

Primjena ekstrakata kore mandarine pri izradi biofilmova na bazi alginata

Jakuš-Mejarec, Vedrana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:291017>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Vedrana Jakuš-Mejarec
0058219898**

**PRIMJENA EKSTRAKATA KORE MANDARINE PRI IZRADI BIOFILMOVA NA
BAZI ALGINATA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Primjena ekstrakata kore mandarine pri izradi biofilmova na bazi alginata

Vedrana Jakuš-Mejarec, 0058219898

Sažetak: Kora mandarine, nusproizvod nastao tijekom obrade ploda mandarine, često se baca te se ne iskorištava njezin prehrambeno - biotehnološki potencijal. Ekstrakcijom kore i njezinom ugradnjom u strukturu biofilma nudi se ne samo mogućnost zbrinjavanja otpada, već i poboljšanje svojstava biofilmova te njihove daljnje primjene.

U ovom radu analiziran je utjecaj dodatka ekstrakata kore mandarine na sastav biofilmova na bazi alginata. Dobiveni rezultati su pokazali da biofilmovi s ekstraktom kore mandarine posjeduju različita fizikalna i kemijska svojstva (vlaga, topljivost, kapacitet vezanja ulja, boja i ukupni fenoli) u usporedbi s onima bez dodatka ekstrakta. Tako je dodatak vodenog ekstrakta s enzimima imao izrazit učinak na promjenu boje i povećanje kapaciteta vezanja ulja. S druge strane, uzorci s dodatkom puferskog ekstrakta s enzimima pokazali su nagli pad topljivosti. Time je potvrđeno da primjenom različitih ekstrakata kore mandarine dolazi do promjena u strukturi i stabilnosti biofilma, pa njihovim prikladnim odabirom moguće je utjecati i na odgovarajuća, poželjna fizikalno - kemijska svojstva biofilmova.

Ključne riječi: biofilm, alginat, kora mandarine, fizikalno - kemijska svojstva

Rad sadrži: 31 stranica, 7 slika, 8 tablica, 37 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Datum obrane: 10. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Application of mandarin peel extracts for the production of alginate-based biofilms

Vedrana Jakuš-Mejarec, 0058219898

Abstract: The peel of mandarins, a by-product of mandarin fruit processing, is often ignored and its food biotechnology potential is not fully exploited. The extraction of the ingredients from the peel and their incorporation into the biofilm structure offer an opportunity to reduce waste while improving the properties of biofilms and thus expanding their potential applications.

In this work, the influence of the addition of mandarin peel extracts on the composition of alginate-based biofilms was investigated. The results show that mandarin peel extract influences the physical and chemical properties of biofilms (moisture, solubility, oil binding capacity, color and total phenols). In this context, the addition of aqueous enzyme extract had a pronounced effect on the color change and an increase in oil binding capacity. On the other hand, the samples with the buffered enzyme extract showed a strong decrease in solubility. It was thus confirmed that the use of different mandarin peel extracts results in changes in the structure and stability of biofilms, so that the desired physical and chemical properties in particular can be influenced by their suitable selection.

Keywords: biofilm, alginate, mandarin peel, physico - chemical properties

Thesis contains: 31 pages, 7 figures, 8 tables, 37 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Antonela Ninčević Grassino, Ph.D/Associate Professor

Thesis defended: September, 10, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MANDARINA	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE	3
2.2.1. ETERIČNA ULJA.....	4
2.2.2. FENOLNI SPOJEVI.....	4
2.2.3. OSTALI SPOJEVI	5
2.3. BIOFILMOVI	5
2.4. ALGINAT	7
2.4.1. KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA ALGINATA	7
2.4.2. DOBIVANJE ALGINATA.....	8
2.4.3. PRIMJENA ALGINATA	8
2.5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA KEMIJSKOG SASTAVA.....	9
2.5.1. GRAVIMETRIJSKA ANALIZA.....	9
2.5.2. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA.....	10
2.6. KARAKTERIZACIJA BIOFILMOVA	11
2.6.1. ODREĐIVANJE BOJE.....	11
2.6.2. ODREĐIVANJE TEKSTURE.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. MATERIJAL	12
3.1.1. KEMIKALIJE.....	12
3.1.2. APARATURA I PRIBOR.....	12
3.2. METODE RADA.....	13
3.2.1. PRIPREMA BIOFILMOVA	13
3.2.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE U BIOFILMOVIMA	15
3.2.3. ODREĐIVANJE INDEKSA TOPLJIVOSTI BIOFILMOVA	15
3.2.4. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA ULJA BIOFILMOVA	15
3.2.5. ODREĐIVANJE BOJE BIOFILMOVA	16
3.2.6. ODREĐIVANJE TEKSTURE BIOFILMOVA.....	17

3.2.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA KORE MANDARINE I UZORCIMA BIOFILMOVA	17
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ODREĐIVANJE VLAGE I TOPLJIVOSTI U VODI BIOFILMOVA.....	20
4.2. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA ULJA.....	21
4.3. ODREĐIVANJE TEKSTURE.....	22
4.4. ODREĐIVANJE BOJE	22
4.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA KORE MANDARINE I UZORCIMA BIOFILMOVA.....	26
5. ZAKLJUČCI	27
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Agrumi se široko uzgajaju diljem svijeta i uglavnom se pretvaraju u prehrambene proizvode na bazi citrusa kao što su pića, konzervirano voće i džemovi (Huang i sur., 2021). Poznata je njihova nutritivna vrijednost i pozitivni učinak na ljudsko zdravlje, a njihova proizvodnja u svijetu sve više raste. Prilikom proizvodnje prehrambenih proizvoda uglavnom se koristi sok agruma, dok se ostatak ploda poput kore, sjemenki i pulpe odbacuje. Sokovi od citrusa čine samo oko 50 % težine voća (Sharma i sur., 2017), znači da se ostalih 50 % smatra otpadom i uglavnom se spaljuje ili upotrebljava za proizvodnju stočne hrane. Kako se proizvodnja agruma u svijetu povećava, tako dolazi i do povećanja količine otpada, osobito kora koja se zakopava i spaljuje te predstavlja veliki ekološki problem. Nedovoljno iskorištavanje ovog nusproizvoda ne samo da rezultira gubitkom vrijednih resursa, s obzirom na to da je kora bogata brojnim spojevima, već i dodatno opterećuje sustave za zbrinjavanje otpada ukoliko se pravilno ne obradi i iskoristi na odgovarajući način. Zbog toga se sve više istražuje mogućnost pretvorbe kore u ekonomski vrijedne proizvode, čime bi se omogućilo stvaranje vrijednih proizvoda iz inače neiskorištenih resursa.

Mandarina je biljka koja pripada porodici agruma. Za konzumaciju i proizvodnju uglavnom se koristi plod, dok je kora često zanemarena. Kora mandarine bogata je različitim kemijskim spojevima poput vitamina, minerala, karotenoida, polifenola i proteina. Zahvaljujući navedenom kemijskom sastavu, kora mandarine predstavlja značajan potencijal za brojne inovativne primjene.

S obzirom da se danas mnoge industrije sve više okreću održivom zbrinjavanju otpada, prepoznata je važnost primjene biorazgradivih materijala na bazi različitih polimera kao što je alginat. Biopolimeri na bazi alginata, polisaharida dobivenog iz smeđih algi, mogu se modificirati dodatkom kemijskih ili prirodnih spojeva u svrhu promjene mehaničkih, nutritivnih, funkcionalnih i organoleptičkih svojstava. Oplemenjivanje biofilmova dodatkom ekstrakta ima moguću primjenu u brojnim industrijama poput prehrambene, farmaceutske industrije i medicine.

U ovom radu, kao primjer takvog pristupa su korišteni ekstrakti kore mandarine (vodeni ekstrakt, vodeni i pufer ekstrakt sa dodatkom enzima) za proizvodnju biofilmova na bazi alginata, gdje se kombiniranjem ekstrakata kore mandarine s biopolimerima nudi održivo rješenje za poboljšanje svojstava biofilmova kao i iskorištavanje nusproizvoda industrije u smislu njihova ekonomičnog zbrinjavanja. Karakterizacija biofilmova je provedena određivanjem sadržaja vlage, topljivosti, kapaciteta vezanja ulja te boje, teksture i sadržaja ukupnih fenola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MANDARINA

Mandarina (lat. *Citrus reticulata*) je biljka koja potječe iz porodice *Rutaceae*, a pripada rodu *Citrusa*. Uzgaja se pretežno u subtropskim predjelima zbog osjetljivosti na hladnoću, posebno na temperature ispod 0 °C.

Mandarine su mala zimzelena, trnovita stabla visine oko 2 do 3 m. Lišće može biti okruglo i široko ili tanko i zašiljeno na vrhu. Cvjetovi su mali i bijeli, rastu pojedinačno ili skupljeni u malenim grozdovima. Zreli plod je svijetlo narančaste ili crvenkasto narančaste boje, prekriven tankom, narančasto obojenom korom koja je lagano spljoštena na krajevima. Plod mandarine (slika 1) sastoji se od mesnatog dijela (endokarpa) i kore (perikarpa). Perikarp se sastoji od epikarpa (flaveda) i mezokarpa (albeda). Epikarp (flavedo) je obojeni dio kore koji sadrži eterične uljne žlijezde, a mezokarp (albedo) je sloj bijelog spužvastog tkiva ispod flaveda. Endokarp, pulpa ili voćno meso predstavlja jestivi dio ploda. Sastoji se od 9 -14 segmenta koji sadrže sok slatkog i kiselog okusa i mirisa. Mogu biti bez sjemenki ili sadržavati mali broj sjemenki što se smatra nepoželjnom komercijalnom karakteristikom. Odnos udjela jestivih i nejestivih dijelova mandarine prikazan je u tablici 1.



