativna vrijednost računa se iz jednadžbe baždarnog pravca standarda.

Za pripremu baždarnog pravca pripremljena je otopina standarda askorbinske kiseline u koncentraciji od 5 g/L. Od te otopine askorbinske kiseline napravljena su razrjeđenja u koncentraciji od 10, 25, 50 i 100 mg/L. Sva priređena razrjeđenja kromatografski su analizirana, te se iz površine pikova i koncentracije spojeva u Excelu nacrtala baždarni pravac i izračuna pripadajuća jednadžba pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi $y = 641418 \cdot x$ (y- površina pika pri 245 nm; x- koncentracija askorbinske kiseline u mg/L), pri čemu je $R^2 = 0,9999$.



Slika 5. Baždarni pravac standarda askorbinske kiseline

Koncentracija askorbinske kiseline u uzorku jabuke izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca, korištenjem podataka o površini pikova dobivenih pomoću HPLC metode.

Iz dobivene površine pika preko jednadžbe pravca dobije se podatak o koncentraciji AA u mg/L (mg/1000mL) ekstrakta.

Uz podatak o površini pikova, za račun je potreban i podatak o masi svakog uzorka jabuke. Pošto je koncentracija izražena u jednoj litri ekstrakta, potrebno je izračunati kolika bi masa jabuke bila potrebna za pripremu te litre ekstrakta. S obzirom da je masa jabuke

homogenizirana u 10 mL, u svrhu pravilnog izračuna množi ju se sa 100. Ta dobivena masa sada predstavlja masu jabuke u kojoj se nalazi koncentracija u mg/1000 mL dobivena pomoću jednadžbe pravca. Kao zadnji korak računa, masa se svede na 100 g i time se dobije koncentracija askorbinske kiseline u 100 g svježe jabuke.

Na primjer:

$$y \text{ [površina pika]} = 641418 * x \text{ [koncentracija AA] [mg/L]} \rightarrow y_1=16103222$$

$$x_1 = 16103222/641418 = \mathbf{2,51 \text{ mg/1000 mL ekstrakta}}$$

Priprema ekstrakta provodi se iz uzorka mase $2 \text{ g} \pm 0,1$ i 10 mL metafosforne kiseline, a pošto je koncentracija izražena u mg/1000 mL nužno je računski doći do mase uzorka potrebne za pripremu 1000 mL ekstrakta.

$$2,0181 \text{ g [masa uzorka]} \rightarrow 10 \text{ mL [volumen metafosforne kiseline]}$$

$$? \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$? = \mathbf{201,81 \text{ g [u 1000 mL ekstrakta]}}$$

2,51 mg [masa AA u 1000mL ekstrakta] \rightarrow 201,81 g [masa jabuke za pripremu 1000 mL ekstrakta]

$$y \rightarrow 100 \text{ g}$$

$$y = \mathbf{1,244 \text{ mg/ 100 g}}$$

Iz pika površine 16103222 je dobiven podatak da izvagani uzorak mase 2,0181 g sadrži koncentraciju od 2,51 mg/L ekstrakta, iz čega je računski dokazano da taj uzorak sadrži askorbinsku kiselinu u koncentraciji od 1,244 mg/ 100 g jabuke.

Račun je proveden prema podacima u tablici 3.

Tablica 3. Podaci dobiveni HPLC analizom

Uzorak	Vrijeme retencije	Površina pika
0. dan	3,081	16103222
1. dan	3,102	1135978
2. dan	3,118	735707
4. dan	2,519	59383
7. dan	2,939	47212

3.2.3. Određivanje razine plinova u komori

Pribor

- Analizator plinova Oxy baby M+ (WITT-GASETECKNIK GmbH i Co. KG Njemačka)

Princip:

Pumpicom analizatora usisa se određeni volumen plina iz komore, te se na uređaju očita udio u % kisika i ugljikova dioksida u uzorku plina.