Slika 1. Mandarina (lat. *Citrus reticulata*) (Anonymous 1, 2022)

Mandarina predstavlja raznoliku i specifičnu skupinu unutar citrusa, s bogatom raznolikošću vrsta i sorti. Međusobno se razlikuju po svojim morfološkim i biološkim osobinama, a njihova zajednička značajka su plodovi s mrežastim nitima koje se nalaze između kore i kriški.

Tablica 1. Sastav mandarine - udjeli jestivih i nejestivih (otpadnih) dijelova mandarine (Mahato i sur., 2019)

Komponenta	Udio u cijelom voću (%)	Udio u ukupnoj krutoj tvari (%)
Cijelo voće	100	15 - 20
Sok	30 - 40	10 - 13
Kora (flavedo i albedo)	7 - 11	25 - 30
Pulpa i membrane	45 - 55	15 - 20
Sjemenke	2	33 - 40

Prema izvješću Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (*engl.* United States Department of Agriculture, USDA) za 2023./2024. godinu svjetska proizvodnja mandarina iznosi 37,98 milijuna tona, što je 3 % više u odnosu na 2022./2023 (USDA, 2024). Najveći svjetski proizvođač mandarina je Kina, a slijede je Europska unija i Turska (USDA, 2024).

Svjetska proizvodnja mandarina uglavnom je usmjerena na konzumaciju u svježem obliku, a potrošnja konstantno raste. Osim u svježem obliku, mandarina se koristi u prehrambenoj industriji u obliku bojila za hranu, dodataka hrani, funkcionalni sastojak hrane, industriji pića, ali i drugim granama industrije poput kozmetičke i farmaceutske industrije (Wedamulla i sur., 2022).

U Republici Hrvatskoj mandarine se uzgajaju duž obale srednje i južne Dalmacije. Godišnja proizvodnja mandarina u glavnom uzgojnom području u Hrvatskoj, dolini Neretve, iznosi u prosjeku oko 40 000 do 50 000 tona godišnje. Od voća samo u proizvodnji mandarina Hrvatska pokriva potrebe domaće potrošnje i ima dovoljno za izvoz (Kaleb, 2014).

2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE MANDARINE

Oko 50 % mandarina prerađuje se sa svrhom dobivanja soka, a polovica se odbacuje kao otpad koji uglavnom uključuje koru, pulpu te prerane i oštećene plodove (Negro i sur., 2016). Iako često zanemarena, kora mandarine bogata je raznovrsnim kemijskim spojevima s velikim potencijalom za industrijsku primjenu.

Bogata je eteričnim uljima, flavonoidima i antioksidansima te posjeduje protuupalna i antimikrobna svojstva. U svrhu izolacije bioaktivnih spojeva iz kore provode se različite metode ekstrakcije među kojima se najčešće koriste ekstrakcija vodenom parom, ekstrakcija otapalom i hladno prešanje, a kao suvremene metode ekstrakcije koriste se ekstrakcija

mikrovalovima, ekstrakcija ultrazvukom i ekstrakcija superkričnim fluidom. Novije metode ekstrakcije predstavljaju tzv. „zeleniju“ alternativu tradicionalnim tehnikama budući da zahtijevaju manju upotrebu energije i otapala. Iako posjeduje visoku nutritivnu vrijednost, kora se obično suši, miješa sa osušenom pulpom i koristi kao hrana za stoku. Glavne prednosti iskorištavanja kore citrusa kao industrijskog otpada su da je lako dostupan i jeftin izvor biomase koji se može obnoviti (Chavan i sur., 2018). Može se koristiti za proizvodnju vrijednih proizvoda poput bioplina, etanola ili hlapljivih aroma (Djilas i sur., 2009) ili se može koristiti za ekstrakciju, odvajanje i pročišćavanje bioaktivnih molekula važnih za pripravu zdravih proizvoda.

2.2.1. Eterična ulja

U sastavu eteričnih ulja najčešće se nalaze spojevi kao što su: monoterpenski i seskviterpenski ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, ketoni, fenoli, esteri, laktoni i fenilpropani (Marković, 2005), odnosno radi se o smjesi hlapljivih spojeva.

Kao "nusproizvodi" biljnog metabolizma, formiraju se u specijaliziranim biljnim tkivima s uljnim žlijezdama. Kod mandarine su prisutni u kori, a do oslobađanja karakterističnog mirisa dolazi pri mehaničkom oštećenju biljnog materijala (guljenje ili tješenje). Njihova uloga obuhvaća privlačenje kukaca, odbijanje grabežljivaca i zaštitu biljke od bolesti, čime predstavljaju prirodni obrambeni mehanizam koji pomaže biljkama u preživljavanju.

Najvažniji faktor koji određuje djelovanje nekog eteričnog ulja jest biljna vrsta. Promjenjivost klimatskih uvjeta, razlika u vrstama tla i vremenu utječe da sastojci eteričnog ulja variraju po količini i sastavu. Prema Ferencić i suradnicima (2016) svako eterično ulje je zasebna, neponovljiva mješavina prirodnih spojeva.

2.2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi prisutni u biljkama su mnogobrojni i ubrajaju se u sekundarne metabolite. Kemijski, oni su skupina spojeva koja sadrži fenolnu ili hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Fenolni spojevi su prisutni u vanjskim dijelovima citrusnog voća i štite unutarnje tkivo od štetnog UV i IR zračenja, kao i od mikrobnih infekcija (Mahato i sur., 2019).

Flavonoidi su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva kojih je u mandarini oko šezdesetak. Posjeduju brojna ljekovita svojstva, uključujući antikancerogena, antioksidativna, protuupalna i antivirusna svojstva (Ullah i sur., 2020). U skupinu spojeva flavonoida ubrajaju se i tangeretin i nobiletin, a posebno su značajni zbog svog farmakološkog učinka. Koriste se u razvoju novih lijekova te u prehrambenoj industriji gdje se široko primjenjuju u procesima

konzerviranja hrane.

2.2.3. Ostali spojevi

Jedan od glavnih izvora komercijalnog pektina upravo je kora citrusa. Pektin je topivo vlakno, polisaharid, a za njegovo izdvajanje potrebno je provesti postupak ekstrakcije uz primjenu odgovarajućeg otapala. U prehrambenom sektoru, tradicionalna uporaba kao sredstva za želiranje, sredstva za zgušnjavanje i stabilizatora nadopunjuje se sve većom primjenom pektina kao zamjene za masnoću i funkcionalnog sastojka koji promiče zdravlje (Peng i sur., 2014). U ljudskoj prehrani služi kao izvor dijetalnih vlakana, dovodi do snižavanja kolesterola, ublažavanja konstipacije, simptoma iritabilnog crijeva te daje osjećaj sitosti i tako pomaže u reguliranju težine.

Vitamin C važan je antioksidativni spoj kore citrusnog voća. Sadržaj vitamina C u citrusima varira među različitim vrstama i na njega uvelike utječu mnogi čimbenici prije berbe, a kao jedan od najznačajnijih navodi se svjetlost. Vitamin C važan je za rast i oporavak tkiva u svim dijelovima tijela i ojačava imunološki sustav (Mahato i sur., 2019).

Provedeno istraživanje Czech i suradnika (2020) na različitim vrstama citrusnog voća, uključujući mandarine navodi kako su pulpa i kora citrusnog voća vrijedan izvor makro i mikronutrijenata. Međutim, u kori većine testiranih plodova nalazi se daleko veća količina nego u pulpi. Tako je kora mandarine iznimno vrijedan izvor mangana koji sudjeluje u aktivnostima mnogih enzima, uključujući neke u metabolizmu lipida, bjelančevina i ugljikohidrata. Mandarine su također dobar izvor kalija, magnezija i kalcija.

2.3. BIOFILMOVI

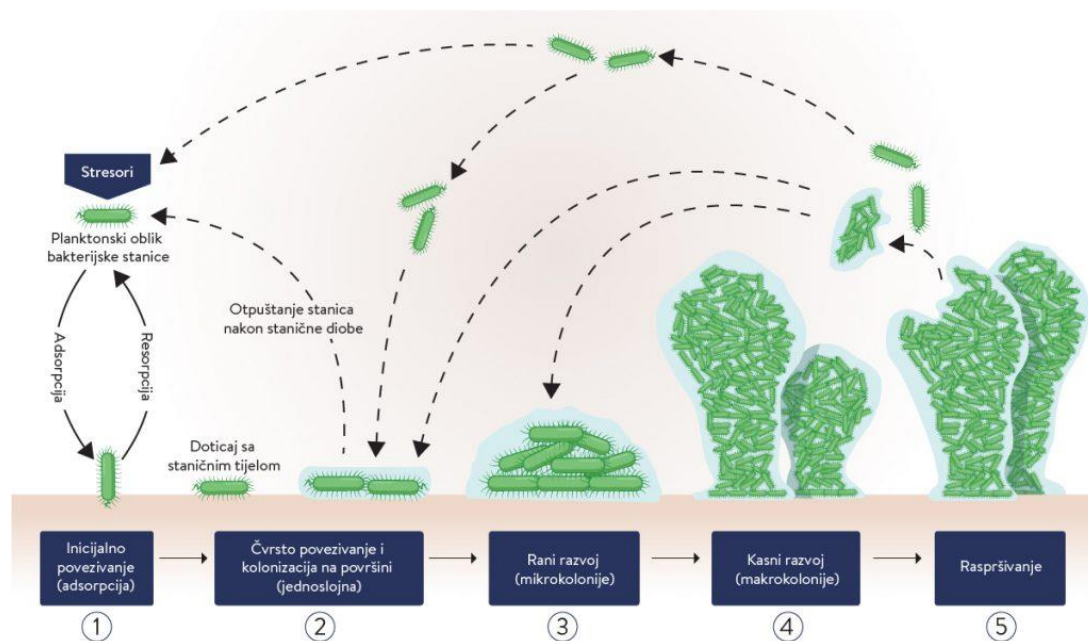
Biofilm je skup mikrobnih stanica koje su nepovratno povezane (ne uklanjaju se blagim ispiranjem) s površinom i zatvorene u matricu prvenstveno polisaharidnog materijala (Donlan, 2002). Takav način organizacije može se naći u ekosustavima poput jezera, površinskih voda, podzemnih voda i kopnenih ekosustava. Biofilmovi se stvaraju na biotičkim (npr. sluznica, koža) i abiotičkim (npr. plastika, staklo) površinama u prirodi ili na ventilacijskim otvorima i medicinskoj opremi.

Bakterijski biofilm proizvodi oko 80 % bakterija odgovornih za kronične infekcije i važan je mehanizam virulencije, izazivajući otpornost na antimikrobne lijekove i izbjegavanje imunskog sustava domaćina (Koo i sur., 2017). Bakterijama koje se nalaze u biofilmovima omogućen je "višestanični stil života" čime se povećava njezino preživljavanje u različitim uvjetima okoliša. Dolazi do povećanog prijenosa gena i suradnje među mikroorganizmima, što

dovodi do povećane otpornosti na antibiotike, bakteriochine i ekstremne uvjete te na taj način predstavlja ozbiljan problem u području prehrambene industrije i zdravstva.

Matrica biofilma sastoji se od izvanstaničnih polimernih tvari (IPT), uglavnom polisaharida, lipida, proteinske izvanstanične DNA (eDNA) i amfifilnih molekula koje tvore skelu za trodimenzionalnu arhitekturu biofilma. Navedeni biopolimeri omogućuju prianjanje stanica na različite površine, povećavaju čvrstoću biofilma i štite mikrobne stanice od vanjskog stresa (zračenje, isušivanje, štetni agensi i sl.). Dakle, strukturne komponente matrice stvaraju visoko hidratiziranu, robusnu strukturu s visokom vlačnom čvrstoćom koja drži bakterije u neposrednoj blizini, omogućujući intimne međustaničke interakcije i razmjenu DNK (Flemming i Wingender, 2010). Unutar biofilma se nalazi "cirkulacijski sustav" sastavljen od vodenih kanala koji omogućuje unos hranjivih i uklanjanje otpadnih tvari, prilikom čega otpad jedne vrste može poslužiti kao metabolički supstrat druge vrste.

Na slici 3. prikazano je pet glavnih koraka za formiranje i širenje biofilмова (prilagođeno na temelju Guzmán-Soto i sur., 2021).



Slika 2. Shematski prikaz stvaranja biofilma pojedinačnih bakterijskih vrsta na čvrstoj površini (prilagođeno na temelju Guzmán-Soto i sur., 2021)

Uglavnom se uz nastanak biofilma veže negativna konotacija, s obzirom da omogućavaju mikroorganizmima preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i prianjanje na čvrste površine. Naime, mogu predstavljati čest problem u mnogim industrijama i zdravstvenom okruženju kao izvor kontaminacije, odnosno infekcije. Međutim, formiranje biofilмова ima i brojne prednosti

koje su često zanemarene. Pozitivni učinci formiranja biofilma istraženi su tako i u prehrambenoj industriji, poput poboljšanja zdravlja biljaka i produktivnosti prehrambenih proizvoda, kao agensa za pročišćavanje vode i otpadnih voda, kao sredstava za smanjenje količine viška mulja u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda. Razvoj jestivih biofilмова, fermentiranih prehrambenih proizvoda kao i proizvodnja biorazgradive ambalaže za hranu također su dio korisne uloge biofilмова u prehrambenoj industriji (Olanbiwoninu i Popoola, 2023).

Biofilmovi nastali od prirodnih polimera, poput polisaharida, lipida i proteina, kada se ispuste u okoliš prevode se u jednostavne spojeve koji ne štete biosustavu. Tako alginat, egzopolisaharid, koji zbog svojih svojstava kao što su ne toksičnost, dobro svojstva želiranja i mogućnosti jednostavne modifikacije ima velik potencijal u pripremi biofilмова.

2.4. ALGINAT

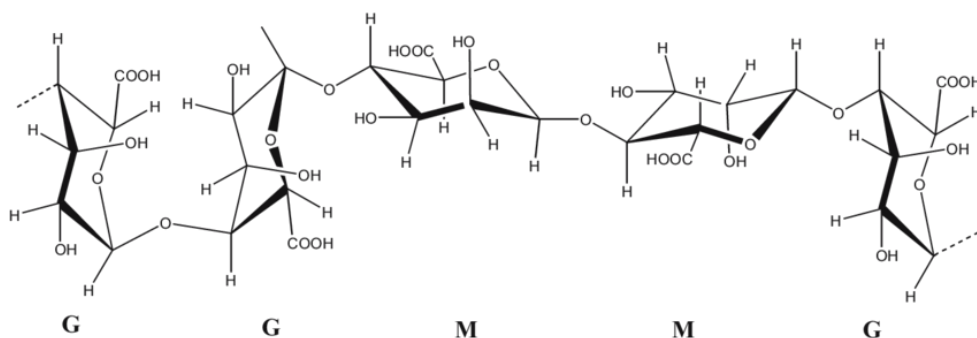
Alginat je nerazgranati, hidrofilni polisaharid koji se obično dobiva iz smeđih algi i nekih bakterija, kao što su bakterija roda *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Dostupan je u prahu, granulama i filamentima, a boja mu je žučkasto smeđa do bijela. Alginska kiselina i njene soli poznate pod nazivom alginati, prisutne su u staničnom zidu i intracelularnom matriksu tkiva smeđih algi, čineći prosječno 40 % suhe tvari. Njihova prisutnost osigurava fleksibilnost i čvrstoću algama i štiti ih od mogućih ozljeda. Intenzivnim istraživanjima ovog prirodnog polimera otkrivena su njegova svojstva zadržavanja vode, stvaranja filmova i gelova te sposobnost stabilizacije emulzija i disperzija zbog čega je našao široku primjenu u dermatologiji, stomatologiji, gastroenterologiji, farmaceutskoj tehnologiji te prehrambenoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji (Draget i sur., 2005).

2.4.1. Kemijska struktura i svojstva alginata

Alginati se sastoje od (1,4) povezane β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske kiseline (G) (slika 2), obje u piranoznoj konformaciji, raspoređene u homogene (MM ili GG) i heterogene (MG ili GM) blokove (Hentati i sur., 2018).

Fizikalno - kemijska svojstva (viskoznost, prijelaz sol/gel i upijanje vode) uvelike ovise o udjelu i raspodjeli monomera (manuronska i guluronska kiselina) u lancu, a shodno tome i o duljini polimernog lanca. Jedno od najviše istraživanih svojstava alginata je njegova sposobnost stvaranja hidrogelova putem umrežavanja s dvovalentnim ili trovalentnim kationima (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+}). Ovi kationi pokazuju različite afinitete vezanja alginata, što rezultira hidrogelovima s različitim strukturnim i mehaničkim karakteristikama (Kabir i sur.,

2020).



Slika 3. Struktura alginata (Anonymous 2, 2017)

Udio i omjer G, odnosno M jedinica može značajno utjecati na njegova svojstva geliranja. Stoga, alginat s viskim udjelom M jedinica ($M/G > 1$) stvara elastične gelove, dok alginat s niskim M/G omjerom ($M/G < 1$) stvara kompaktne i tvrde gelove. U slučaju niskog M/G omjera dolazi do stvaranja modela "jajne kutije" čime se povećava mehanička čvrstoća nastalih gelova u vodenim otopinama.

2.4.2. Dobivanje alginata

Komercijalno dostupan alginat obično se ekstrahira iz smeđih algi (*Phaeophyceae*), uključujući *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera* (Smidsrod i Skjak-Bræk, 1990) obradom s vodenim otopinama lužina, najčešće otopinom natrijeva hidroksida. Ekstrakt alginata se filtrira, dobivenom filtratu se dodaje natrijev ili kalcijev klorid što dovodi do taloženja alginata. Za dobivanje alginske kiseline, dobivena alginatna sol se obrađuje korištenjem razrijeđene klorovodične kiseline. Dodatnim pročišćavanjem dobiva se prah natrijevog alginata topiv u vodi.