Postupak

Skladišna komora za potrebe mjerenja atmosfere ima izlaznu cijev koja je zatvorena kako ne bi ušao atmosferski zrak, a otvara se samo za vrijeme mjerenja sastava plinova. Pri mjerenju se ukloni zatvarač i prisloni se mjerni dio uređaja Oxy Baby, nalik igli. Pritiskom na tipku dolazi do mjerenja sastava smjese plinova iz komore te se vrijednosti pokazuju na zaslonu uređaja. Mjerenje se svaki dan provodilo dva puta u vremenskom rasponu od minute, kako ne bi došlo do slučajne pogreške.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kontrolirana atmosfera

Određivanje plinova u skladišnoj komori provodilo se svaki dan u isto vrijeme tijekom osam dana skladištenja, u svrhu provjere sastava atmosfere koji je trebao biti što bliži početnom (udio O₂ 11,9 %, a CO₂ 10,1 %). U tablici 4. prikazane su izmjerene vrijednosti udjela plinova tijekom skladištenja.

Tablica 4. Udio plinova u skladišnoj komori

Dan skladištenja	Udio CO ₂ (%)	Udio O ₂ (%)
0. dan	10,1	11,9
1. dan	10,4	12,0
2. dan	10,7	11,8
4. dan	10,4	12,2
7. dan	10,6	11,9

4.2. Dokazivanje sterilnosti

Mikrobiološko ispitivanje provodilo se 0., 1., 2., 4. i 7. dana nakon stavljanja aluminijskih čepova u skladišnu komoru.



Slika 6. a) PCA podloga, 8 dan,
Petrijeva zdjelica



Slika 6. b) PCA podloga, 8 dan,
podloga



**Slika 7. a) YM podloga, 8 dan,
Petrijeva zdjelica**



**Slika 7. b) YM podloga, 8 dan,
podloga**

Rezultati svih naciepljivanja (slika 6. a) i b); 7.a) i b)) bili su negativni, to jest nije došlo do rasta mikroorganizama niti na PCA niti na YM podlozi tijekom 8 dana skladištenja. Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima paralelno provedenog istraživanja mikrobiološke ispravnosti jabuke skladištene u identičnim uvjetima (nije bilo dio ovog rada), moguće je zaključiti da mikroorganizmi u skladišnu komoru ulaze sirovinom, a ne atmosferom koji se upuhuje za održavanje kontroliranih uvjeta, niti onom koja prodire zbog nesavršene hermetičnosti komore. Time je dokazano da upuhivanje atmosfere u skladišnu komoru ne dovodi do kontaminacije skladištenog MPV, te da je potrebno maksimalnu pažnju usmjeriti na sirovinu i njenu obradu prije početka procesa skladištenja.

4.3. Određivanje vitamina C pomoću HPLC metode



Slika 8. Količina vitamina C u uzorku tijekom vremena skladištenja (mg/100 g)

Iz rezultata prikazanih na slici 8 vidi se da je koncentracija vitamina C na početku skladištenja iznosila 1,244 mg, što je manje od literaturnih podataka prema kojima količina vitamina C u svježe ubranoj jabuci sorte Cripps Pink iznosi $5,33 \pm 0,7$ mg/ 100 g svježe jabuke (Kovač, 2010). Sama vrijednost vitamina C 0. dan niža je od očekivane, što se može pripisati činjenici da je sorta Cripps Pink kasna jesenska sorta, a da je istraživanje provedeno krajem veljače, što znači da je jabuka bila skladištena više mjeseci. Također, uvjeti skladištenja jabuke u međuvremenu nisu poznati iako je jabuka nabavljena u trgovačkom lancu koji se uobičajeno opskrbljuje iz velikih specijaliziranih hladnjača u kojima se jabuka čuva u kontroliranim uvjetima. Ipak, moguće je da su vrijeme i uvjeti skladištenja ne samo u hladnjači već i u samoj trgovini utjecali na razinu vitamina C u jabuci. Također je bitno napomenuti da se u jabukama većina vitamina C nalazi u kori (Wolfe, 2003), a plodovi na kojima je provedeno istraživanje bili su oguljeni

U tablici 5 prikazani su postotni udjeli vitamina C u skladištenim jabukama u odnosu na 0. dan koji predstavlja 100 % prisutnog vitamina C. Prema 0. danu izračunat je postotak za sve ostale dane. Prema prikazanim rezultatima (tablica 5) udio askorbinske kiseline smanjuje se za 97,39 % tijekom osam dana skladištenja, s najvećim padom između drugog (44,82 %) i trećeg mjerenja (3,69 %).