Bakterijski alginat može se proizvesti iz bakterija poput *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Bakterije su dobro poznati mikroorganizmi koje je relativno jednostavno modificirati što je omogućilo napredak u regulaciji biosinteze alginata. Put biosinteze alginata općenito se dijeli na: *i*) sintezu supstrata prekursora, *ii*) polimerizaciju i prijenos citoplazmatske membrane, *iii*) periplazmatski prijenos i modifikaciju i *iv*) izvoz kroz vanjsku membranu (Remminghorst i Rehm, 2006). Modifikacijom biosintetskog puta moguće je proizvesti alginat sa posebno prilagođenim značajkama u odnosu na alginat dobiven ekstrakcijom iz smeđih algi.

2.4.3. Primjena alginata

Alginat je općenito priznat kao siguran, netoksičan, neantigen, zadovoljavajuće

biokompatibilan i dovoljno biorazgradiv (Lee i Mooney, 2012). Zahvaljujući svojim povoljnim svojstvima, alginat se prvotno koristio kao sastojak i aditiv u prehrambenoj industriji, no s vremenom je njegova primjena proširena na druge industrije i primjene, uključujući medicinski, farmaceutski i kozmetički sektor, ali i u svrhu uklanjanja različitih zagađivača iz otpadnih voda. U prehrambenoj industriji pokazao se kao efektivan ugušćivač i stabilizator. Koristi se i za premazivanje voća i povrća, odnosno, služi kao baza pri proizvodnji jestivih filmova.

Jestivi filmovi definirani su kao tanki sloj materijala koji se može konzumirati i predstavlja prepreku za protok vlage, kisika i otopljenih tvari (Bourtoom, 2008). Na taj se način sprječava gubitak nutrijenata, rast nepoželjnih mikroorganizama i raspadanje prilikom transporta.

U farmaceutskoj industriji se koristi kao vezivno sredstvo u tabletama, osigurava zaštitu ljekovite komponente od biološke razgradnje prilikom transporta te njezino kontrolirano otpuštanje na ciljanom mjestu djelovanja.

Njegov učinak je poznat i u području medicine gdje se koristi kao sredstvo za zacjeljivanja rana, in vitro kulturama stanica te području tkivnog inženjerstva. Djelovanje alginata je prošireno i na razvoj proizvoda koji se koriste u liječenju metaboličkih poremećaja kao što su pretilost i dijabetes. Suvremena istraživanja usmjerena su na kombinirani učinak alginata s drugim prirodnim i sintetskim polimerima radi njihove primjene u područjima kao što su tretman matičnim stanicama iz masnog tkiva te regeneraciji hrskavice i kostiju

2.5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA KEMIJSKOG SASTAVA

2.5.1. Gravimetrijska analiza

Gravimetrijske metode analize osnivaju se na mjerenju mase analitičkom vagom, instrumentom koji daje podatke visoke točnosti i preciznosti (Skoog, 1999). Gravimetrija se može podijeliti na dvije vrste: taložne metode i metode ishlapljivanja. Kod taložnih metoda komponente se iz otopine izdvajaju u obliku teško topljivog taloga. Nakon što se provede postupak taloženja, uz prikladni reagens, dobiveni talog se filtrira. Propuštanjem suspenzije kroz filter papir dolazi do kvantitativnog odvajanja taloga od tekućine u kojoj je suspendiran. Talog se ispire od onečišćenja, a zatim se termički obrađuje sušenjem i/ili žarenjem ovisno o svojstvima taloga. Hlađenje taloga do sobne temperature odvija se u eksikatoru nakon čega se pristupa vaganju i analizi podataka. Uvjet za uspješnu primjenu gravimetrijske metode analize jest minimalan udjel analita u uzorku od 1 % i neograničena količina uzorka (Radić i Kukoč Modun, 2016). Rezultati analize dobivaju se mjerenjem mase, odnosno volumena uzorka za analizu ili određivanjem svojstva koje je proporcionalno količini analita u uzorku.

2.5.2. UV/Vis spektrofotometrija

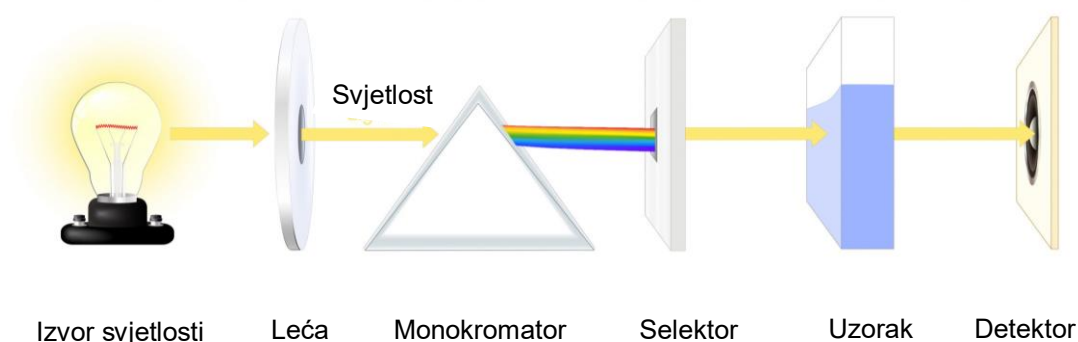
UV/Vis spektroskopija je analitička metoda kod koje se uzorak osvjetljava elektromagnetskim zrakama ultraljubičastog (UV) ili vidljivog (Vis) dijela spektra. Uzorak djelomično apsorbira svjetlost valne duljine 200 - 400 nm (UV), odnosno 400 - 800 nm (Vis), a preostali dio svjetlosti samo prolazi kroz uzorak i njega bilježi detektor. Metoda služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka. Kvalitativna analiza služi za utvrđivanje prisutnost određene tvari u uzorku, odnosno određuje se sastav, dok se kvantitativnom određuje koncentracija pojedine tvari u ispitivanom uzorku. U kvantitativnoj analizi, odnos između apsorbancije i množinske koncentracije izražen je Lambert-Beerovim zakonom [1]:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad [1]$$

gdje je:

- A - apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti
- ε - molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- b - duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm)
- c - koncentracija tvari u otopini ($mol \cdot L^{-1}$).

Spektrofotometar je uređaj koji mjeri omjer intenziteta upadnog i izlaznog elektromagnetskog zračenja u ovisnosti o valnoj duljini. Osnovni dijelovi uređaja (slika 4) su: izvor zračenja (deuterijeva lampa ili volframova nit), monokromator koji suzuje zračenje na skupinu susjednih valnih duljina, kiveta s uzorkom, detektor i računalo za obradu i analizu podataka. Spektrofotometri se često koriste u industriji kako bi se osigurala dosljednost i kvaliteta proizvoda.

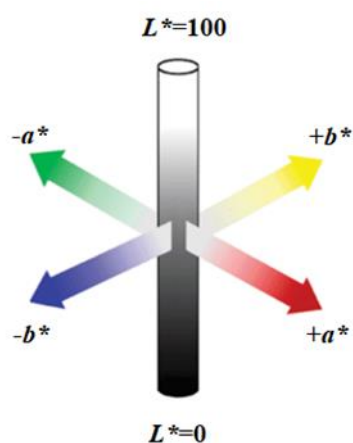


Slika 4. Shematski prikaz osnovne strukture spektrofotometra (Anonymous 3, 2023)

2.6. KARAKTERIZACIJA BIOFILMOVA

2.6.1. Određivanje boje

Ljudsko oko može vidjeti milijune boja, međutim ne prepoznaje varijacije među sličnima. Čimbenici poput kuta promatranja, osvjetljenja, dobi osobe može utjecati na ljudsku percepciju boja. Zbog toga je za kvantifikaciju svojstava boje i određivanje brojčane razlike između nijansi razvijen sustav pod nazivom CIE $L^*a^*b^*$ (slika 5), koji pokriva čitav vidljivi spektar ljudskog oka. Radi se o trodimenzionalnom prostoru koji karakteriziraju tri međusobno okomite osi: akromatska L^* os i dvije kromatske a^* i b^* osi. Za određivanje parametara L^* , a^* , b^* koristi se uređaj kolorimetar. Na temelju dobivenih vrijednosti može se izračunati kolorimetrijska razlika (ΔE) i usporediti sa standardom te dobiti točnu i preciznu informaciju o boji našeg uzorka. L^* vrijednost predstavlja svjetlinu koristeći numerički raspon od 0 (crna) do 100 (bijela). Vrijednost a^* predstavlja raspon od crvene do zelene boje, gdje je pozitivna vrijednost ($+a^*$) crvena boja, a negativna vrijednost ($-a^*$) zelena boja.



Slika 5. Trodimenzionalni CIE $L^*a^*b^*$ sustav boja (Delazio i sur., 2017)

2.6.2. Određivanje teksture

Analiza teksture provodi se s ciljem uspješne proizvodnje i kontrole kvalitete proizvoda, prvenstveno prehrambenih namirnica. Nastoje se kvantificirati različita fizikalna svojstva poput tvrdoće, elastičnosti, lomljivosti, kohezivnosti i slično. Tekstura ima važnu ulogu kod potrošača, ona utječe na senzornu ocjenu okusa, a time i na prihvaćenost samog proizvoda (Brnčić i sur., 2006). Za određivanje teksturnih svojstava hrane koriste se mjerni uređaji, analizatori teksture. Primjenom vanjske sile na određeni materijal dolazi do promjene oblika i položaja ovisno o unutarnjim svojstvima samog materijala. Odgovor na primjenu vanjske sile bilježi se u obliku sile, deformacije i vremena.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Pri izradi biofilmova na bazi alginata sa dodatkom ekstrakata kore mandarine korišteni su: *i*) vodeni ekstrakt kore mandarine, *ii*) vodeni ekstrakt kore mandarine sa dodatkom enzima i *iii*) puferski ekstrakt kore mandarine sa dodatkom enzima. Navedeni ekstrakti su prethodno pripremljeni u Laboratoriju za analitičku kemiju Clevenger vodenom destilacijom. Osim pročišćene vode pri ekstrakciji kore mandarine korišten je i pufer pripremljen vaganjem 9,60 g limunske kiselina i otapanjem u 900 mL pročišćene vode. Dodatkom određenog volumena otopine natrijeva hidroksida ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) podešena je pH vrijednost pufera na 5. Za vodene i puferske ekstrakte sa dodatkom enzima proveden je i predtretman enzimima pektinazom, celulazom i ksilanazom (1:1:1), a postupak predtretmana uz manje modifikacije opisan je u radovima Dent i suradnika (2023) i Miljanović i suradnika (2020).

3.1.1. Kemikalije

- Etanol 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin- Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros organics, New Jersey, USA)
- Glicerol (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev alginat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Analizator teksture TA.HDPlus (Stable Mycro System, Engleska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica-Minolta, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Aluminijske posudice
- Automatska pipeta 0,1 - 1 mL (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)

- Eksikator sa silika gelom
- Falcon kivete
- Filter papir
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Kapaljka
- Kivete
- Menzure od 10 i 100 mL
- Metalna špatula
- Odmjerne tikvice od 25, 50 i 100 mL
- Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- Porculanske zdjelice
- Propipeta
- Staklene čaše od 100 i 150 mL
- Stakleni lijevci
- Satno staklo
- Stakleni štapići

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema biofilmova

Postupak pripreme biofilmova na bazi alginata uključivao je otapanje alginata u pročišćenoj vodi i puferu (referentni uzorci), odnosno otapanje alginata u tri različita ekstrakta kore mandarine: *i*) vodeni ekstrakt, *ii*) vodeni ekstrakt sa dodatkom enzima i *iii*) puferski ekstrakt sa dodatkom enzima (tablica 2a).

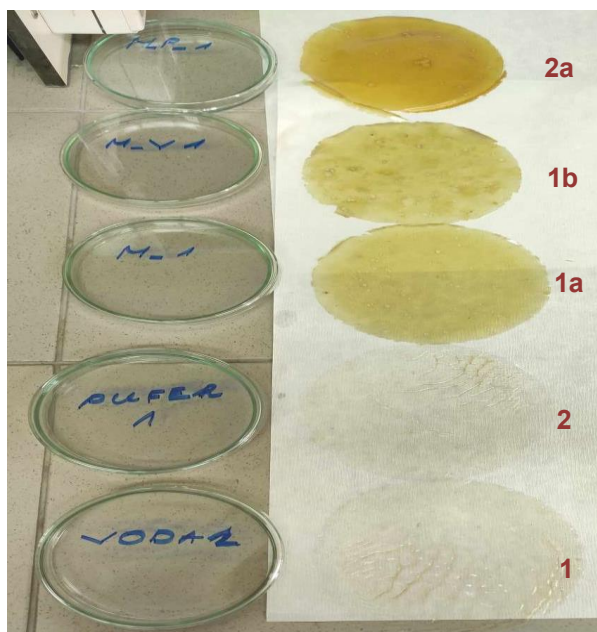
Tablica 2a. Biofilmovi na bazi alginata s i bez dodatka ekstrakta kore mandarine

Oznaka	Opis
1	Biofilm na bazi alginata s vodom (referentni uzorak)
2	Biofilm na bazi alginata s puferom (referentni uzorak)
1a	Biofilm na bazi alginata s dodatkom vodenog ekstrakta
1b	Biofilm na bazi alginata s dodatkom vodenog ekstrakta sa enzimima
2a	Biofilm na bazi alginata s dodatkom puferskog ekstrakta sa enzimima

Opisani uzorci (tablica 2a) pripremljeni su u dvije paralele, a postupak otapanja alginata u vodi (1), puferu (2) ili ekstraktima kore mandarine (1a, 1b i 1c) provodi se uz zagrijavanje i miješanje na magnetskoj miješalici (3 sata pri 50 °C). Tijekom kuhanja otopljenom alginatu dodaje se kalcijev klorid i glicerol, pri čemu kalcijev klorid služi kao umreživač, a glicerol kao plastifikator (tablici 2b). Nakon opisanih postupaka otapanja i zagrijavanja, otopina alginata (sa i bez dodatka ekstrakta kore mandarine izlije se u Petrijeve zdjelice te ostavi hladiti na sobnoj temperaturi kako bi došlo do skrućivanja sadržaja. Pripremljeni biofilmovi prikazani su na slici 6.

Tablica 2b. Sastav biofilmova na bazi alginata s i bez dodatkom ekstrakta kore mandarine

Biofilm	Alginat	Glicerol	CaCl ₂	H ₂ O	Pufer	Ekstrakt
	w = 2 %	w = 50 %	w = 2 %	V = 100 mL		
1				+	/	/
2				/	+	/
1a	2,0 g	1,0 g	0,04 g	/	/	+
1b				/	/	+
2a				/	/	+



Slika 6. Biofilmovi na bazi alginata s (1a, 1b i 2a) i bez (1 i 2) ekstrakata kore mandarine (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje sadržaja vlage u biofilmovima

Uzorci biofilmova dimenzija 2×2 cm odvagani su u prethodno osušene, ohlađene i izvagane aluminijske posudice. Nakon vaganja uzorci se suše na temperaturi od $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase te hlade u eksikatoru 1 h. Nakon hlađenja sadržaj vlage u biofilmovima računa se prema formuli [2]:

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad [2]$$

pri čemu je:

m_1 - prazna Al posudica

m_2 - Al posudica s uzorkom prije sušenja

m_3 - Al posudica s uzorkom nakon sušenja

3.2.3. Određivanje indeksa topljivosti biofilmova

Uzorci biofilmova dimenzija 2×2 cm izvagani su i uronjeni u prethodno osušene i izvagane čaše napunjene destiliranom vodom (10 mL). Nakon 24 h stajanja u vodi, na sobnoj temperaturi provodi se sušenje biofilma u sušioniku na temperaturi od $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. Nakon završenog sušenja uzorci se hlade u eksikatoru (1 h) te važu. Temeljem izvaganih vrijednosti početne mase uzorka biofilma i mase dobivene nakon sušenja, pri tome uzevši u obzir masu osušene čaše, računa se topljivost biofilma [3]:

$$w(\text{TS}) = \frac{m_o}{m_u} \cdot 100 \quad [3]$$

pri čemu je:

m_o - masa osušenog ostatka

m_u - masa uzorka

3.2.4. Određivanje kapaciteta vezanja ulja biofilmova

Uzorci biofilmova dimenzija 2×2 cm izvagani su i uronjeni u čaše napunjene sa 10 mL ulja. Nakon 24 h biofilmovi su izvađeni iz ulja, osušeni na papirnatom ručniku te odvagani. Na temelju masa biofilmova izvaganih prije uranjanja u ulje i nakon sušenja papirnatim ručnikom određen je kapacitet vezanja ulja [4]:

$$k = \frac{m_n - m_p}{m_p} \quad [4]$$

pri čemu je:

m_p - masa uzorka prije uranjanja

m_n - masa uzorka nakon sušenja

Ulje preostalo u čašama je prebačeno u staklene kivete kako bi se izmjerio volumen kojeg biofilmovi nisu vezali.

3.2.5. Određivanje boje biofilmova

Boja uzoraka biofilmova sa i bez dodatka ekstrakta kore mandarine određena je pomoću kolorimetra CM - 3500d (Konica - Minolta, Japan). Uređaj se kalibrira za masku otvora 8 mm. Postavljanjem geometrije na $d/8$, uzorak se namjesti na površinu otvora i mjere se reflektancije u vidljivom području: L^* , a^* , b^* vrijednost. U programu Spectramagic NX (Konica - Minolta, Japan) su se podesile sve potrebne postavke, a pomoću računalnih programa „Spectra Magic™ NX Ver. 1.7 i Color Data Software CM - S100 W očitane su dobivene vrijednosti. Na temelju dobivenih vrijednosti određena je ukupna razlika obojenosti, odnosno kolorimetrijska razlika (ΔE^*) među biofilmovima s dodanim ekstraktom u usporedbi s referentnim, kontrolnim biofilmom [5].

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [5]$$

pri čemu je:

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

Tumačenje odstupanja boje ispitivanog od referentnog (kontrolnog) uzorka se određuje prema slijedećim kriterijima:

- - ΔL uzorak je tamniji od standarda
- + ΔL uzorak je svjetliji od standarda
- - Δa uzorak je zeleniji od standarda
- + Δa uzorak je crveniji od standarda
- - Δb uzorak je plaviji od standarda
- + Δb uzorak je žući od standarda

3.2.6. Određivanje teksture biofilmova

Određivanje čvrstoće biofilmova provedeno je analizatorom teksture TA.HDplus (Stable Micro Systems, Velika Britanija). Za analizu se primjenjuje uteg od 750 kg s pripadajućim čeljustima, koji definira maksimalno moguće opterećenje ispitivanog materijala u ovisnosti o njegovim fizikalnim karakteristikama. Uzorci biofilmova dimenzija 3 x 1 cm postavljaju se okomito između dviju čeljusti međusobno razmaknutih 10 mm. Tijekom mjerenja je donja čeljust statična, a gornja se pomiče prema gore zadanom testnom brzinom od 0,1 mm s⁻¹. Nakon pucanja uzorka dobiva se dijagram ovisnosti maksimalne sile (F_{max}) o vremenu (t) potrebnom za pucanje uzorka, odnosno udaljenosti (L).