Tablica 5. Pad vitamina C tijekom skladištenja (%)

Dan skladištenja	% vitamina C
0. dan	100
1. dan	64.5
2. dan	44.8
4. dan	3,69
7. dan	2.61



Slika 9. Smanjenje udjela vitamina C između pojedinih mjerenja

Na slici 9 prikazana je dinamika smanjenja vitamina C između pojedinih dana. Tako se iz tih podataka jasno vidi da smanjenje udjela vitamina C tijekom 8 dana nije linearno. Između 0. i 1. dana, te između 1. i 2. dana kao i između 4. i 7. dana smanjenje iznosi oko 30 %, dok između 2. i 4. dana je zapaženo značajno smanjenje od 91,77 %.

Iz literature se može zaključiti da je jedan od mogućih razloga tako drastičnog pada vitamina C činjenica da je udio CO₂ u korištenoj smjesi plinova bio veći od 10 %, što se navodi kao maksimalna granica koncentracije ugljikova dioksida koja doprinosi očuvanju stabilnosti askorbinske kiseline (Kader, 2000). Nadalje, Rocculi i sur. (2006) navode da je moguć nagli pad tijekom prvih nekoliko dana zbog brze oksidacije egzogene askorbinske kiseline difundirale iz otopine protiv posmeđivanja (Rocculi, 2006). Međutim u našem slučaju drastičan pad nije doslovce prvih dana, već između 2. i 4. dana.

Unatoč ukupnom drastičnom smanjenju razine vitamina C, ipak najveće smanjenje zabilježeno je tek nakon 2 dana, a osnovna namjena komore je čuvanje narezanog voća tijekom prodaje i serviranja, te se ne očekuje da će u njoj voće stajati više od 2 dana. Istraživanje je provedeno tijekom 8 dana da se dobije bolji uvid u rad komore.

Radi boljeg razumijevanja uzroka takvih rezultata bilo bi potrebno napraviti daljnja istraživanja i to uz primjenu drugačijeg sastava plinova npr. s nižim udjelom CO₂ od 10 % u atmosferi i bez potapanja jabuka u otopinu askorbinske kiseline.

5. ZAKLJUČAK

1. U komori za čuvanje minimalno procesiranog voća održavaju se sterilni uvjeti tijekom 8 dana.
2. Upuhivanjem atmosfere potrebne za održavanje kontroliranih uvjeta kao ni prodorom okolnog zraka, zbog nesavršene izvedbe hermetičnosti komore, ne dolazi do unosa mikroorganizama u komoru.
3. Početna razina vitamina C u jabuci sorte Cripps Pink iznosi 1,244 mg u 100 g svježeg proizvoda.
4. Razina vitamina C tijekom vremena skladištenja kontinuirano pada i tijekom prva dva dana skladištenja u uvjetima istraživanja ostaje prihvatljiva.
5. Nakon prva dva dana pada na zanemarivu količinu te nakon osam dana skladištenja iznosi svega 0,0325 mg u 100 g svježeg proizvoda.
6. Unatoč određenoj nesavršenosti izvedbe komore moguće je održavati sterilne uvjete i zadani sastav atmosfere, a u prvim danim čuvanja i visoku razinu vitamina C.

6. LITERATURA

Aguayo, E., Requejo-Jackman, C., Stanley, R. i Woolf, A., (2010) Effects of calcium ascorbate treatments and storage atmosphere on antioxidant activity and quality of fresh-cut apple slices. *Postharvest Biol Tec* **57**, 52-60.

Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M. i Viñas, I., (2010) Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food microbiol* **27**, 70-76.