3.2.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine i uzorcima biofilmova

3.2.7.1. Priprema otopina

- Priprema Folin - Ciocalteu reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$): otpipetirano je 5 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake.
- Priprema standarda galne kiseline: odvagano je 0,5 g galne kiseline i otopljeno u 10 mL etanola (96 %). Otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake.
- Priprema pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline: otpipetirano je 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3 i 1,8 mL pripremljenog standarda galne kiseline u odmjerne tikvice od 50 mL i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake.

3.2.7.2. Postupak određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine

Sadržaj ukupnih fenola određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem intenziteta obojenja nastalog u reakciji fenola sa Folin - Ciocalteu reagensom. Za određivanje sadržaj ukupnih fenola u uzorcima izrađen je baždarni dijagram mjerenjem apsorbancije pripremljenih standardnih otopina (tablica 3 i slika 7). U tu svrhu, u odmjerne tikvice od 25 mL otpipetirano je 1 mL uzorka svake pojedinačno pripremljene standardne otopine, dodano je 10 mL destilirane vode i 1,25 mL Folin - Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta dodano je 3,75 mL 20 % natrijeva karbonata i nadopunjeno deioniziranom vodom na volumen od 25 mL. Pripremljene otopine su ostavljene 2 h na tamnom mjestu, na sobnoj temperaturi, a potom im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 760 nm.

Analiza ekstrakata kore mandarine provedena je na isti način kao i sa pojedinačnim

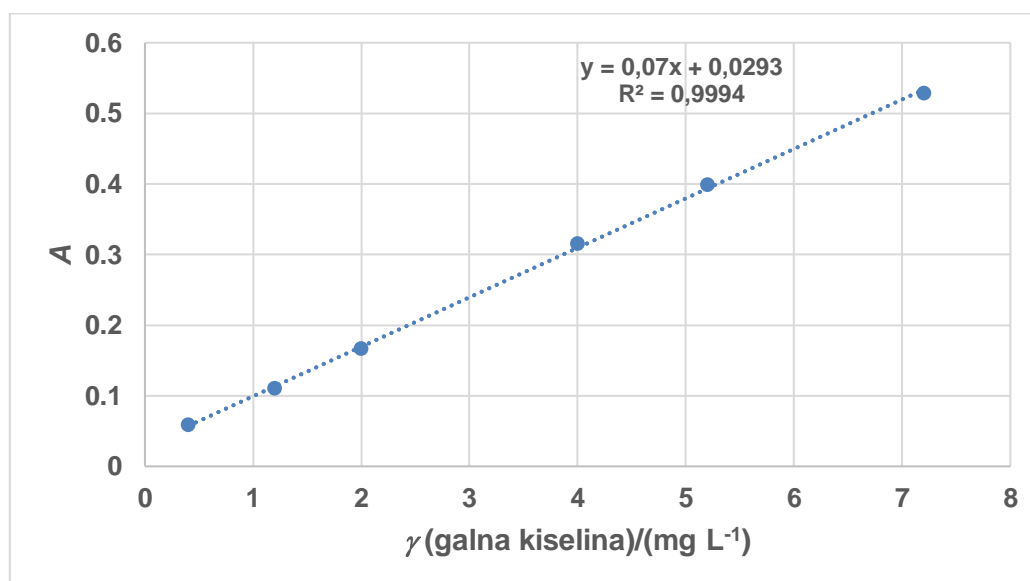
standardnim otopinama, samo što je za pripremu slijepe probe umjesto 1 mL standarda upotrijebljen 1 mL destilirane vode.

Za određivanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine i biofilmovima (vidi poglavlje 3.2.7.3.) potrebno je najprije izraditi baždarni dijagram. Vrijednosti masenih koncentracija i pripadajućih apsorbancija pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline potrebne za izradu baždarnog dijagrama prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti masenih koncentracija i pripadajućih apsorbancija izmjerenih pomoću UV/Vis spektrofotometra pri valnog duljini od 760 nm.

γ (mg L ⁻¹)	A ± SD
0,4	0,059 ± 0,002
1,2	0,110 ± 0,001
2,0	0,167 ± 0,003
4,0	0,315 ± 0,005
5,2	0,399 ± 0,005
7,2	0,528 ± 0,025

N = 2



Slika 7. Baždarni dijagram galne kiseline

3.7.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola u uzorcima biofilmova

Kod određivanja ukupnih fenola u uzorcima biofilmova sa ekstraktima kore mandarine

potrebno je biofilmove dimenzija 2 x 2 cm odvagati, uroniti u deioniziranu vodu 24 sata te profiltrirati. Alikvot od 1 mL dobivenog filtrata se otpipetira u odmjernu tikvicu od 25 mL, a potom slijedi postupak dodatka reagenasa i mjerenja apsorbancije, identičan onom opisanom u poglavlju 3.7.2.4.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza je napravljena u programu Microsoft Excel (2021). Dobivene vrijednosti analizom uzoraka prikazane su kao srednja vrijednost triju paralelnih mjerenja ($n = 3$) \pm standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripremljeni su biofilmovi na bazi alginata sa i bez dodatka ekstrakata kore mandarine: *i*) vodeni ekstrakt, *ii*) vodeni ekstrakt sa dodatkom enzima i *iii*) puferski ekstrakt sa dodatkom enzima. Karakterizacija pripremljenih biofilmova odnosila se na određivanje sadržaja vlage, topljivosti u vodi, kapaciteta vezanja ulja, boje, teksture i sadržaja ukupnih fenola. Ukupni fenoli su također određeni i u ekstraktima kore mandarine kako bi se usporedila efikasnost zadržavanja fenola u biofilmovima. Rezultati provedenih analiza prikazani su u tablicama 4 - 8.

4.1. ODREĐIVANJE VLAGE I TOPLJIVOSTI U VODI BIOFILMOVA

Istraživanje Chakravartula i suradnika (2019) je pokazalo da sadržaj vlage u biofilmovima varira (6,6 - 13,7 %) i ovisi o vrsti polimera (pektin, alginat i protein sirutke) upotrijebljenog pri izradi filma. Osim vrste polimera na sadržaj vlage utječe i dodatak ekstrakta kore mandarine što je pokazano i u ovom radu. Tako su vrijednosti sadržaja vlage u biofilmovima na bazi alginata dobivene u rasponu od 12,66 do 18,88 % (tablica 4). Vidi se da udio vlage varira od vrijednosti 12,66 % za uzorak 2a do vrijednosti 14,04 % za uzorak 1a, odnosno 18,88 % za referentni uzorak 1. Najveće vrijednosti udjela vlage određene su u referentnim uzorcima s vodom i puferom te biofilmu s dodatkom čistog vodenog ekstrakta što je i u skladu s očekivanjima jer se radi o vodenim otopinama. Sukladno tome ovakvi biofilmovi bi trebali pokazivati veću sposobnost zadržavanja i apsorpcije vode.

Rezultati topljivosti biofilmova u vodi prikazani u tablici 4 pokazuju da uzorci s dodanim ekstraktima kore mandarine imaju manju topljivost u vodi u usporedbi s uzorcima bez ekstrakta, što je ujedno povezano i sa rezultatima određivanja vlage. Naime, veći sadržaj vlage, odnosno vode utječe i na veću topljivost biofilmova. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 13,39 do 20,14 % za biofilmove sa ekstraktom (1a, 1b i 2a) kore mandarine te 21,51 do 21,79 % za biofilmove bez dodatka ekstrakta (1 i 2). Pri tome dodatak puferskog ekstrakta s enzimima značajno smanjuje topljivost biofilmova što čini potencijalnu prednost za njihovu primjenu u vodenim medijima. Time smanjena topljivost rezultira povećanom stabilnošću biofilmova i smanjenom mogućnošću njihove razgradnje u vodenim uvjetima. Za usporedbu biofilmovi na bazi pektina i alginata bez dodatka ekstrakta pokazuju vrijednost topljivosti od 32 do 55 % (Lini Seixas i sur., 2013) što još jednom potvrđuje prednosti dodatka ekstrakata kore mandarine.