Altisent, R., Plaza, L., Alegre, I., Viñas, I. i Abadias, M., (2014) Comparative study of improved vs. traditional apple cultivars and their aptitude to be minimally processed as 'ready to eat' apple wedges. *LWT-Food Sci Technol* **58**, 541-549.

Anese, M., Manzano, M. i Nicoli, M.C., (1997) Quality of minimally processed apple slices using different modified atmosphere conditions, *J Food Quality* **20**, 359-370.

Anonymus 1, (2011) Proizvodnja jabuka i doprinos prehrani, <[Http://www.fruit-crops.com/apple-malus-domestica/](http://www.fruit-crops.com/apple-malus-domestica/)>. Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Anonymus 2, (2015.) Podjela na sorte ovisno o vremenu dozrijevanja, <<http://www.plantea.com.hr/jabuka/>>. Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Anonymus 3, (2016.) Cvijet i plod jabuke <<http://www.studyblue.com>>. Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Anonymus 4, (2015.) Strukturna formula vitamina C <[Http://www.ochempal.org](http://www.ochempal.org)>. Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Anonymus 5, (2016.) Sorta Cripps Pink, <[Http://www.agroklub.com](http://www.agroklub.com)>. Pristupljeno 27. srpnja 2016.

Bangerth, F., (1977) The effect of different partial pressures of CO₂, C₂H₄, and O₂ in the storage atmosphere on the ascorbic acid content of fruits and vegetables. *Qual. Plant.* **27**, 125–133.

Beuchat, L.R., (2002) Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes infect* **4**, 413-423.

Boun, H. R., i C. C. Huxsoll, (1991.) Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *J Food Sci* **56**, 416-418.

Bouayed, J., Hoffmann, L. i Bohn, T., (2011). Antioxidative mechanisms of whole-apple antioxidants employing different varieties from Luxembourg. *J Med Food* **14**, 1631-1637.

Cerjak, M., Vrhovec, R., Vojvodić, M. i Mesić, Ž., (2011) Analiza hrvatskog tržišta jabuka, *46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia* **311**, 314

Cocci, E., Rocculi, P., Romani, S. i Dalla Rosa, M., (2006) Changes in nutritional properties of minimally processed apples during storage, *Postharvest Biol Tec* **39**, 265-271.

Loyd Collet, (2011) About The Apple – *Malus domestica*, Oregon State University

Davies, M.B., Austin, J. i Partridge, D.A., (1991) Vitamin C: its chemistry and biochemistry, *RSC Paperbacks*

Delmotte, C. (1984) La teneur des pommes en vitamine C et les possibilités de son dosage: revue bibliographique. *Bull. Rech. Agron.* **19**, 269-284.

Drogoudi, P.D., Michailidis, Z. i Pantelidis, G., (2008) Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Sci Hortic-Amsterdam* **115**, 149-153.

Drouin, G., Godin, J.R. i Pagé, B., (2011.) The genetics of vitamin C loss in vertebrates. *Curr genomics* **12**, 371-378.

Fisher, C. (1999). Results of the apple breeding at Dresden-Pillnitz, Berlin. *Erwerbsobstbau* **41**, 65-74.

Garrett, E.H., (2002) Fresh-cut produce: tracks and trends. U: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables, Science, Technology and Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1–10.

Gil, M.I., Gorny, J.R. i Kader, A.A., (1998) Responses of Fuji' apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *HortScience* **33**, 305-309.

Juhnevica-Radenkova, K., Radenkova, V. i Seglina, D., (2016) Influence of 1-MCP treatment and storage conditions on the development of microorganisms on the surface of apples grown in Latvia. *Žemdirbystė (Agriculture)* **103**,215-220.

Khanizadeh, S., Hampson, C., DeEll, J. i Toivonen, P., (2007) September. Browning potential of new apple varieties. U: *XII EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics* **814**, 529-532.

Kovač, A., Skenderović Babojelić, M., Voća, S., Jagatić, A.M. i Klepo, T., (2008) Utjecaj roka berbe na kakvoću ploda jabuke (*Malus x domestica* Borkh.). *Pomologia Croatica* **13**,211-218.