Tablica 4. Rezultati određivanja sadržaja vlage i topljivost u vodi (TS) alginatnih biofilmova sa i bez dodatka ekstrakata kore mandarine

Uzorak	w (vlaga)/% ± SD	w (TS)/% ± SD
1	18,88 ± 0,14	21,79 ± 0,01
2	15,55 ± 0,69	21,51 ± 0,01
1a	14,04 ± 0,14	17,07 ± 0,01
1b	13,55 ± 0,26	20,14 ± 0,00
2a	12,66 ± 0,61	13,39 ± 0,01

4.2. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA ULJA

Rezultati određivanja kapaciteta vezanja ulja biofilmova sa i bez dodanog ekstrakta dobiveni su u rasponu od 3,45 do 7,15 %. Najveći pad kapaciteta vezanja ulja zabilježen je kod biofilma 1b (vodeni ekstrakt sa dodatkom enzima), dok je kod ostalih uzoraka primijećen tek blagi pad *k* vrijednosti u odnosu na referentne uzorke. Tako su za uzorke 1a (vodeni ekstrakt mandarine) i 1b (vodeni ekstrakt kore mandarine sa dodatkom enzima) *k* vrijednosti 5,88 % i 3,45 % nešto manje u odnosu na vodeni, referentni uzorak bez ekstrakta (7,15 %). Slično tome referentni, pufer biofilm (2) pokazuje također veće vrijednosti (5,46 %) u odnosu na isti uzorak kojem je dodan ekstrakt kore mandarine (2a, 4,31 %). Stoga, na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako dodatak ekstrakta utječe na sposobnost apsorpcije ulja, drugim riječima biofilmovi sa ekstraktima kore mandarine vežu manje ulja u usporedbi s referentnim uzorkom. Takvo njihovo navedeno svojstvo može imati prednosti, što značajno ovisi o njihovoj daljnjoj praktičnoj primjeni.

Volumen ulja koji ostaje nakon provedenog testa nije se značajno promijenio (7,5 - 7,7 mL) među uzorcima biofilmova (tablica 5), što može ukazivati na činjenicu da biofilmovi dosegnu određeni nivo zasićenja, nakon kojeg više ne mogu vezati prisutno ulje.

Tablica 5. Određivanje kapaciteta vezanja ulja (*k*) u uzorcima alginatnih biofilmova sa i bez dodatka ekstrakta kore mandarine i volumen (*V*) ulja zaostao nakon određivanja *k* vrijednosti

Uzorak	<i>k</i> (%) ± SD	<i>V</i> (mL) ± SD
1	7,15 ± 0,04	7,55 ± 0,35
2	5,46 ± 0,01	7,70 ± 0,30
1a	5,88 ± 0,02	7,60 ± 0,20
1b	3,45 ± 0,00	7,65 ± 0,05
2a	4,31 ± 0,01	7,50 ± 0,30

4.3. ODREĐIVANJE TEKSTURE

Analizom teksture uzoraka dobiveni su dijagrami ovisnosti maksimalne upotrijebljene sile F_{max} (tvrdoća uzorka) o vremenu (t) potrebnom za pucanje uzorka.

Na temelju dobivenih vrijednosti izračunate su deformacija (ϵ) i rad (W), a rezultati su prikazani su u tablici 6.

Deformacija je mjera rastezljivosti uzorka, dok je rad definiran površinom ispod krivulje, odnosno jednak je umnošku sile potrebne za pucanje uzorka i prijeđenog puta čeljusti do pucanja. Što je manji utrošak rada, manja je površina ispod krivulje, to prije dolazi do pucanja uzoraka, a što je veća maksimalna sila to je veća i čvrstoća uzorka.

Na temelju usporedbe biofilмова sa dodatkom ekstrakta i referentnih biofilмова uočeno je da se kod uzorka s dodatkom vodenog ekstrakta sa enzimima (1b) povećala čvrstoća biofilma, dok se kod uzoraka 1a i 2a čvrstoća smanjila. Utrošak rada smanjio se dodatkom svih ekstrakta što znači da prije dolazi do pucanja uzoraka, odnosno povećalo se svojstvo plastičnosti, biofilmovi su krući. Vrijednost deformacije, odnosno sposobnost rastezanja, smanjila se kod uzoraka 1b i 2a, dok se u slučaju uzorka sa dodatkom čistog vodenog ekstrakta (1a) povećala. Navedena zapažanja ukazuju na to da ovisno o vrsti dodanog ekstrakta dolazi do različitih promjena u teksturi biofilмова. Možemo zaključiti da se između spojeva prisutnih u biofilmovima i ekstraktima uspostavljaju različite interakcije koje posljedično dovode do promjene mehaničkih svojstava biofilмова.

Tablica 6. Teksturna svojstva alginatnih biofilмова sa i bez dodatka ekstrakata kore mandarine

Uzorak	$F/N \pm SD$	$\epsilon/\% \pm SD$	$W/Nmm \pm SD$
1	47,48 ± 5,07	8,79 ± 5,67	34,65 ± 26,01
2	43,25 ± 9,54	23,41 ± 3,45	89,54 ± 7,30
1a	39,32 ± 1,96	10,75 ± 1,87	28,03 ± 5,22
1b	52,19 ± 4,80	4,25 ± 0,87	14,88 ± 4,70
2a	21,84 ± 1,44	6,54 ± 0,94	8,52 ± 1,40

4.4. ODREĐIVANJE BOJE

Pripremljenim biofilmovima sa dodatkom ekstrakta kore mandarine određena je boja, odnosno parametri L , a i b i uspoređena je s referentnim uzorcima biofilma.

Analizom rezultata prikazanih u tablici 7 vidljivo je da dodatak ekstrakta ima utjecaj na parametre boje, a samim time i na ukupnu promjenu boje. Vrijednosti parametara L i a opadaju dodatkom ekstrakta kore mandarine, što znači da su ispitivani uzorci tamniji ($-\Delta L$) i zeleniji

($-\Delta a$) od standarda. Vrijednost parametra b pokazuje porast ($+\Delta b$), to znači da su uzorci žući od standarda.

Na temelju dobivenih podataka, može se zaključiti da dodatak ekstrakta značajno utječe na promjenu boje uzoraka. Svi uzorci s dodanim ekstraktom (1a, 1b, i 2a) pokazali su povećanje vrijednosti parametra a , što ukazuje na to da su crveniji u usporedbi sa standardima (1 i 2). Najveća promjena vrijednosti parametra a zabilježena je kod uzorka 1a (4,20). Istovremeno, dodatak ekstrakta doveo je do smanjenja vrijednosti parametra b , što znači da su uzorci postali plaviji od standarda, s najvećom razlikom uočljivom kod uzorka 2a (-34,37). Vrijednosti parametra L također su se smanjile u odnosu na standard, pokazujući tamniji izgled uzoraka s ekstraktom, s rasponom od 6,21 do 7,46. Ukupna promjena boje, mjerena ΔE vrijednošću, bila je najizraženija kod uzorka 1b, što ukazuje da je dodatak vodenog ekstrakta s enzimima imao najveći utjecaj na promjenu boje u odnosu na referentni uzorak.

Tablica 7. Parametri boje određeni u alginatnim biofilmovima sa i bez dodatka ekstrakta kore mandarine

Uzorak	$L \pm SD$	$a \pm SD$	$b \pm SD$	$\Delta L \pm SD$	$\Delta a \pm SD$	$\Delta b \pm SD$	$\Delta E \pm SD$
1	96,21 ± 0,01	-0,40 ± 0,00	2,77 ± 0,02	96,21 ± 0,00	-0,40 ± 0,00	2,77 ± 0,01	96,25 ± 0,00
2	95,24 ± 0,00	-0,37 ± 0,00	4,77 ± 0,00	95,24 ± 0,00	-0,37 ± 0,00	4,77 ± 0,00	95,36 ± 0,00
1a	87,79 ± 0,01	-0,99 ± 0,01	39,14 ± 0,02	7,36 ± 0,00	4,20 ± 0,02	-27,93 ± 0,01	29,18 ± 0,02
1b	90,00 ± 0,01	-3,70 ± 0,01	25,25 ± 0,00	6,21 ± 0,00	3,30 ± 0,01	-22,49 ± 0,01	23,56 ± 0,00
2a	88,84 ± 0,00	-4,60 ± 0,02	30,69 ± 0,03	7,46 ± 0,01	0,62 ± 0,01	-34,37 ± 0,02	35,17 ± 0,01

4.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA KORE MANDARINE I UZORCIMA BIOFILMOVA

Na temelju dobivene jednadžbe pravca (slika 7) određen je udio ukupnih fenola (UF) u ekstraktima kore mandarine i uzorcima biofilмова sa dodanim ekstraktima (1a, 1b i 2a).

Maseni udjeli ukupnih fenola ekstrakta dobiveni su u vrlo uskom rasponu od 1,08 do 1,15 mg g⁻¹, a biofilмова od 6,39 do 7,59 mg g⁻¹ (tablica 8). U usporedbi sa rezultatima Orešković (2020), sadržaj ukupnih fenola u alginatnim filmovima je znatno veći u odnosu na pektinske biofilmove (0,099 i 0,101 mg g⁻¹). Veće vrijednosti ukupnih fenola u ovom istraživanju mogu se objasniti ne toliko utjecajem biopolimera već utjecajem korištenje ekstrakcije tehnike. Naime, u ovom radu je upotrijebljena Clevenger vodena destilacija, a u radu Orešković (2020) ekstrakcija mikrovalovima.