Kovač, A., Babojelić, M.S., Pavičić, N., Voća, S., Voća, N., Dobričević, N., Jagatić, A.M. i Šindrak, Z., (2010) Influence of harvest time and storage duration on “Cripps Pink” apple cultivar (*Malus x domestica* Borkh) quality parameters. *Cyta–Journal of Food* **8**, 1-6.

Lamikanra, O. (ed)., (2002) *Fresh-cut Fruits and Vegetables. Science, Technology and Market*, CRC Press, Boca Raton

Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y. i Choi, W.Y., (2003) Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT-Food Sci and Technol* **36**, 323-329.

Lee, S.K. i Kader, A.A.,(2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Tec* **20**, 207-220

Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J. i Lee, C.Y., (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal Agr Food Chem* **51**, 6516-6520.

Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. i Sulakvelidze, A., (2003) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microb* **69**, 4519-4526.

Luby, J.J., Ferree, D.C. i Warrington, I.J., (2003) Taxonomic classification and brief history. *Apples: botany, production and uses*, 1-14.

Luo, Y. i Barbosa-Canovas, G.V., (1996) Preservation of apple slices using ascorbic acid and 4-hexylresorcinol. *Food Sci Technol Int* **2**, 315-321.

Machlin, L.J., (1990) *Handbook of Vitamins* (No. 40).

Mapson, L.W., (1970) Vitamins in fruits. *Biochemistry of fruits and their products* **1**, 376-387.

Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. i Aubert, S.Y., (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crc Cr Rev Food Sci* **34**,109-157.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. i Levine, M., (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll of Nutr* **22**, 18-35

Podsędek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B. i Markowski, J., (2000) Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur Food Res Technol* **210**, 268-272.

Pravilnik o dodacima prehrani (2011) Narodne novine **46**, Zagreb (NN 46/11)

Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (Zavod za botaniku) (2001) Presjek ploda jabuke, <[Http://www.botanic.hr](http://www.botanic.hr)>. Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S., Put, F.V.D., Dacombe, C. i Rice-Evans, C.A., (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical res* **36**, 217-233.

Rocculi, P., Romani, S. i Dalla Rosa, M., (2004) Evaluation of physico-chemical parameters of minimally processed apples packed in non-conventional modified atmosphere. *Food Res Int* **37**, 329-335.

Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorinstein, S. I Martín-Belloso, O., (2001) Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *J Agr Food Chem* **49**, 3685-3690.

Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Pliestić, S., Galić, A. i Novak, B., (2013) Nutritional Composition of Different Varieties of Apple Purees Sweetened with Green and White Stevia Powder. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)* **78**, 57-63.

Tavernier, J. i Jacquin, P., (1946) Influence of the partial elimination of nitrogenous matter in apple musts on the fermentation of cider; importance of defecation in cider making. *Chimie et Industrie* **56**, 104-115.

Thompson, M.D. i Thompson, H.J., (2009) Botanical diversity in vegetable and fruit intake: Potential health benefits. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*.

USDA (2016) National Agricultural Library, United States Department of Agriculture, <Ndb.nal.usda.gov>. Pristupljeno 21. kolovoza 2016.

Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A. I Jongen, W.M., (2001) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agr Food Chem* **49**, 3606-3613.

Varoquaux, P., (1991) Ready to use fresh fruits and vegetables. *Revue Generale du Froid (France)*.

Veberič, R., Schmitzer, V., Petkovšek, M.M. i Štampar, F., (2010.) Impact of shelf life on content of primary and secondary metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *J Food Sci* **75**, 461-468.

Veršec, P., (2014), Određivanje vitamina C u različitim sortama jabuka (Završni rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu)

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D. i Mattivi, F., (2004) Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 6532-6538.

Wolfe, K., Wu, X. i Liu, R.H., (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J Agr Food Chem* **51**, 609-614.

Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z. i Hu, X., (2007) Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem* **103**, 88-93.

Zubeckis, E., (1962.) Ascorbic acid content of fruit grown at Vineland, Ontario. *Annual Report Horticultural Experimental Station and Production Lab., Vineland, 1962*, 90-6.