Usporedbom rezultata ukupnih fenola između ekstrakata i biofilмова (tablica 8) vidi se značajno veći udio UF u biofilmovima u odnosu na ekstrakt. Pri tome biofilm sa dodatkom puferskog ekstrakta sa enzimima (2a) dominira sa vrijednošću od 7,59 mg g⁻¹. Sadržaj ukupnih fenola u slučaju biofilma sa dodatkom vodenog ekstrakta (1a) i biofilma sa dodatkom vodenog ekstrakta sa enzimima (1b) je približno jednak. Vrlo slične vrijednosti su određene i kod vodenih ekstrakata sa i bez dodatka enzima (M i M_VEn uzorci), pa se može zaključiti da ekstrakti kao i biofilmovi pripremljeni sa puferom uz dodatak enzima pridonose efikasnijoj ekstrakciji fenola, a time i njihovoj ugradnji u biofilmove. Dodatno, veći sadržaj ukupnih fenola u biofilmovima u odnosu na ekstrakte može se objasniti činjenicom prisutnosti i drugih spojeva unutar strukture biofilma, koji kod ovog određivanja utječu na ukupni analitički signal. Stoga, na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da pripremljeni biofilmovi čine kompleksnu strukturu koja svakako pridonosi očuvanju fenola, no sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva u takvoj strukturi trebalo bi odrediti drugim analitičkim metodama (npr. kromatografske tehnike).

Tablica 8. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (UF) u ekstraktima i biofilmovima kore mandarine.

Ekstrakt	A ± SD	w (UF)/(mg g ⁻¹) ± SD
M	0,270 ± 0,002	1,08 ± 0,01
M_VEn	0,264 ± 0,002	1,05 ± 0,01
M_PEn	0,288 ± 0,002	1,15 ± 0,01
Biofilm	A ± SD	w (UF)/(mg g ⁻¹) ± SD
1a	0,224 ± 0,001	6,39 ± 0,03
1b	0,221 ± 0,007	6,35 ± 0,24
2a	0,375 ± 0,004	7,59 ± 0,09

M = vodeni ekstrakt, M_Ven = vodeni ekstrakt sa enzimima, M_PEn = puferski ekstrakt sa

enzimima

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak ekstrakta dovodi do promjene u strukturi biofilma čime se posljedično mijenjaju i njegova svojstva. Promjene ovise o vrsti ekstrakta i interakciji sastojaka ekstrakta s matricom biofilma.
2. Najveće vrijednosti vlage određene su u uzorcima biofilma na bazi vodenih otopina, dok se vrijednost topljivosti najviše smanjila kod uzorka sa dodatkom puferkog ekstrakta sa enzimima.
3. Dodatkom ekstrakta kore mandarine kapacitet vezanja ulja se kod svih uzoraka smanjuje, a najmanje k vrijednosti su određene kod biofilmova sa dodatkom enzima.
4. Ovisno o vrsti dodanog ekstrakta uzorcima biofilmova se različito mijenja čvrstoća i deformacija, dok se utrošak rada smanjuje dodatkom svih ekstrakta kore mandarine.
5. Na ukupnu promjenu boje biofilma najviše je utjecao dodatak vodenog ekstrakta sa enzimima.
6. Sadržaj fenola se razlikuje između čistih ekstrakata i biofilmova sa dodatkom ekstrakata. Najveći sadržaj fenola prisutan je u uzorku biofilma s dodatkom puferkog ekstrakta sa enzimima.
7. Na promjene svojstava biofilmova najveći utjecaj ima puferki ekstrakt kore mandarine sa enzimima što dovodi do zaključka da je navedena otopina najbolji izbor za buduća istraživanja poboljšanja svojstava biofilmova i njihove primjene.

6. POPIS LITERATURE

Anonymous 1 (2022) Mandarin orange, < <https://www.purplle.com/magazine/article/enjoy-the-skin-benefits-of-mandarin-orange> > Pristupljeno 9.kolovoza 2024.

Anonymous 2 (2017) Structure of alginic acid, < https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-alginic-acid-G-guluronic-acid-M-mannuronic-acid_fig1_7580587 > Pristupljeno 9.kolovoza 2024.

Anonymous 3 (2023) Spectrophotometer < <https://www.e-consystems.com/blog/camera/applications/how-oem-cameras-enhance-the-performance-of-spectrophotometers/> > Pristupljeno 10. kolovoza 2024

Bourtoom, T (2008) Edible films and coatings: characteristics and properties *Int Food Res J* **15**, 237-248. [http://www.ifrj.upm.edu.my/15%20\(3\)%202008/01.%20Bourtoom,%20T.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/15%20(3)%202008/01.%20Bourtoom,%20T.pdf)

Brnčić M, Tripalo B, Ježek D, Semenski D, Drvar N, Ukrainczyk M (2006) Effect of twin-screw extrusion parameters on mechanical hardness of direct-expanded extrudates. *Sadhana* **31**, 527-536. <https://doi.org/10.1007/BF02715911>

Chakravartula SSN, Soccio M, Lotti N, Balestra F, Dalla Rosa M, Siracusa V (2019) Characterization of Composite Edible Films Based on Pectin/Alginate/Whey Protein Concentrate. *Materials* **12**, 2454. <https://doi.org/10.3390/ma12152454>

Chavan P, Singh AK, Kaur G (2018) Recent progress in the utilization of industrial waste and by-products of citrus fruits: A review. *J Food Process* **41**, 1-10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12895>

Czech A, Zarycka E, Yanovych D, Zasadna Z, Grzegorzczak I, Kłysz S (2020). Mineral Content of the Pulp and Peel of Various Citrus Fruit Cultivars. *Biol Trace Elem Res* **193**, 555-563. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01727-1>

Delazio, A, Israr A, Klatzky RL (2017) Cross - modal correspondence between vibrations and colors, IEEE World Haptics Conference (WHC), Munich, 219-224.

Dent M, Vujović T, Miljanović A, Jerković I, Marijanović Z, Grbin D i sur. (2023) Effect of xylanase addition and ultrasonic pretreatment on the yield and volatile profile of bay laurel and sage essential oil, *J Essent Oil Bear Plants*, **26**, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2258935>

Djilas S, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G (2009) By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chem Ind Chem Eng Q* **15**, 191-202. <https://doi.org/10.2298/CICEQ0904191D>

Donlan, RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces *Emerg Infect Dis* **8**, 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G (2005) Alginates from algae Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents. Steinbuchel A, Rhee SK, Weinheim, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 1-30.

Ferenčić D, Gluhic D, Dudaš S (2016) Eterična ulja i nusproizvodi kore mandarine (*Citrus reticulata* Blanco). *Glasnik Zaštite Bilja* **5**, 44-49. <https://hrcak.srce.hr/168269>

Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ i sur. (2021). Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *Science* **24**, 102443. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102443>

Hentati F, Ursu AV, Pierre G, Delattre C, Trica B, Abdelkafi S i sur. (2018) Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals, CRC Press Boca Raton, FL, USA, 33-42.

Huang J-y, Liao J-s, Qi J-r, Jiang W-x, Yang X-q (2021). Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel. *Food Hydrocoll*, **110**, 106140. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.106140>

Kabir II, Sorrell CC, Mofarah SS, Yang W, Yuen ACY, Nazir MT, Yeoh GH (2020) Alginate/Polymer-Based Materials for Fire Retardancy: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Polym Rev* **61**, 357-414 <https://doi.org/10.1080/15583724.2020.1801726>

Kaleb M (2014.) Razvoj uzgoja mandarina i ostalih agruma u dolini Neretve, *Agronomski glasnik* **76**, 219-238. <https://hrcak.srce.hr/file/207384>

Koo H, Allan R, Howlin R, Stoodley P, Hall-Stoodley L (2017) Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* **15**, 740-755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>

Lee KY, Mooney DJ (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**, 106-126. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.06.003>

Lini Seixas F, Turbiani F, Salomao P, Souza R, Gimenes M (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chem Eng Trans* **32**, 1693-1698. <https://doi.org/10.3303/CET1332283>

Mahato N, Sinha M, Sharma K, Koteswararao R, Cho MH (2019) Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods* **8**, 523. <https://doi.org/10.3390/foods8110523>

Marković S (2005.) Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb, str. 162, 178, 207-208

Miljanović A, Bielen A, Grbin D, Marijanović Z, Andlar M, Rezić T i sur. (2020) Effect of Enzymatic, Ultrasound, and Reflux Extraction Pretreatments on the Chemical Composition of Essential Oils. *Molecules* **25**, 4818. <https://doi.org/10.3390/molecules25204818>

Negro V, Mancini G, Ruggeri B, Fino, D (2016) Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization. *Bioresour Technol* **214**, 806-815. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.05.006>

Olanbiwoninu AA, Popoola BM (2023) Biofilms and their impact on the food industry. *Saudi J Biol Sci* **30**, 103523. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2022.103523>

Peng Q, Xu Q, Yin H, Huang L, Du Y (2014) Characterization of an immunologically active pectin from the fruits of *Lycium ruthenicum*. *Int J Biol Macromol* **64**, 69-75. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.11.030>

Radić Nj, Kukoč Modun L (2016) Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Zagreb

Remminghorst U, Rehm BHA (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* **28**, 1701-1712 <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>

Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR (2017) Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition* **34**, 29-46. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2016.09.006>

Skoog DA, West DM, Holler FJ. (1999) Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb

Smidsrod O, Skjak-Bræk G(1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trend Biotechnol* **8**, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-o](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-o)

Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson, BG, Emwas, AH, Jaremko M (2020) Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* **25** <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

USDA: United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service (2024) Production-Tangerines/Mandarins
<<https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0571220>> Pristupljeno 27. kolovoza 2024.

Wedamulla NE, Fan M, Choi YJ, Kim EK (2022) Citrus peel as a renewable bioresource: Transforming waste to food additives. *J Funct Foods* **95**, 105163. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2022.105163>

Izjava o izvornosti

Ja Vedrana Jakuš Mejarec izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis