

Karakterizacija sastava odabranih sekundarnih biljnih sirovina: Implementacija bioaktivnog ekstrakta kore banane u formulacije jestivih filmova

Dominko, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:018251>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Anamaria Dominko

7312

**Karakterizacija sastava odabranih sekundarnih biljnih sirovina: Implementacija
bioaktivnog ekstrakta kore banane u formulacije jestivih filmova**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2019.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS/SPB-LCF; broj 9717).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Karakterizacija sastava odabranih sekundarnih biljnih sirovina: Implementacija bioaktivnog ekstrakta kore banane u formulacije jestivih filmova

Anamaria Dominko, 0058209169

Sažetak: Budući da se agro-industrijski otpad sve više pokušava iskoristiti kao izvor bioaktivnih sastojaka za funkcionalne prehrambene proizvode, cilj ovoga rada bio je analizirati osnovni kemijski i bioaktivni sastav šest sekundarnih biljnih sirovina (kore banane i cikle, ljuške kakaovog zrna, crvenog luka i oraha te mahuna graška), a s korom banane je provedena detaljnija karakterizacija i bioaktivni ekstrakt je primijenjen u formuliranju funkcioniranih jestivih filmova, uz alginat i pektin kao nosače. Ekstrakcije sirovina provedene su sa 70 %-tnim etanolom, dok je za koru banane pripremljen i vodeni ekstrakt. Karakterizacija osnovnog sastava (udjel proteina, masti, mineralnih tvari, prirodnog i ukupnog inverta te ukupnih vlakana) provedena je primjenom standardne analitičke metodologije, dok je bioaktivni sastav (ukupni polifenoli, flavonoidi i neflavonoidi, flavoni i flavonoli, flavan-3-oli, hidrokisicimne kiseline, proantocijaidini, antioksidacijski kapacitet, antocijani, karotenoidi, klorofili) određen spektrofotometrijskim metodama. Među analiziranim sirovinama, kora banane se istaknula višim udjelom prirodnog inverta, saharoze i makroelemenata, ljuška oraha udjelom prehrambenih vlakana i proantocijanidina, ljuška crvenog luka udjelom mikroelemenata, ukupnih polifenola, flavona i flavonola, hidrokisicimnih kiselina i višim antioksidacijskim kapacitetom, dok je ljuška kakaovog zrna imala viši udjel flavan-3-ola. Od pigmenata u svim sirovinama najzastupljeniji je bio klorofil b. U odnosu na kontrolni jestivi film, pripremljen s vodom, filmovi pripremljeni s vodenim ekstraktom kore banane bili su deblji i tamniji, s jačim intenzitetom žute boje. Među pripremljenim filmovima, najveći udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet te profil otpuštanja istih, pokazao je funkcionalni jestivi film pripremljen lijevanjem ekstrakta kore banane s pektinom preko sloja s aginatom. Prema dobivenim rezultatima sve ispitivane sirovine predstavljaju vrijedne izvore nutritivnih i bioaktivnih sastojaka otvarajući brojne mogućnosti njihove implementacije u razvoju različitih prehrambenih proizvoda s dodanom vrijednošću.

Ključne riječi: *agro-industrijski otpad, jestivi filmovi, kora banane, polifenolni spojevi*

Rad sadrži: 79 stranica, 22 slike, 12 tablica, 167 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag. ing.

Datum obrane: rujan 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

**Characterization of the composition of selected secondary plant raw materials:
Implementation of bioactive banana peel extract in edible film formulations**

Anamaria Dominko, 0058209169

Abstract: Since agro-industrial waste is increasingly tried to be used as a source of bioactive ingredients for functional food products, the aim of this paper was to analyze the basic chemical and bioactive composition of six secondary plant raw materials (banana and beetroot peels, cocoa and walnut shells, red onion skin and pea pod), with a more detailed characterization of the banana peel and its bioactive extract was applied in the formulation of functional edible films, with alginate and pectin as carriers. Raw material extractions were carried out with 70 % ethanol, while an aqueous extract was prepared for the banana peel. Characterization of the basic composition (content of proteins, fats, minerals, natural and total invert and total fibers) was performed using standard analytical methodology, while the bioactive composition (total polyphenols, flavonoids and neflavonoids, flavones and flavonols, flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids, proanthocyanidins, antioxidant capacity, anthocyanins, carotenoids, chlorophyll) determined by spectrophotometric methods. Among the analyzed raw materials, the banana peel was distinguished by a higher content of natural invert, sucrose and macroelements, walnut shells by dietary fiber and proanthocyanidins, red onion skin by microelements, total polyphenols, flavones and flavonols, hydroxycinnamic acids and higher antioxidation while cocoa shells had a higher content of flavan-3-ol. Of the pigments in all raw materials, the most prevalent was chlorophyll b. Compared to the control edible film, prepared with water, the films prepared with aqueous banana peel were thicker and darker, with a stronger intensity of yellow. Among the prepared films, the highest proportion of total polyphenols, antioxidant capacity and release profile of these were shown by a functional edible film prepared by solvent casting a banana peel extract with pectin over an aginate layer. According to the obtained results, all tested raw materials represent valuable sources of nutritional and bioactive ingredients, opening up numerous possibilities for their implementation in the development of various value-added food products.

Keyword: *Agro-industrial waste, banana peel, edible films, polyphenols*

Thesis contains: 79 pages, 22 figures, 12 tables, 167 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, MSc

Defence date: September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Agro-industrijski otpad.....	2
2.1.1. Kora banane.....	3
2.1.2. Ljuska kakaovog zrna.....	4
2.1.3. Mahuna graška	4
2.1.4. Ljuska crvenog luka	5
2.1.5. Kora cikle	6
2.1.6. Ljuska oraha	7
2.2. Polifenolni spojevi	8
2.3. Jestivi filmovi	10
2.3.1. Postupci izrade jestivih filmova.....	11
2.3.2. Funkcionalni jestivi filmovi	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. MATERIJAL.....	14
3.1.1. UZORCI SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA	14
3.1.2. KEMIČALIJE	15
3.1.3. APARATURA I PRIBOR.....	18
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Priprema etanolnog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina	20
3.2.2. Priprema vodenog ekstrakta kore banane	20
3.2.3. ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA	20
3.2.3.1. Određivanje udjela suhe tvari/vode	20
3.2.3.2. Određivanje udjela proteina.....	21
3.2.3.3. Određivanje udjela masti.....	22

3.2.3.4. Određivanje udjela mineralnog ostatka (pepela)	23
3.2.3.5. Određivanje udjela ukupnih vlakana	23
3.2.3.6. Određivanje udjela prirodnog i ukupnog inverta	24
3.2.4. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG SASTAVA	26
3.2.4.1. Određivanje ukupnih polifenola	26
3.2.4.2. Određivanje udjela flavonoida i neflavonoida.....	27
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	27
3.2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	28
3.2.4.5. Određivanje udjela flavona i flavonola	29
3.2.4.6. Određivanje udjela flavan-3-ola	30
3.2.4.7. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina.....	30
3.2.4.8. Određivanje udjela proantocijanidina.....	31
3.2.4.9. Određivanje ukupnih antocijana	32
3.2.4.10. Određivanje ukupnih karotenoida	33
3.2.4.11. Određivanje ukupnog klorofila.....	33
3.2.4.12. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata.....	33
3.2.5. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA.....	34
3.2.6. Karakterizacija filmova	36
3.2.6.1. Određivanje debljine filmova.....	36
3.2.6.2. Određivanje udjela suhe tvari	36
3.2.6.3. Određivanje mehaničkih svojstava.....	36
3.2.6.4. Određivanje boje	37
3.2.6.5. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova	38
3.2.6.6. Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova	38
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. Osnovni sastav sekundarnih biljnih sirovina	39

4.2. Analiza bioaktivnog sastava odabranih sekundarnih biljnih sirovina.....	45
4.2.1. Udjeli ukupih polifenola, flavonoida i neflavonoida u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina.....	46
4.2.2. Antioksidacijski kapacitet	49
4.2.3. Udjeli odabranih grupa polifenolnih spojeva	51
4.3. Analiza bioaktivnog sastava vodenog ekstrakata kore banane	53
4.4. Karakterizacija formuliranih jestivih filmova	54
4.4.1. Određivanje suhe tvari, debljine i mehaničkih svojstava	54
4.4.2. Vizualni izgled formuliranih jestivih filmova i određivanje boje.....	55
4.4.3. Bioaktivni sastav formuliranih jestivih filmova	58
4.4.4. Kinetika otpuštanja bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova u simuliranim uvjetima gastro-intestinalnog trakta.....	59
5. ZAKLJUČCI	61
6. LITERATURA.....	63

1. UVOD

Na području Europske unije godišnje se proizvede 89 milijuna tona biomase, odnosno agro-industrijskog otpada, a sljedeće godine očekuje se porast od 40 %. Potencijal agro-industrijskog otpada tek se djelomično iskorištava za proizvodnju bioplina, kompost, stočnu hranu ili gnojivo, no, u posljednje vrijeme sve je veći broj znanstvenih istraživanja na temu njegovog bioaktivnog sastava i mogućnosti iskorištavanja u razvoju novih prehrambenih proizvoda (Caballero i Soto, 2019).

Po količini proizvodnje, banana je, u kategoriji voća, 2017. godine zauzela drugo mjesto, odmah poslije lubenice (STATISTA, 2019). Niska cijena u kombinaciji s velikom hranjivom vrijednošću pridonosi značajnoj globalnoj konzumaciji banane, nakon koje se generira velika količina neadekvatno zbrinutih kora (Puraikalan, 2018) bogatih dušikom, fosforom i ugljikohidratima stvarajući neravnotežu u tlu i vodenom okolišu (Cardoso i sur., 2017; Pereira i Maraschin, 2015). Uzimajući u obzir dostupne podatke o sastavu, kao i cijenu i dostupnost kore banane, prepoznaje se visoki potencijal njenog iskorištenja i ponovnog vraćanja u prehrambeni proizvodni lanac.

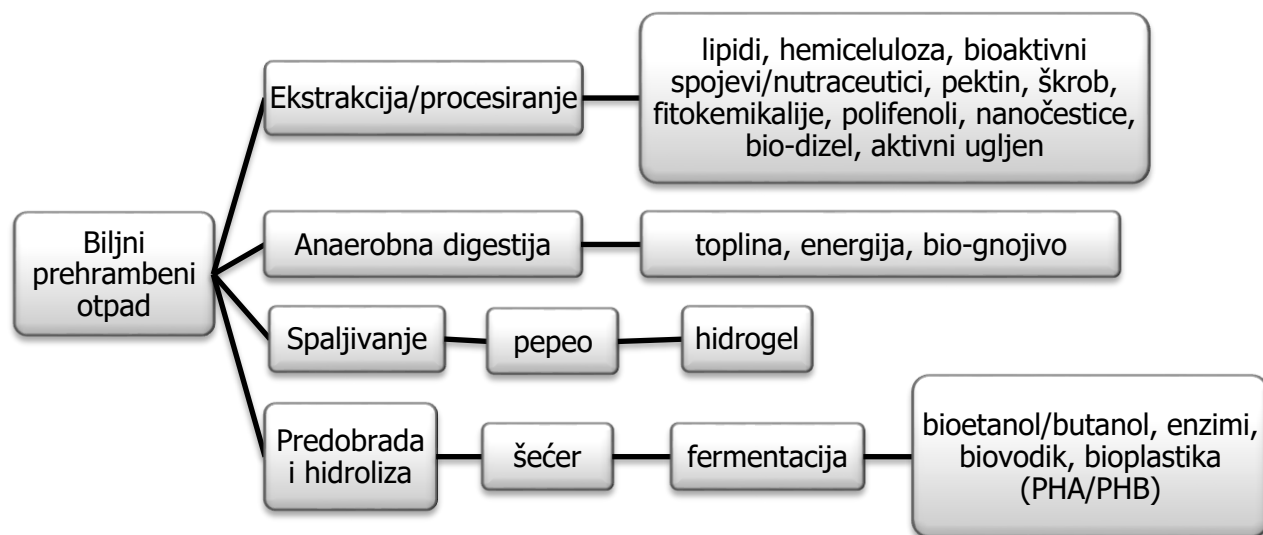
Cilj ovog istraživanja je analiza osnovnog i bioaktivnog sastava šest odabranih sekundarnih biljnih sirovina: kore banane, kore cikle, ljuske crvenog luka, mahune graška, ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna, s posebnim težištem na koru banane, kao posebno atraktivnu, a nedovoljno istraženu sirovinu, čiji će bioaktivni ekstrakt biti primijenjen u razvoju jestivih filmova. Izrada funkcionalnih jestivih filmova u skladu je s porastom svijesti potrošača, kao i potrebom prehrambene industrije za uštedom, recikliranjem i zaštitom okoliša te potražnjom za jestivom i biorazgradivom ambalažom. U formuliranju jestivih funkcionalnih filmova obogaćenih vodenim ekstraktom kore banane, primijenit će se tehnika lijevanja u jednom ili dva sloja, uz pektin i/ili alginat kao nosače. Pripremljenim filmovima također će se odrediti fizikalna svojstva i bioaktivni sastav.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Agro-industrijski otpad

Ljuske, sjemenke, stabljike, kore i drugi organski otpad iz agro-industrije danas predstavlja jedno od glavnih izvora onečišćenja okoliša jer se ne obrađuje, nedovoljno iskorištava i neplanski odlaže (Sadh i sur., 2018; Mohd, 2017). Stoga su neke države donijele zakonske propise koji sadrže glavne definicije i načela o gospodarenju otpadom, naglašavajući da se njegovo uklanjanje mora obavljati bez stvaranja negativnih učinaka za vodu, zrak, tlo, floru i faunu, te reguliraju uporabu organskog otpada kao gnojiva u poljoprivredi (Mohd, 2017).

U sastavu agro-industrijskog otpada najvećim dijelom dominiraju polisaharidi, proteini, ugljikohidrati, polifenoli te druge hranjive i bioaktivne tvari. Stoga, rješenje ovog ekološkog problema znanstvenici pronalaze u tehnološkom pročišćavanju takvog materijala i njegovom recikliranju (Mohd, 2017) te iskorištavanju u različitim poljima industrije (Slika 1), posebice prehrambene budući da je porasla svijest potrošača u pogledu izravne veze između hrane i zdravlja. U tom slučaju posebno su zanimljivi dijelovi voća i povrća bogati antioksidansima koji se uklanjaju iz proizvodnog procesa, a potencijalno se mogu iskoristiti kao funkcionalni sastojci koji će pridonijeti kvaliteti proizvoda i ljudskom zdravlju (Socaci i sur., 2017).



Slika 1. Prikaz mogućih produkata dobivenih preradom biljnog prehrambenog otpada (Ravindran i Jaiswal, 2015)

2.1.1. Kora banane

Proizvodnja banane (*Musaceae*) 2017. iznosila je 114 milijuna tona (STATISTA, 2019), a najveći proizvođači su Indija, Kina, Filipini, Ekvador i Brazil (FAO, 2019). Za razliku od ostalog voća, banana se bere tijekom cijele godine (BananaLink, 2019). Iako postoji više od 1000 varijeteta banane, na europskom su tržištu većinom prisutne vrste *Cavendish* (FAO, 2019). Pulpa banane koristi se za proizvodnju raznih proizvoda (pire, sok, džem i dr.) (Singh i sur., 2018). Zaostala kora, koja čini oko 30 % mase ploda (González-Montelongo i sur., 2010), koristi se za ishranu stoke ili gnojivo, a praksa je i odlaganje u rijeke (Pereira i Maraschin, 2015)

Najveći udjel kore banane čine biopolimeri, kao što su lignin, pektin, celuloza i hemiceluloza. Proteini čine 6 – 9 % suhe tvari, a 3,8 – 11 % čine masti. Kora je dobar izvor i esencijalnih aminokiselina (Mohapatra i sur., 2010). Od mineralnih tvari, najviše sadrži kalij (337 mg/100 g), potom kalcij i magnezij (Happi Emaga i sur., 2007). Ukupni udjel polifenolnih spojeva u kori banane je 1,5 – 3 puta veći od udjela u pulpi (Sulaiman i sur., 2011). Među njima su najzastupljeniji flavan-3-oli u obliku polimera i monomera (galokatehin, epikatehin, katehin) (Rebello i sur., 2014). Od hidroksicimetnih kiselina najzastupljenije su triferuloil-diheksoza, ferulinska i sinapinska kiselina, a od flavonola rutin, kempferol i izoramnetin (Passo Tsamo i sur., 2015a). Veliku antioksidacijsku aktivnost pokazuju i prisutni katekolamini dopamin i L-dopa (González-Montelongo i sur., 2010; Kanazawa i Sakakibara, 2000). Među navedenim spojevima ističe se udjel galokatehina (158 mg/g s. tv.) i dopamina (80 – 560 mg/100 g) koji je nekoliko puta veći u kori nego u pulpi (Rebello i sur., 2014; Kanazawa i Sakakibara, 2000). Osim polifenolnih spojeva, snažni antioksidansi kore banane su i askorbinska kiselina, cijanidini i karoteni (Anal i sur., 2012).

Ekstrakt kore banane može služiti za poboljšanje kvalitete i produljenje roka trajanja hrane (ribljeg ulja, mesa peradi, soka naranče) (Anal i sur., 2012; Devatkal i sur., 2011; Ortiz i sur., 2017), čime bi se zamijenili sintetski konzervansi (Devatkal i sur., 2011; Kurhade i sur., 2015). Kora banane može se umjesto pulpe koristiti za ekstrakciju spojeva arome banane koji se uveliko koriste u prehrambenoj industriji (Ji i Srzednicki, 2015). Do sada je korištena u proizvodnji nekoliko prehrambenih proizvoda, kao što su pogača, žele bomboni, sladoled (Kurhade i sur., 2015; Lee i sur., 2010; Yangilar, 2015). Potencijalna primjena kore banane je u proizvodnji proizvoda koji uobičajeno sadrže gluten. Međutim, potrebno je provesti daljnja istraživanja s ciljem optimiranja parametara proizvodnje takvih proizvoda (Amini Khoozani i sur., 2019).

2.1.2. Ljuska kakaovog zrna

Proizvodnja kakaovog zrna, ploda kakaovca (*Theobroma cacao* L.), 2017./2018. iznosila je 4,8 milijuna tona (ICCO 2019), a najveći svjetski proizvođači su Obala Bjelokosti, Gana i Indonezija (FAO, 2019). Kakaovo zrno sastoji se od klice, kotiledona i ljuske (Okiyama i sur., 2017), a koristi se za proizvodnju čokolade i drugih proizvoda od kaka (Martínez i sur., 2012). S udjelom 12 – 20 % mase zrna, ljuska godišnje generira 700 000 tona agro-industrijskog otpada (Okiyama i sur., 2017). Ljuska kakaovog zrna uglavnom se koristi kao stočna hrana, gnojivo ili gorivo u industriji (Jokić i sur., 2018).

Ljuska kakaovog zrna u značajnom udjelu sadrži proteine (~16 g/100 g s. tv.), prehrambena vlakna (51,88 – 56,70 g/100 g s. tv.), od kojih su 35,64 – 42,17 g/100 g s. tv. netopiva (Martínez i sur., 2012), i mineralnih tvari (K, P, Ca i Mg) (Campos-Vega i sur., 2018). Tijekom procesiranja kakaovog zrna, u ljusku prelaze metilksantini od kojih je najviše zastupljen teobromin (1,63 – 4,77 %), a teofilin i kafein su u tragovima (Jokić i sur., 2018). Masti ljuske kakaovog zrna su po fizikalnim i kemijskim karakteristikama slične onima kakaovog maslaca pa bi se ljuska potencijalno mogla iskoristiti za njihovu ekstrakciju. Prevladavaju palmitinska i oleinska masna kiselina, kaprinska i stearinska su u udjelu manjem od 20 %, dok je linolne masne kiseline u ljusci dvostruko više nego u kakaovom maslacu (Jokić i sur., 2018; Campos-Vega i sur., 2018; Okiyama i sur., 2017). Ljuska kakaovog zrna bogata je polifenolima (24,93 – 32,30 mg GAE/g s. tv.) koji migriraju iz kotiledona, a među njima se ističu flavonoli katehin i epikatehin te procijanidini u obliku monomera i polimera (Jokić i sur., 2018; Okiyama i sur., 2017).

Zahvaljujući sve boljem poznavanju sastava, ljuska kakaovog zrna se sve više implementira u funkcionalne prehrambene proizvode. U posljednje vrijeme primjenjuje se i u pakiranju hrane (Tran i sur., 2017). Martínez-Cervera i suradnici (2011) ispitali su mogućnost primjene ljuske kakaovog zrna u proizvodnji čokoladnih mafina, dok su Öztürk i Ova (2018) ljusku iskoristili kao zamjenu za biljno ulje u proizvodnji torte. Manzano i suradnici (2017) dokazali su povećanu stabilnost ulja za prženje dodatkom ekstrakta ljuske kakaovog zrna. Jozinović i suradnici (2018) obogatili su ekstrudirani snack proizvod ljuskom kakaovog zrna.

2.1.3. Mahuna graška

Grašak (*Pisum sativum* L.) je sezonsko povrće koje se uzgaja širom svijeta. U Indiji, kao

jednom od vodećih svjetskih proizvođača, godišnje zaostane preko milijun tona mahune graška koja se smatra otpadom. Sama mahuna čini oko 30 % mase svježeg ploda (Vinay, 2018), a koristi se uglavnom kao stočna hrana (Babbar i sur., 2014).

Mahunu graška karakterizira visok udjel netopivih prehrambenih vlakana (54,4 g/100 g s. tv.) i proteina (10,8 g/100 g s. tv.) te nizak udjel masti (1,3 g/100 g s. tv.). Od ugljikohidrata male molekulske mase najzastupljenija je glukoza (11,9/100 g s. tv.), a od mineralnih tvari željezo (1,2/100 g s. tv.) (Mateos-Aparicio i sur., 2010). U istraživanju Babbara i suradnika (2014) mahuna graška pokazala je dobru antioksidacijsku aktivnost, a ukupni udjel polifenola bio je 13,6 mg GAE/g s. tv. Neka istraživanja pokazuju njenu hipoglikemijsku aktivnost te bifidogena svojstva (Gupta i Premavalli, 2011; Iwata i sur., 2009).

Rastući je interes za ovom sirovinom kao izvorom proteina za stočnu hranu i intermedijarne proizvode (Ahmad i sur., 2010) te antioksidanasa u medicinske svrhe i za funkcionalne proizvode (Jalili i sur., 2016). Mahuna graška je jeftina i lako dostupna biomasa koja, prema nekim istraživanjima, može poslužiti kao supstrat za proizvodnju celulaze (Verma i sur., 2011), a prikladna je i za proizvodnju bioplina (Ulusoy i sur., 2009). Belghith-Fendri i suradnici (2016) ispitali su mogućnost zamjene pšeničnog brašna u kolaču brašnom mahune graška i graha u svrhu izbjegavanja sintetskih bojila i obogaćivanja proizvoda prehrambenim vlaknima te su zaključili da je takva zamjena moguća u udjelu do 15 %.

2.1.4. Ljuska crvenog luka

Luk (*Allium cepa*, L.) je kultura koja se, nakon rajčica, najviše uzgaja (Griffiths i sur., 2002) te je zabilježena proizvodnja od 97,8 milijuna tona u 2017. Najveći proizvođači su Kina, Indija i SAD (FAO, 2019). Otpad luka nije pogodan kao hrana za životinje zbog karakteristične arome, niti kao organsko gnojivo zbog brzog razvoja fitopatogenih bakterija pa je njegovo iskorištenje vrlo ograničeno (Benítez i sur., 2011). Porastom konzumacije luka u posljednjem desetljeću raste količina zaostalih ljuski koje se smatraju agro-industrijskim otpadom. U Europskoj uniji svake godine zaostane 500 000 tona ljuske luka, ponajprije u Španjolskoj, Nizozemskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu (Gawlik-Dziki i sur., 2015).

Luk je bogat izvor prehrambenih vlakana, fruktooligosaharida, flavonoida i sumpornih spojeva korisnih za ljudsko zdravlje (Benítez i sur., 2011). Udjel flavonoida ljuske luka (2 – 10 g/kg) znatno je veći od udjela u njegovom jestivom dijelu (Akdeniz i sur., 2017). Glavni flavonoidi ljuske luka su flavonoli, koji su odgovorni za smeđu ili bijelu boju nekih varijeteta, i

antocijani, koji su odgovorni za crvenu ili ljubičastu boju (Benítez i sur., 2011). Antocijani čine 10 % ukupnih flavonoida crvenog luka, među kojima su najviše zastupljeni derivati cijanidina. U ljusci luka najzastupljeniji flavonoli su derivati kvercetina (kvercetin diglukozid i kvercetin aciklon), izoramnetina, kempferola i miricetina (Albishi i sur., 2013). Pored navedenih polifenolnih spojeva, Elsebaie i Essa (2018) identificirali su vanilinsku, elaginsku i protokatehinsku kiselinu.

Mourtzinis i suradnici (2018) ekstrahirane polifenole iz otpada luka uspješno su iskoristili za dobivanje crveno obojenog jogurta.

2.1.5. Kora cikla

Cikla (*Beta vulgaris* L.) se najviše uzgaja u Sjevernoj i Srednjoj Americi te Velikoj Britaniji. Uzgaja se u prehrambene i medicinske svrhe, a jestivi su i listovi i korijen (Kumar i Brooks, 2017). Među povrćem je s najvećim antioksidacijskim kapacitetom, a potencijal za uklanjanje ABTS•+ radikala veći je i od češnjaka (Žitňanová i sur., 2006; Vinson i sur., 1998). Prema istraživanju Vulića i sur. (2013), cikla također ima i hepatoprotektivno djelovanje. Brojni pozitivni učinci omogućuju njeno korištenje u prehrambenoj industriji u sastavu antimikrobnih pakiranja hrane (Manohar i sur., 2016) te proizvodnji farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda (Gandía-Herrero i sur., 2014).

Kora sadrži 50 % udjela ukupnih polifenola cikla te više od 54 % betalaina (Vulić i sur., 2013). Od dušičnih pigmenata cikla topivih u vodi, betalaina, najviše je crvenih betacijanina (betanina, izobetanina, betanidina i izobetanidina) (11,83 – 20,93 mg/g s. tv.), a manje žutih betaksantina (vulgaksantina I i II) (10,10 mg/g s. tv.) (Azeredo, 2009; Gasztonyi i sur., 2001; Slatnar i sur., 2015). Slatnar i suradnici (2015) identificirali su ukupno 22 betalaina u cikli. Cikla se smatra najvažnijim izvorom betanina (Jackman i Smith., 1996) te su EFSA i FDA odobrili njihovu primjenu kao prehrambeno bojilo (E-162) (Kumar i Brooks, 2017). U prehrambenoj industriji koriste se za poboljšanje boje umaka, juha, slatkiša, žitarica za doručak (Bandyopadhyay i sur., 2007; Singh i Hathan, 2014) i drugih proizvoda. Mnoge biljne vrste bogate betalainom imaju visok udjel ferulinske kiseline pa tako i cikla, odnosno njena kora (Jackman i Smith., 1996). Ostale polifenolne kiseline u značajnom udjelu zastupljene u kori su protokatehinska, vanilinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzojeva i siringinska kiselina (Kujala i sur., 2000). Kujala i suradnici (2001) izolirali su „neobičan“ polifenolni spoj, 5,5',6,6'-tetrahidroksi-3,3'-bindolil, koji je najviše zastupljen upravo u kori. Osim spomenutih vrijednih

aktivnih spojeva, cikla je bogat izvor i karotenoida, folata i saponina (Singh i Hathan, 2014).

Istraživanja su otkrila potencijal bioaktivnih komponenti cikla u izradi biorazgradivih filmova. U istraživanju Martíneza i suradnika (2006) pokazalo se da imaju povoljan učinak na produljenje roka trajanja svinjskih kobasica smanjujući mogućnost oksidacije, gubitak boje i rast mikroorgaizama. Potvrđeno je da su želatinske kapsule na bazi filma u koje je inkorporiran prah rezanaca cikla učinkovite u zaštiti suncokretovog ulja od oksidacije (Iahnke i sur., 2015). Betanini cikla inkorporirani u bioelastomere na bazi škroba utječu na njihov visok antioksidacijski kapacitet (Tran i sur., 2017), a imobilizirani u polietilenski omotač omogućuju značajno smanjenje rasta bakterija *S. aureus* u govedini i skuti (Manohar i sur., 2016).

2.1.6. Ljuska oraha

Orah (*Juglans regia* L.) je najrasprostranjeniji orašasti plod u svijetu (Taha i Al-wadaan, 2011). U Turskoj, koja je među najvećim svjetskim proizvođačima, jedan je od najvažnijih poljoprivrenih proizvoda. Cijela biljka može se iskoristiti za potrebe raznih grana industrije. Različite su namjene oraha u prehrambenj industriji, a neki od najpoznatijih proizvoda za koje se koristi orah su halva, lokum i baklava. Kako su u Turskoj ljuske voća i drugi poljoprivredni otpad potencijalno važan izvor energije (Ertürk i Akça, 2014; Kar, 2011), tako se ljuska oraha spaljuje u svrhu grijanja (Ayrimis i sur., 2013) zbog visoke energetske vrijednosti od 20,18 MJ/kg (Sürmen i Demirbaş, 2003).

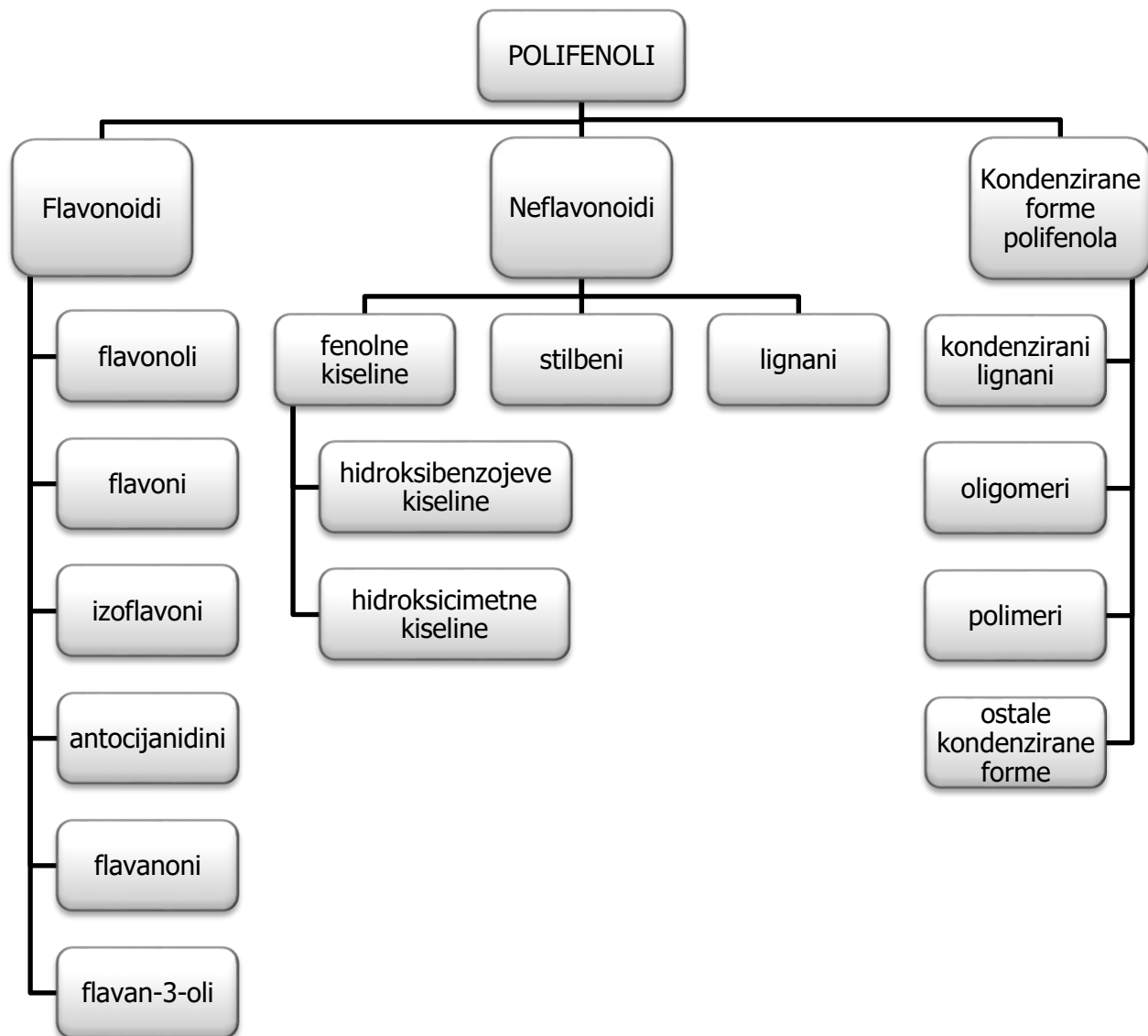
Ljuska čini čak 67 % mase ploda (Ayrimis i sur., 2013), a najvećim je dijelom sačinjavaju celuloza (25,5 %), hemiceluloza (22,2 %) i lignin (52,3 %) (Demirbaş, 2005). Bogat je izvor fitokemikalija s antioksidacijskim i medicinskim svojstvima (Ganesapillai i sur., 2016) te ima najveći antioksidacijski kapacitet među svim orašastim plodovima (Jalili i sur., 2012). No, malo je istraživanja, poput onoga Hana i suradnika (2018), provedeno s ciljem pronalaska optimalnih uvjeta ekstrakcije koji će pridonjeti najvećem prinosu biokomponenti. Ganesapillai i suradnici (2016) u svom su istraživanju usporedili prinos uzoraka prethodno tretiranih ultrazvukom i mikrovalovima s konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom. Neka istraživanja, poput onoga Yanga i Qiu (2010), pokazuju da je ljuska oraha jeftina sirovina i dobar prekursor za proizvodnju aktivnog ugljena za pročišćavanje vode. Nažalost, primjena ovog agro-industrijskog otpada vrlo je ograničena, kao i znanstvena istraživanja vezana uz njegovu karakterizaciju i uporabu.

2.2. Polifenolni spojevi

Sekundarni biljni metaboliti su organski spojevi, raznolike strukture i esencijalnih uloga u biljnom svijetu štiteći biljke od raznih čimbenika, privlačeći oprašivače, itd. Prema biosintetskom porijeklu, sekundarni biljni metaboliti dijele se u tri skupine: polifenolni spojevi, terpenoidi te alkaloidi i spojevi sa sumporom (Crozier i sur., 2006).

Od svih fitokemikalija u biljkama najviše je polifenolnih spojeva. S obzirom na to da su biljke glavni dio ljudske prehrane (voće, povrće, žitarice, čaj, esencijalna ulja, pića), može se reći da su polifenolni spojevi najvažnije nenutritivne bioaktivne komponente (Zhang i Tsao, 2016). Polifenoli privlače sve veću pažnju jer su snažni antioksidansi izraženih protuupalnih, antimikrobnih, antialergijskih, antikancerogenih i brojnih drugih bioloških i farmakoloških učinaka (Federici i sur., 2009). Epidemiološka, klinička i nutricionistička istraživanja dokazuju da polifenolni spojevi smanjuju rizik i sprječavaju nastanak degenerativnih bolesti, uključujući kancerogene i kardiovaskularne bolesti te poremećaje metabolizma. No, stabilnost polifenolnih spojeva niska je u slučaju izloženosti ekstremnim pH vrijednostima, temperaturi, kisiku, svjetlu, metalnim ionima i enzimima (Gabbay Alves i sur., 2016). Stoga udjel polifenola koji se unese hranom često ne odgovara njihovoj bioraspodjelivosti u organizmu (*in vivo*) jer se mala količina apsorbira u gastrointestinalnom traktu (Zhang i Tsao, 2016).

Polifenoli su spojevi s barem jednim aromatskim prstenom na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Poznato je više od 8 000 takvih spojeva koji se dijele na brojnije flavonoide, i neflavonoide (Crozier i sur., 2006). Polifenoli imaju sposobnost keliranja metala, a njihova antioksidacijska aktivnost očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres odnosno indukciji „antioksidacijskih“ enzima. Otkriveno je da barem osamnaest flavonoida ima veću antioksidacijsku učinkovitost od vitamina C i E (Berend i Gabrić, 2008). Polifenoli su prirodno većinom prisutni kao konjugati povezani s mono- i polisaharidima povezani s jednom ili više fenolnih skupina te se mogu pojavljivati kao funkcionalni derivati, esteri i metilesteri (Balasundram i sur., 2006). Zrelost, varijetet i procesiranje neki su od brojnih čimbenika koji utječu na koncentraciju polifenola u biljnom materijalu. Također njihova raspodjela u biljci je nejednolika (Crozier i sur., 2006), pri čemu se hidrofobni spojevi nalaze u staničnim stijenkama, a hidrofilni u vakuolama (Stalikas, 2010). U literaturi postoje brojni načini klasifikacije polifenolnih spojeva, a na Slici 2 prikazan je jedan od njih.



Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (Fuss, 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010)

Najveća koncentracija flavonoida prisutna je u epidermi lišća i kori. Flavoni, za razliku od flavonola, nisu široko rasprostranjeni. Može ih se naći u biljkama poput celera ili peršina, a neki su specifični za citrusne (nobiletin, tangeretin). Najkompleksniji flavonoidi su flavan-3-oli koji se nalaze u obliku monomera (katehin ili izokatehin), oligomera ili polimera (proantocijanidini/kondenzirani tanini), a poznati su po tome što obogaćuju zeleni i crni čaj. Najzastupljeniji biljni proantocijanidini su procijanidini, spojevi koji se sastoje isključivo od (epi)katehinskih jedinica, a nalaze se u visokoj koncentraciji u sirovinama od kojih se proizvode crno vino i čokolada. Vidljivi flavonoidi su antocijanidini koji su odgovorni za crvenu, plavu ili

ljubičastu boju lišća, stabljike, cvijeta, sjemenki ili tkiva korijena. Flavonoidi prisutni u visokim koncentracijama u citrusima su flavanoni (hesperidin, neohesperidin, naringin) te su odgovorni za njihovu specifičnu aromu. Neohesperidin dihidrohalkon se, pak, upotrebljava kao zaslađivač u bezalkoholnim pivima. Flavonoidi koji imaju protektivni učinak od kancerogenih oboljenja prostate i dojke su izoflavoni (genistein, daidzein) prisutni u mahunarkama.

Za trpkost čaja i crvenog vina odgovorni su neflavonoidi tanini koji povoljno djeluju na kolagen, a nalaze se i u vanjskim slojevima nezrelih plodova. Hidroksicimetne kiseline su primjerice odgovorne za ograničavajući dnevni unos kave i čaja. Grožđe, vino, soja i kikiriki glavni su prehrambeni izvori stilbena, među kojima je najpoznatiji resveratrol (Crozier i sur., 2006).

2.3. Jestivi filmovi

Postupak prevlačenja hrane voskovima ili želatinom patentiran je još 1800. godine iz estetskih razloga i kako bi se spriječio gubitak vlage. Nedostaci tradicionalne jestive ambalaže (ovitak kolagena na mesnim proizvodima nije topiv u vodi i nije baš prihvatljiv za konzumiranje, ljepljivost i masna površina čokoladnih ili šećernih glazura) uvjetovali su razvoj novih tipova zaštitnih materijala na osnovi polimernih filmova (prevlaka) pa tako nastaje pojam „jestivi fim“ (Galić, 2009; Huber i Embuscado, 2009). Jestivi filmovi tanki su sloj materijala koji se može konzumirati, a osigurava barijeru migraciji vlage, plinova i otopljenih tvari između namirnice i okoline. Takav sloj može se nalaziti između komponenti hrane ili proizvod njime može biti potpuno prekriven (Bourtoom, 2008; Huber i Embuscado, 2009). Prednosti primjene jestivih zaštitnih filmova u odnosu na nejestive filmove su: (I) mogućnost konzumacije, (II) relativno niski troškovi, (III) lakša razgradnja u okolišu jer se se proizvode isključivo od obnovljivih, jestivih sastojaka, (IV) poboljšanje senzorskih (dodatkom spojeva arome, boje, zaslađivača), mehaničkih (dodatkom plastifikatora) i nutritivnih svojstava hrane (dodatkom antimikotnih tvari ili antioksidansa), (V) zaštita manjim porcijama hrane, (VI) barijera između komponenti heterogene hrane (Galić, 2009; Bourtoom, 2008). Uporabom jestivih filmova omogućava se poboljšana kvaliteta, trajnost, sigurnost i funkcionalnost hrane (Galić, 2009). No, barijerna i mehanička svojstva jestivih filmova lošija su od sintetskih, stoga su potrebna daljnja istraživanja u pronalasku novih materijala, metoda izrade i mogućnosti primjene jestivih filmova (Bourtoom, 2008).

Materijal od kojega se izrađuje hidrokolojni film (proteini i polisaharidi), lipidni film (masne kiseline, acilglicerol, voskovi) ili kompozit (kombinacija hidrokolojda i lipida) mora biti raspršen i otopljen u otapalu čiji je odabir, u proizvodnji prehrambenih filmova, ograničen na vodu (s različitom pH vrijednosti) i etanol. U tom postupku mogu se dodati plastifikatori, antimikrobna sredstva, boje ili arome. Koncentracija otopine je kompromis između optimalne viskoznosti i topivosti polimera. Temperatura i pH prilagođavaju se ovisno o polimeru radi bolje disperzije. Primjena previsoke temperature ili previsoke brzine evaporacije otapala rezultira nekohezivnim filmovima zbog prebrze imobilizacije polimernih molekula što može dovesti do ljuštenja ili nastajanja rupičaste strukture. Stupanj kohezije u polimernom materijalu uvjetuje svojstva poput gustoće, kompaktnosti, poroznosti, permeabilnosti, fleksibilnosti i žilavosti filma. Stoga je za dobivanje proizvoda željenih svojstava od presudne važnosti definiranje parametara. Dobivena otopina zatim se izlijeva i suši pri određenim uvjetima kako bi se dobili samostalni filmovi. Postupci poput uranjanja, prskanja, premazivanja koriste se za primjenu filma na supstrat (hranu) (Galić, 2009; Bourtoom, 2008).

2.3.1. Postupci izrade jestivih filmova

Najčešće korišteni postupci izrade jestivih filmova su lijevanje otopine jestivog filma, ekstruzija, prskanje, uranjanje te premazivanje (Tablica 1) (Dhanapal i sur., 2012). U ovome radu korišten je postupak lijevanja otopina.

Tablica 1. Najčešće korišteni postupci izrade jestivih filmova i njihove karakteristike

Postupak	Karakteristike	Referenca
Lijevanje otopine jestivog filma	<ul style="list-style-type: none"> ○ isparavanjem otapala iz otopine smanjuje se topljivost polimera ○ važno je odabrati polimer koji će se lako odvojiti od podloge ○ sušenje do optimalnog udjela vode (5 – 10 % w/v) ○ struktura filma ovisi o sastavu otopine, debljini mokrog lijevanja i uvjetima sušenja (temperatura i relativna vlažnost) ○ brzo sušenje ograničava pokretljivost polimernog lanca i razvoj intermolekulskih interakcija u filmu 	Parreidt i sur., 2018; Dhanapal i sur., 2012

* nastavak Tablice 1

Ekstruzija	<ul style="list-style-type: none"> ○ zasniva se na termoplastičnim svojstvima polimera ○ prednosti u odnosu na postupak lijevanja su što se smanjuje utrošak vremena i energije da se ukloni voda te se mogu koristiti koncentriranije otopine ○ sastojci se miješaju i guraju prema naprijed kroz kalup željeznog oblika 	Parreidt i sur., 2018; Espitia i sur., 2014; Huber i Embuscado, 2009
Prskanje	<ul style="list-style-type: none"> ○ koriste se umjereno viskozne otopine ○ za tanje filmove i primjenu na jednu stranu proizvoda ○ sustav za prskanje pomoću mlaznica distribuira otopinu ○ prednosti su: jednolika prevlaka, kontrola debljine, mogućnost višeslojnog nanošenja, izbjegavanje onečišćenja otopine premaza, kontrola temperature otopine i omogućavanje rada s velikim površinama 	Huber i Embuscado, 2009; Parreidt i sur., 2018
Uranjanje	<ul style="list-style-type: none"> ○ za namirnice nepravilnog oblika i hrapavih površina ○ uranjanje namirnice (5 sec – 30 min) u različite otopine ○ višestruko uranjanje za potpunu i ujednačenu pokrivenost 	Huber i Embuscado, 2009; Parreidt i sur., 2018
Premazivanje	<ul style="list-style-type: none"> ○ manji gubitak vlage svježeg graha i jagoda nego zamatnjem i uranjanjem 	Ayranci, 1997

2.3.2. Funkcionalni jestivi filmovi

Inkorporiranjem bioaktivnih sastojaka (poput antioksidansa) u jestive filmove oni postaju potencijalno primjenjivi u očuvanju hrane te se poboljšavaju funkcionalna svojstva, sigurnost i kvaliteta proizvoda (Eça i sur., 2014). Prirodni antioksidansi mogu se dodavati u obliku ekstrakata (Li i sur., 2019.), esencijalnih ulja (Nisar i sur., 2017.) ili drugih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem (Blanco-Fernandez i sur., 2012; Pérez i sur, 2012), čime bi se zamijenili sintetski antioksidansi (Slika 3) o čijoj toksičnosti se provode brojna istraživanja (Bandyopadhyay i sur., 2007). Ekstrakti voća i povrća zanimljivi su zbog svojstva bojenja filma čime se postiže kontrola foto-oksidacije, a ne dovode ni do smanjenja fizičkih svojstava filma jer

imaju dobru interakciju s komponentama matriksa filma. Esencijalna ulja smanjuju lipidnu peroksidaciju i produljuju rok trajanja proizvoda, no, zbog utjecaja na senzorska svojstva, njihova primjena u prehrambenoj industriji je ograničena. Jedan od načina da se riješi taj problem je njihovo inkorporiranje u jestive filmove (Eça i sur., 2014).

Novija znanstvena istraživanja dokazuju da su inkorporiranjem bioaktivnih spojeva poboljšana sljedeća svojstva: toplinska, mehanička i antibakterijska dodatkom ricinusovog ulja (Abdel Aziz i sur., 2018), optička i antioksidacijska dodatkom praha cikle (Sucheta i sur., 2019), čvrstoća proizvoda te smanjenje enzimskog posmeđivanja i respiracije dodatkom esencijalnog ulja timijana (Sarengaowa i sur., 2017). Međutim, kvaliteta i antioksidacijska aktivnost takvih proizvoda još nisu dovoljno istraženi (Eça i sur., 2014), kao ni širok spektar prirodnih biljnih izvora s bioaktivnim svojstvima za proizvodnju jestivih filmova (Mir i sur., 2018).



Slika 3. Bioaktivni spojevi za proizvodnju funkcionalnih jestivih filmova (Eça i sur., 2014)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. UZORCI SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada korištene su sljedeće sekundarne biljne sirovine (Slika 4) s pripadajućim oznakama:

- kora banane (**KB**) (robni marki Derby (Kostarika) i Bonita (Ekvador)), kora cikle (**KC**), ljuska oraha (**LJO**) i mahuna graška (**MG**), prikupljene kao otpad domaćinstva
- ljuska crvenog luka (**LJCL**) prikupljena kao otpad studentske menze „Superfaks“
- ljuska kakaovog zrna (**LJKZ**) prikupljena kao nusproizvod konditorske industrije „Kandit d.o.o.“.

Sve navedene sirovine, nakon prikupljanja, osušene su na sobnoj temperaturi, usitnjene u električnom mlinu za domaćinstvo te prosijane kroz sito veličine pora 450 μm (400 μm ljuska luka). Za sve daljne analize sirovina te pripremu ekstrakata korištene su frakcije s veličinom čestica manjom od 450 μm (400 μm ljuska luka).



KB (Anonymous 1)



KC (Anonymous 2)



LJO (Anonymous 3)



MG (Anonymous 4)



LJCL (Anonymous 5)



LJKZ (Panak Balentić i sur., 2018)

Slika 4. Korištene sekundarne biljne sirovine

3.1.2. KEMIKALIJE

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) ili HPLC čistoće.

Određivanje fizikalno-kemijskih parametara

Određivanje udjela suhe tvari/vode

- Kvarcni pijesak, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela proteina

- Borna kiselina (4 %-tna otopina), T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Kjeldahl tablete (bez žive i selena), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (0,1 M), KEFO d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Obojeni indikator: bromkrezol zeleno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Obojeni indikator: metil crveno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (96 %-tna otopina), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)

Određivanje udjela masti

- Petroleter, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih vlakana

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Celite 545, Fisher Scientific (Loughborough, Velika Britanija)
- Enzimski set za određivanje vlakana, Megazyme International Ireland (Wicklow, Irska)
- Octena kiselina (2 M), Alkaloid (Skoplje, Makedonija)
- Etanol (78 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Maleinska kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Trizma Base 0,75 M otopina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela prirodnog i ukupnog inverta gravimetrijskim postupkom

- Fehlingova I otopina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Fehlingova II otopina

- Klorovodična kiselina (20 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (30 %-tna otopina), T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev oksalat, Acros Organics (New Jersey, SAD)
- Olovni acetat, Honeywell Riedel-de Haën (Seelzeu, Njemačka)

Određivanje bioaktivnog sastava

Priprema vodenog i etanolnog ekstrakata

- Destilirana voda
- Etanol (70 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (20 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Standard: galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela flavonoida i neflavonoida

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid (35 %-tni), T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (20 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS) (7mM otopina), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat (140 mM otopina), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- Standard: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilokroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (1 mM otopina), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (0,094 mM otopina), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

Određivanje udjela flavona i flavonola

- Aluminijski klorid (10 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Kalijev acetat (1 M otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (75 %-tni), Carlo-Erba (Peypin, Francuska)

Određivanje udjela flavan-3-ola

- Klorovodična kiselina (37 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- Vanilin, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

- Arnou reagens (10 %-tna vodena otopina natrijevog nitrita (Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)) i natrijevog molibdata (Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka))
- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (8,5 %-tna otopina), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela proantocijanidina

- 2 %-tna otopina amonij željezo (II) sulfat dodekahidrata, Kemika (Zagreb, Hrvatska), u 2 M klorovodičnoj kiselini
- Klorovodična kiselina (37 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- *n*-butanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih antocijana

- 96 %-tni etanol (Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska) s 0,1 % v/v klorovodične kiseline (KEFO d.o.o. (Ljubljana, Slovenija) (0,1 mL HCl + 96% EtOH do 100 mL)
- Klorovodična kiselina (2 %-tna otopina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogen sulfat (15 %-tna otopina)

Određivanje udjela ukupnih karotenoida

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- *n*-heksan, Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)

Određivanje udjela ukupnog klorofila

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija filmova

Priprema jestivih filmova

- Alginat, Sigma-Aldrich (SAD)

- Destilirana voda
- Glicerol
- Pektin, Herbstreith & FoxKG (Neuenbürg, Njemačka)
- Vodeni ekstrakt kore banane

Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova

- Destilirana voda

Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova

- Pripremljena simulacijska otopina gastrointestinalnog trakta

3.1.3. APARATURA I PRIBOR

- Aluminijske posudice s poklopcem, aparatura po Soxhletu, Büchnerov lijevak, Bünsenov plamenik, celulozne čahure za ekstrakciju, čelične čeljusti (širine 30 mm), eksikator, Eppendorf epruvete, porculanska zdjelica i filter lončić, posudice za vaganje od nehrđajućeg čelika, sito poroziteta 450 i 400 μm , vodena kupelj s tresilicom, vodena vakuum sisaljka, špatule
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Analizator tekture TA.HDPlus, Stable Micro Systems(Cardiff, Velika Britanija)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Waltham, SAD)
- Digitalni mikrometar, Helios-Preisser, Type 40 EX (Njemačka)
- Filter papir, Whatman br. 4, GE Healthcare (Buckinghamshire, Velika Britanija)
- Hvataljke u obliku potkove A/HDG, Stable Micro Systems (Velika Britanija)
- Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju, FOSS (Haganäs, Švedska)
- Kolorimetar CM-3500D, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Laboratorijska tresilica Certomat RM, Sartorius (Göttingen, Njemačka)
- Laboratorijske boce s čepovima (250 mL), Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- Magnetna mješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Malvern Mastersizer 2000 s jedinicom za doziranje i disperziju praškastih uzoraka, Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Velika Britanija)
- Mufolna peć Heraeus KR-170, W.C. Heraeus GmbH (Hanau, Njemačka)

- Poluautomatska aparatura za određivanje dušika prema Kjeldahl-u, Kjeltec TM 2100, FOSS (Haganäs, Švedska)
- Rotacijski vakuum uparivač (R-205) s pripadajućom vodenom kupelji (B-490), Büchi (Flawil, Švicarska)
- Sinter lončići (porozitet 2), Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Spektrofotometar (Helios γ, Thermo Spectronic, Velika Britanija)
- Stakleno posuđe: birete, boce za vakuum odsisavanje, laboratorijske čaše, epruvete, kivete, odmjerne i Erlenmayer tikvice, Petrijeve zdjelice (unutarnjeg promjera 11,7 cm), pipete, menzure, viala
- Termoblok za mineralizaciju uzoraka s nastavkom za odsis para, Digestion system 6, 1007 Digester, Tecator (Hillerød, Danska)
- Ultrazvučna kupelj, Elmasonic S 60 H (Singen, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema etanolnog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina

Etanolni ekstrakt sekundarnih biljnih sirovina priprema se prelijevanjem 5 g suhog i usitnjenog biljnog materijala s 50 mL 70 %-tnog etanola. Ekstrakcija se provodi 30 min, uz konstantno miješanje na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, sadržaj se pomoću staklenog štapića kvantitativno prenese i filtrira pomoću filter papira (Whatman br. 4) na Büchnerovom lijevku. Postupak ekstrakcije zaostalog krutog dijela nakon filtracije ponovi se još dva puta te se dobiveni ekstrakti spoje i čuvaju u hladnjaku na 4 °C za daljnje analize.

3.2.2. Priprema vodenog ekstrakta kore banane

Vodeni ekstrakt kore banane priprema se prelijevanjem 4 g suhog i usitnjenog materijala s 80 mL destilirane vode prethodno zagrijane na 80 °C. Ekstrakcija se provodi 30 min, uz konstantno miješanje i održavanje temperature na 80 °C. Nakon ekstrakcije, sadržaj se pomoću staklenog štapića kvantitativno prenese i filtrira pomoću filter papira (Whatman br. 4) na Büchnerovom lijevku. Dobiveni filtrat nadopuni se destiliranom vodom do 80 mL i takav koristi za daljni rad.

3.2.3. ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA

3.2.3.1. Određivanje udjela suhe tvari/vode

Udjel suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990a) metodi.

Postupak rada

Odvaži se 1 g homogeniziranog uzorka u prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Posudica s uzorkom i poklopac suše se u sušioniku pri 105 °C dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću ±0,0003g). Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi udjel vode u uzorku.

Izračun rezultata

Postotak vode i suhe tvari računa se prema formulama:

$$\boxed{\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100} \quad (1)$$

$$\boxed{\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode}} \quad (2)$$

gdje su:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.3.2. Određivanje udjela proteina

Udjel proteina određen je prema normi HRN EN ISO 20483 (2014).

Postupak rada

1. Mineralizacija

U Kjeldahl kivete izvaže se po 1 g uzorka. U svaku kivetu dodaju se 2 tablete Kjeldahl katalizatora i 12 mL koncentrirane sulfatne kiseline te se lagano miješa dok se uzorak potpuno navlaži s kiselinom. Po završetku reakcije, stalak sa epruветama stavi se u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključi se sistem za odvod para. Prvih 10 minuta spaljivanje ide uz maksimalan protok vode nakon čega se protok vode smanji na 50 %. Mineralizacija je gotova nakon ~60 min, a tekućina u kivetama je bistra i svijetlo plave boje. Kivete se zajedno sa stalkom uklone iz digestijske jedinice i ostave hladiti zajedno s poklopcem do sobne temperature. Tada se u svaku kivetu oprezno doda 80 mL destilirane vode.

2. Alkalizacija i destilacija

Uključi se uređaj za destilaciju, pusti se voda da se napuni generator pare te se na postolje predviđeno za prihvatnu tikvicu stavi prazna tikvica, a na mjesto predviđeno za Kjeldhalovu kivetu stavi prazna kiveta. Spuste se zaštitna vratašca te se pokrene generator pare. Nakon nekoliko minuta u prihvatnu tikvicu skupit će se kondenzat što je dokaz da je sistem zagrijan i u funkciji. Otvore se zaštitna vratašca, prihvatna se tikvica zamjeni tikvicom u kojoj se nalazi 25 mL borne kiseline, a Kjeldahlova kiveta se zamjeni kivetom u kojoj se nalazi spaljeni uzorak i 80 mL destilirane vode. Dozira se 50 mL 40 %-tnog NaOH u kivetu i pokreće se destilacija. Destilacija se odvija automatski otprilike 4 minute (do volumena 125 mL). Destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka.

3. Titracija klorovodičnom kiselinom

Destilat se titirara s kiselinom (0,1 N). U završnoj točki titracije boja otopine postane blijedo ružičasta.

Izračun rezultata

Formula za izračunavanje udjela dušika je:
$$\% N = \frac{\{(a-b) \times N \times f \times 1,4007\}}{m}$$
 (3)

gdje su:

a – volumen HCl utrošen za titraciju uzorka u mL

b – volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe u mL

N – molaritet kiseline

f – faktor kiseline

m – masa uzorka u g

Formula za izračunavanje udjela proteina je:
$$\% \text{ proteina} = \% N \times F$$
 (4)

gdje je:

F – faktor za preračunavanje dušika u proteine: 6,25

3.2.3.3. Određivanje udjela masti

Udjel masti određen je prema modificiranoj AOAC 920.39 (1990b) metodi.

Postupak rada

Odvaže se 10 g osušenog i usitnjenog uzorka u celulozne čahure koje se začepi na vrhu suhom vatrom te se postave uspravno u Soxhlet ekstraktor. U ekstraktor se pomoću lijevka ulijeva otapalo u volumenu 2 ekstraktora (volumen ekstraktora je volumen otapala potreban da se otapalo prelije iz ekstraktora u tikvicu preko preljevne cijevi). Tikvica s kuglicama za vrenje i ekstraktorom spoji se na hladilo i započne se sa zagrijavanjem. Ekstrakcija traje 6 h uz brzinu ekstrakcije 10 – 12 sifona po satu (jedan sifon je oznaka za jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu preko preljevne cijevi), nakon čega se tikvica s otapalom i ekstrahiranom masti odvoji od ostatka aparature. Otapalo iz tikvice se otpari na rotacijskom vakuum uparivaču, a tikvica s ekstrahiranom masti suši se do konstantne mase pri 105 °C te se hladi i čuva u eksikatoru.

Izračun rezultata

Masa ekstrahirane masti izračuna se iz razlike konstantnih masa tikvice s ekstrahiranom masti i prazne tikvice s kuglicama za vrenje, dok se udjel računa obzirom na masu početnog uzorka (ili suhe tvari) korištenog za ekstrakciju prema formuli:
$$\% \text{ masti} = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \times 100$$
 (5)

gdje je:

m_1 – masa prazne tikvice s kuglicama za vrenje (g)

m_2 – masa tikvice s ekstrahiranom masti (g)

m_3 – početna masa uzorka u celuloznoj čahuri (g)

3.2.3.4. Određivanje udjela mineralnog ostatka (pepela)

Određivanje udjela mineralnog ostatka provedeno je prema normi HRN EN ISO 2171 (2010).

Postupak rada

Izvaže se 2 g uzorka u izžarene i izvagane zdjelice za spaljivanje. Da bi se postiglo ujednačeno izgaranje proizvoda, sadržaj u posudi, neposredno prije izgaranja, navlaži se s 1 mL etanola. Zdjelica s izvaganim uzorkom najprije se zagrijava na Bünsenovom plameniku. Čim sadržaj u posudi ugljenizira, posuda se pažljivo unosi u mufolnu peć, prethodno zagrijanu do temperature od 550 ± 20 °C. Izgaranje se smatra završenim kad ohlađeni uzorak bude bijele boje. Kad izgaranje završi, uzorci se ostave neko vrijeme u mufolnoj peći da se ohlade, nakon čega se prebacuju u eksikator da se ohlade do sobne temperature te važu s točnošću $\pm 0,0001$ g.

Izračun rezultata

Količina pepela iskazuje se u postotcima mase prema suhoj tvari i izračunava prema ovoj

formuli:
$$\boxed{\text{količina pepela (\% m/m)} \times \frac{100}{m_0} \times \frac{100}{100-v}} \quad (6)$$

gdje su :

m_0 – masa ispitanog uzorka (g)

m_1 – masa ostatka (g)

v – količina vode u ispitanom uzorku (%)

3.2.3.5. Određivanje udjela ukupnih vlakana

Određivanje udjela ukupnih vlakana provedeno je prema AOAC 2011.25 (2012) metodi.

Priprema i hidroliza uzorka

Odvaže se 1 g usitnjenog uzorka u laboratorijske boce (250 mL). Uzorak se navlaži s 1 mL etanola (95 %-tni), doda se 40 mL maleatnog pufera (pH 6,0) koji sadrži pankreasnu α -amilazu i amiloglukozidazu. Uzorci se inkubiraju na tresilici pri 37 °C tijekom 16 h, pri brzini okretaja 120 rpm. Enzimska reakcija se zaustavlja dodatkom 3,0 mL 0,75 M trizma bazične otopine

(konačni pH ~8,2) te zagrijavanjem sadržaja boca u vodenoj kupelji na 95 – 100 °C kroz 20 minuta. Sadržaj boca ohladi se na 60 °C i potom se doda 100 µL otopine proteaze. Sadržaj se inkubira na 60 °C tijekom 30 minuta uz trešnju. Boce se izvade iz kupelji, a enzimska reakcija se odmah zaustavlja dodavanjem 4,0 mL 2 M octene kiseline (konačni pH ~4,3).

Određivanje ukupnih vlakana

Nakon vađenja uzoraka iz kupelji, vlakna se talože barem 1 h s 19 mL 95 %-tnog etanola prethodno zagrijanog na 60 °C. Nakon taloženja, uzorak (m_2) se filtrira pod vakuumom kroz sinter lončice s Celitom (m_1) (koji je prethodno namočen s ~15 mL 78 %-tnog etanola). Uzorak se profiltrira kroz lončić i sve čestice se kvantitativno prenesu preko lončica sa 78 %-tnim etanolom. Ostatak na lončiću se ispiru redom dvaput sa po 15 mL: 78 %-tnog etanola, 95 %-tnog etanola i acetona te osuši preko noći na 105 °C, prekriven alu-folijom. Ohlađeni lončić s ostatakom se izvaže (m_3).

Izračun rezultata

Udjel vlakana računa se prema formuli:
$$\% \text{ vlakana} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (7)$$

gdje su:

m_1 – masa praznog lončića (g)

m_2 – masa lončića s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa lončića s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.3.6. Određivanje udjela prirodnog i ukupnog inverta

Udjel prirodnog i ukupnog inverta te saharoze određen je prema metodama AOAC 31.037 – 31.044 (1985) i AOAC 37.1.51.; 37.1.52; 44.1.16; 44.1.17 (1995)

Određivanje udjela reducirajućih šećera prije i nakon inverzije

Postupak rada

Odvagne se 10 g homogeniziranog uzorka u laboratorijsku čašu od 250 mL, razrijedi s oko 100 mL destilirane vode i zagrijava na plameniku uz povremeno miješanje staklenim štapićem dok tekućina postane homogena. Tako homogenizirani uzorak prebaci se kvantitativno preko staklenog lijevka u odmjernu tikvicu od 250 mL, ohladi i doda zasićena otopina neutralnog olovnog acetata u suvišku (oko 2 mL je obično dovoljno). Sadržaj tikvice se promiješa, dopuni

do oznake volumena i filtrira pri čemu se odbaci prvih nekoliko mililitara filtrata. Zatim se doda osušeni kalijev ili natrijev oksalat, kako bi se istaložio višak olova korištenog u procesu bistrenja, promiješa i ponovno filtrira odbacujući prvih nekoliko mililitara filtrata.

Za inverziju pri sobnoj temperaturi prebaci se 25 mL bistrog i bezolovnog filtrata u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda 10 mL 20 %-tne klorovodične kiseline i 20 mL vode te stavi 10 minuta u vodenu kupelj pri 60 °C (prve 3 minute se sadržaj tikvice mućka u kupelji). Nakon 10 minuta, tikvica se izvadi iz kupelji, ohladi i zatim neutralizira s 30 %-tnom otopinom natrijeva hidroksida uz indikator te nakon neutralizacije dopuni do oznake. Uzima se alikvotni dio i određuje se ukupni šećer kao invertni šećer (formula 8) te se izračuna udjel saharoze (formula 9).

Određivanje udjela reducirajućeg i/ili invertnog šećera

Postupak rada

25 mL pripravljene Fehlingove I i Fehlingove II otopine prebaci se u Erlenmeyerovu tikvicu te doda 25 mL filtrata. Tikvica s otopinom se zagrije na plameniku preko azbestne mrežice, namjestivši plamenik tako da sadržaj zavrije u vremenu od 4 minute te se nastavi vrenje točno 2 minute. Tijekom zagrijavanja Erlenmeyerova tikvica je pokrivena satnim stakalcem. Vruća otopina filtrira se odjednom kroz porculanski filter (određene poroznosti, prethodno osušeni, ohlađeni i izvagan) pomoću odsisne boce i sisaljke uz vodeni mlaz. Kvantitativno prebačeni talog (Cu₂O), ispere se vrućom destiliranom vodom. Talog se suši 30 minuta u zračnoj sušnici pri 100 °C, hladi u eksikatoru i važe. Iz Hammondovih tablica očitava se udjel invertnog šećera ekvivalentan izvavanoj masi Cu₂O. 1 g invertnog šećera odgovara 0,95 g saharoze.

Izračun rezultata

Udjel šećera računa se prema formuli:
$$\% \text{ šećera} = \frac{a \times 100}{b \times 1000} \quad (8)$$

gdje su:

a – očitani udjel šećera iz Hammondovih tablica (mg)

b – masa uzorka u alikvotnom dijelu filtrata uzetom u konačni postupak (g)

Izračunavanje udjela saharoze

Udjel saharoze računa se prema formuli:
$$\% \text{ saharoze} = (b - a) \times 0,95 \quad (9)$$

gdje je:

a – udjel reducirajućih šećera prije inverzije (%)

b – udjel reducirajućih šećera nakon inverzije (%)

3.2.4. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG SASTAVA

3.2.4.1. Određivanje ukupnih polifenola

Princip metode

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola (UP) temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (polifenoli), pri čemu je intenzitet obojenja izravno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Izračun rezultata

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje prema formuli:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad (10)$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provodi se u tri

paralelene probe (n=3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po g uzorka.

3.2.4.2. Određivanje udjela flavonoida i neflavonoida

Princip metode

Za taloženje flavonoidnih spojeva primjenjuje se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksiflavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojem također na C-6 ili C-8 položaju (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada

U Eppendorf epruvete otpipetira se 0,5 mL uzorka, 250 μ L otopine klorovodične kiseline (razrijeđena s vodom 1:4) i 250 μ L formaldehida. Epruvete se zatvore, izmiješaju i ostave stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se u tako pripremljenim otopinama odredi udjel ukupnih neflavonoida prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnih polifenola. Udjel ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udjela prethodno određenih ukupnih polifenola i neflavonoida.

3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode

Kemijskom ili enzimskom oksidacijom ABTS otopine razvija se plavo-zeleni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), odnosno ABTS radikal-kation. Dodatak antioksidansa iz uzorka rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o vremenu i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala (Re i sur., 1999).

Postupak rada

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine na 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$. Volumen od 20 μ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 20 μ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (2 mL

otopine ABTS+ radikala). Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje za računanje antioksidacijskog kapaciteta:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad (11)$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard Trolox-a, određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u tri paralelene probe (n=3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a/g uzorka.

3.2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora (antioksidans) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Apsorbancija te otopine mora biti ~ 1 . U tamnu epruvetu se otpipetira 100 μL uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μL metanola te 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH.

Izračun rezultata

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje za računanje antioksidacijskog kapaciteta:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad (12)$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provodi se u tri paralelene probe (n=3), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a po g uzorka.

3.2.4.5. Određivanje udjela flavona i flavonola

Princip metode

Reakcijom aluminijevog klorida s C-4 keto grupom ili s C-3/C-5 OH grupom flavona i flavonola nastaje stabilni kompleks, čiji se intenzitet nastalog obojenja mjeri spektrofotometrijski na 435 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu flavona i flavonola (Chang i sur., 2002).

Postupak rada

Za određivanje udjela flavona i flavonola u epruvetu se otpipetira 500 μ L uzorka (razrjeđenje 1:10) te se doda 1,5 mL 75 %-tnog metanola, 100 μ L 1 M KCH_2COOH , 100 μ L $AlCl_3$ i 2,8 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa se izmiješa te se odmah očita apsorbancija na 435 nm. Potrebno je pripremiti slijepu probu za svaki uzorak, gdje se umjesto 10 % $AlCl_3$ dodaje ista količina vode te slijepu probu za sve uzorke, gdje se umjesto uzorka dodaje 500 μ L destilirane vode.

Udjel flavona i flavonola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0076x - 0,0344 \quad (13)$$

gdje su:

x – udjel kvercetina (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 435 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kvercetina, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel flavona i flavonola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela flavona i flavonola provedeno je u tri paralelene probe (n=3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg kvercetina po g uzorka.

3.2.4.6. Određivanje udjela flavan-3-ola

Princip metode

Metoda se temelji na reakciji vanilina (*p*-hidroksibenzaldehida) s alkoholnim skupinama na položajima C-6 i C-8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet crvenog obojenja, koji se određuje spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm, izravno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (Price i sur., 1978).

Postupak rada

Pripremi se 4 %-tna otopina vanilina u metanolu. U tamnu epruvetu doda se 0,5 mL uzorka i 3 mL prethodno pripremljene otopine vanilina. Epruvete se stave u hladnu vodenu kupelj i nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline te se reakcijska smjesa u epruveti izmiješa. Nakon 15 min očita se apsorbancija na 500 nm (Di Stefano i sur., 1989). Slijepa proba priprema se na isti način, posebno za svaki uzorak, ali se umjesto 4 %-tne otopine vanilina dodaje čisti metanol.

Udjel (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema jednadžbi:

$$\boxed{(mg (+)\text{-katehina}/L = 290,8 \times \Delta A \times \text{razrijeđenje})} \quad (14)$$

gdje je:

ΔA – razlika apsorbancije između uzorka i slijepe probe

3.2.4.7. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode

Određivanje hidrokscimetnih kiselina bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidrokscimetnih kiselina izravno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Postupak rada

Za određivanje udjela hidrokscimetnih kiselina, 500 µL uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnov-og reagensa, 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah zatim očita na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidrokscimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0025x + 0,0054 \quad (15)$$

gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kafeinske kiseline određuje se udjel hidrokscimetnih kiselina u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela hidrokscimetnih kiselina provedeno je u tri paralelene probe (n=3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg kafeinske kiseline po g uzorka.

3.2.4.8. Određivanje udjela proantocijanidina

Princip metode

Ova metoda razvijena je modifikacijom metode po Bate-Smithu (1973), a temelji se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula proantocijanidina s klorovodičnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Reakcija je popraćena nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Porter i sur., 1986).

Postupak rada

Pripreme se otopine *n*-butanol/HCl (95:5) i 2 % NH₄Fe(SO₄)₂ × 12 H₂O u 2 M HCl. 100 μL uzorka razrijeđenog 1:10 u 70 %-tnom acetonu otpipetira se u staklenu vialu, nakon čega se doda 2 mL otopine butanol/HCl i 100 μL 2 % NH₄Fe(SO₄)₂ × 12 H₂O u 2 M HCl-u. Suspenzija se dobro izmiješa te zagrijava 45 minuta na 95 °C. Nakon zagrijavanja, smjesa se ohladi i očita se apsorbancija na 550 nm. Slijepa proba priprema se po istom postupku, ali umjesto uzorka sadrži 70 %-tni aceton.

Udjel proantocijanidina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,00037x + 0,00292 \quad (16)$$

gdje su:

x – udjel (+)-katehina (mg/L),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 550 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kafeinske kiseline određuje se udjel hidroksicimetnih kiselina u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina provedeno je u tri paralelene probe (n=3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg kafeinske kiseline po g uzorka.

3.2.4.9. Određivanje ukupnih antocijana

Postupak rada

Izvaže se 0,2 g usitnjenog biljnog materijala, doda 2 mL 96 %-tnog zakiseljenog EtOH i 40 mL 2 %-tne HCl. Smjesa se dobro promiješa i centrifugira (4500 rpm, 10 min). Nakon centrifugiranja, 10 mL supernatanta otpipetira se u dvije epruvete. U prvu se dodaje 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 %-tnog natrij hidrogensulfita. Epruvete stoje 15 min na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija na 520 nm (slijepa proba: 2 %-tna HCl).

Udjel antocijana (Ac) u ispitivanom uzorku izračuna se prema formuli:

$$Ac \text{ (mg/L)} = 615 \times (A1-A2) \quad (17)$$

gdje su:

615 – faktor preračunavanja

A1 – apsorbancija uzorka tretiranog vodom

A2 – apsorbancija uzorka tretiranog natrijevim hidrogensulfitom (Ough i Amerine, 1988).

3.2.4.10. Određivanje ukupnih karotenoida

Postupak rada

100 mg usitnjenog biljnog materijala snažno se miješa sa mješavinom acetona i heksana (4:6, 10 mL) 1 minutu i zatim profiltrira kroz filter papir Whatman br. 4. Izmjeri se apsorbancija filtrata na $\lambda=453, 505$ i 663 nm.

Izračun udjela β -karotena u ispitivanom uzorku prema formuli:

$$\beta\text{-karoten (mg/100 mL)} = 0,216 \cdot A_{663} - 0,304 \cdot A_{505} + 0,452 \cdot A_{453} \quad (18)$$

Rezultati se izražavaju kao μg karotenoida po g ekstrakta (Barros i sur., 2008).

3.2.4.11. Određivanje ukupnog klorofila

Postupak rada

Oko 100 – 200 mg usitnjenog uzorka (do praškastog stanja) ekstrahira se sa 50 mL 80 %-tnog acetona, snažno se miješa 2 minute i zatim profiltrira kroz filter papir. Izmjeri se apsorbancija filtrata termostatanog na 30 °C na valnim duljinama od $\lambda=663$ nm (za klorofil a) i $\lambda= 645$ nm (klorofil b) (Huang i sur., 2007).

Udjeli klorofila a i b izračunaju se prema sljedećim jednadžbama:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil a (mg/L)} &= 12,7 \times A_{663} - 2,95 \times A_{645} \\ \text{Klorofil b (mg/L)} &= 12,7 \times A_{663} - 2,95 \times A_{645} \end{aligned} \quad (19)$$

Rezultati se izražavaju kao ukupni klorofil:

$$\begin{aligned} \text{Ukupni klorofil (mg/L)} &= \text{klorofil a} + \text{klorofil b} \\ \text{Ukupni klorofil (mg/g)} &= \frac{\text{ukupni klorofil (mg/L)} \times 50 \text{ mL}}{\text{masa uzorka} \times 1000} \end{aligned} \quad (20)$$

3.2.4.12. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata

Atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) određeni su makroelementi i mikroelementi u ispitivanim sekundarnim biljnim sirovinama. U uzorcima je određen udjel sljedećih elemenata: Na, Mg, K, Ca, Fe, P, V, Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Hg, Tl i Pb. Uzorci biljnog materijala usitnjen su u tarioniku i izvagani (0,2500 g). Nakon vaganja uzorci su mikrovalno razoreni uz dodatak 5 mL HNO_3 (50 % v/v) (Tablica 2).

Uzorci su ostavljeni u teflonskoj posudi da se ohlade, a zatim razrijeđeni s ultračistom vodom na konačni volumen od 25 mL. Razaranje i mjerenje svake biljne vrste ponovljeno je najmanje tri puta (Tablica 3). Prije mjerenja uzorci su profiltrirani (crna vrpca) (Kara, 2009; Lamble i Hill, 1998; Boumans, 1987).

Tablica 2. Uvjeti mikrovalnog razaranja

	1	2	3
T [°C]	150	160	190
P [W]	80	80	80
t [min]	10	10	20

Tablica 3. Uvjeti mjerenja na ICP-AES instrumentu

Instrument	Prodigy High Dispersive ICP
Spektrometar	Ešelatnog tipa
RF-Generator	free-running 40 MHz
Protok plina (Argon)	vanjski: 18 L/min pomoćni: 0,8 L/min za raspršivanje: 36 psi
Plamenik	Fasselov tip, DUAL-VIEW
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

3.2.5. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA

Za izradu filmova korištene su dvije vrste polimernih hidrokolooidnih materijala: pektin (P) i alginat (A), uz dodatak glicerola kao plastifikatora, te vodeni ekstrakt kore banane kao izvor bioaktivnih sastojaka za obogaćivanje filmova. Vodeni ekstrakt kore banane pripremljen je konvencionlanom ekstrakcijom (80 °C, 30 min). Proizvedeni su zasebni filmovi pojedinačnih nosača te filmovi kod kojih su nosači kombinirani u smjesi ili slojevima, kao što je prikazano u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz vrsta izrađenih filmova s pripadajućim oznakama

Vrste Filmova	Oznake
kontrolni filmovi (u destiliranoj vodi)	
2 % pektin	2PV
4 % pektin	PV
4 % alginat	AV
2 % alginat + 4 % pektin	PAV
čisti (zasebni) filmovi obogaćeni ekstraktom kore banane	
4 % pektin	PE
4 % alginat	AE
mješavine obogaćene ekstraktom kore banane	
4 % alginat + 2 % pektin [1:1]	APE
APE + PAV [1:1]	MIX
dvoslojni film obogaćen ekstraktom kore banane	
2 % pektin na 4 % alginat	SLOJ

Za proizvodnju filmova u staklene čaše odvaže se određena količina hidrokoloidnih praškastih materijala kako bi se pripremile: 4 % (w/v) otopina pektina i 2 % (w/v) otopina pektina te 4 % (w/v) otopina alginata. Za pripremu filmova, odvagana količina biopolimera prelivena je prethodno pripremljenim vodenim ekstraktom kore banane, dok su za pripremu kontrolnih filmova, s navedenim materijalima, suspenzije istih koncentracija pripremljene u destiliranoj vodi. Nakon miješanja pripremljenih otopina na magnetskoj miješalici tijekom 12 h, svim otopinama dodano je 1 % (w/v) glicerola (plastifikatora), provedena je homogenizacija na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi i kratkotrajno odzračivanje otopina (15 s) u ultrazvučnoj kupelji kako bi se uklonili eventualno nastali mjehurići zraka.

U slučaju mješavina dvaju polimera pripremljene su mješavine omjera dvaju nosača 50:50, w/w, jednostavnim miješanjem dviju otopina, dok se u slučaju proizvodnje filmova u slojevima također zadržao jednak omjer materijala (50:50, w/w), odnosno, prvo je nanesen sloj jednog polimera nakon čega je nanesen sloj drugog polimera iste mase.

Iz ovako pripremljenih otopina formirani su filmovi lijevanjem u Petrijeve zdjelice (unutarnji promjer = 11,7 cm). U svaku Petrijevu zdjelicu izljevano je 20 mL uzorka pomoću staklene

pipete na analitičkoj vagi te je konačna masa svih Petrijevih zdjelica ujednačena kako bi se osigurala homogenost i jednoličnost filmova. U slučaju formiranja filmova u slojevima izljevano je najprije 10 mL jednog polimera nakon čega je lijevano 10 mL drugog polimera. Nakon izlivanja otopina, Petrijeve zdjelice se postavljaju na ravnu površinu i filmovi se suše na temperaturi od 30 °C tijekom 72 sata. Nakon sušenja, filmovi se uklanjaju iz Petrijevih zdjelica pomoću špatule i čuvaju u eksikatorima s osiguranim kontroliranim uvjetima vlage do analize.

3.2.6. Karakterizacija filmova

3.2.6.1. Određivanje debljine filmova

Debljina filmova određena je pomoću digitalnog mikrometra (Helios-Preisser Digital Micrometer, Type 40 EX, Njemačka). Za svaki film debljina je određena na nekoliko različitih mjesta (min. 6) uključujući sredinu filma, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost s pripadajućom devijacijom (μm).

3.2.6.2. Određivanje udjela suhe tvari

Udjel vode i suhe tvari filmova određen je gravimetrijskom metodom (određivanjem mase prije i nakon sušenja uzorka na 105 °C do konstantne mase) prema AOAC 930.15 metodi (1990a) opisanoj u poglavlju 3.2.3.1.

3.2.6.3. Određivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva filmova određena su analizatorom teksture korištenjem jednoosnog vlačnog ispitivanja. Učvršćivanje uzoraka izvedeno je korištenjem hvataljki u obliku potkove. Čvrsto i stabilno učvršćivanje uzoraka postignuto je korištenjem čeličnih čeljusti širine 30 mm i hrapave površine. Parametri ispitivanja namješteni su na razvlačenje (rastezanje), pri čemu je brzina prije testa bila namještena na $1,00 \text{ mms}^{-1}$, a tijekom testa na $0,05 \text{ mms}^{-1}$. Test se provodio do točke pucanja. Za određivanje mehaničkih svojstava jestivi filmovi su izrezani na trakice veličine $1 \times 4 \text{ cm}$. Prije samog ispitivanja svi uzorci bili su temperirani na sobnu temperaturu pri kojoj su se analize i provodile ($21 \pm 0,5 \text{ °C}$). Na temelju dimenzija uzoraka, početna deformacijska visina mjerila se kao udaljenost između dvije čeljusti, a površina opterećenja izračunala kao deformacijska visina \times širina uzorka. Cauchyjevo naprezanje opisano jednadžbom (21) izabrano je kao prikladno za proračun s obzirom na to da funkcionira pri malim produženjima i elastičnim deformacijama, koje su prisutne u uzorku.

$$\varepsilon = \frac{\delta L}{L_0} \quad (21)$$

gdje su:

δL – promjena u dužini uzorka nastala zbog djelovanja vlačne sile

L_0 – deformacijska visina

Završno naprezanje računa se kao produženje uzorka do točke pucanja. Opterećenje je dobiveno kao omjer primijenjene sile (F) i stvarne poprečne površine uzorka. Za računanje opterećenja korištena je površina opterećenja u opuštenom stanju, a ne stvarna površina opterećenja, s obzirom na to da je sužavanje materijala (pojava lokaliziranog smanjenja presjeka materijala tijekom plastične deformacije) bilo minimalno.

3.2.6.4. Određivanje boje

Za određivanje boje razvijene su instrumentalne metode kojima se ona može numerički izraziti (Konica-Minolta, 1998). Za prehrambene se proizvode najčešće koristi CIELAB metoda ustanovljena od strane Commission Internationale de L'Eclairage (Lancaster i sur., 1997).

Postupak rada

Boja jestivih filmova određivala se kolorimetrom pri čemu su se mjerile L^* , a^* i b^* vrijednosti, a kontrola mjerenja obavljala se preko softvera Spectra Magic NX. Sva mjerenja bila su u SCI (Specular Component Included) modu. Za svaki pojedinačni film mjerenje je provedeno na nekoliko različitih mjesta.

Parametar L^* predstavlja mjeru svjetlosti čija se vrijednost kreće od 0 (crno) do 100 (bijelo). Parametar a^* , ovisno o predznaku, iskazuje spektar od crvene (+ a^*) do zelene boje (- a^*), dok parametar b^* iskazuje spektar od žute (+ b^*) do plave boje (- b^*).

Pomoću vrijednosti L^* , a^* i b^* moguće je izračunati ΔE , odnosno ukupnu promjenu boje (kolorimetrijsku razliku) (Konica-Minolta, 1998). ΔE izračuna se po sljedećoj formuli:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2} \quad (22)$$

gdje su:

L^* , a^* , b^* – parametri boje ispitivanog uzorka

$L^*_{\text{ref}}, a^*_{\text{ref}}, b^*_{\text{ref}}$ – parametri boje referentnog uzorka

Kolorimetrijska razlika opisuje odstupanje od originala. Odstupanje boja može se provesti na osnovu vrijednosti kolorimetrijske razlike prema sljedećim kriterijima: $\Delta E < 0.2$ - razlika boje se ne vidi; $\Delta E = (0,2 - 1)$ - razlika boje se primjećuje; $\Delta E = (1 - 3)$ - razlika boje se vidi; $\Delta E = (3 - 6)$ - razlika boje se dobro vidi; $\Delta E > 6$ - očigledna odstupanja boje.

Iz izmjerenih parametara L^* , a^* i b^* , pomoću formula (22 i 23), izračunaju se parametri C i H° . Parametar C predstavlja zasićenje ili intenzitet boje, pri čemu je zasićenost boje slabija što su niže vrijednosti. Parametar H° predstavlja vizualni doživljaj boje ($0 - 90^\circ$ je crveno-narančasta boja; $90 - 180^\circ$ je žuto-zelena boja; $180 - 270^\circ$ je plavo-zelena boja; $270 - 360^\circ$ je plavo-ljubičasta boja).

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (23)$$

$$H^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (24)$$

3.2.6.5. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova

Za određivanje bioaktivnog sastava filmova pripremljene su otopine svih uzoraka filmova u vodi, otapanjem 0,1 – 0,2 g filmova u 5 mL destilirane vode miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom 24 h. Dobivene otopine svih filmova su nakon otapanja centrifugirane (5000 rpm, 5 min) te je za analize korišten samo bistri supernatant.

3.2.6.6. Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova

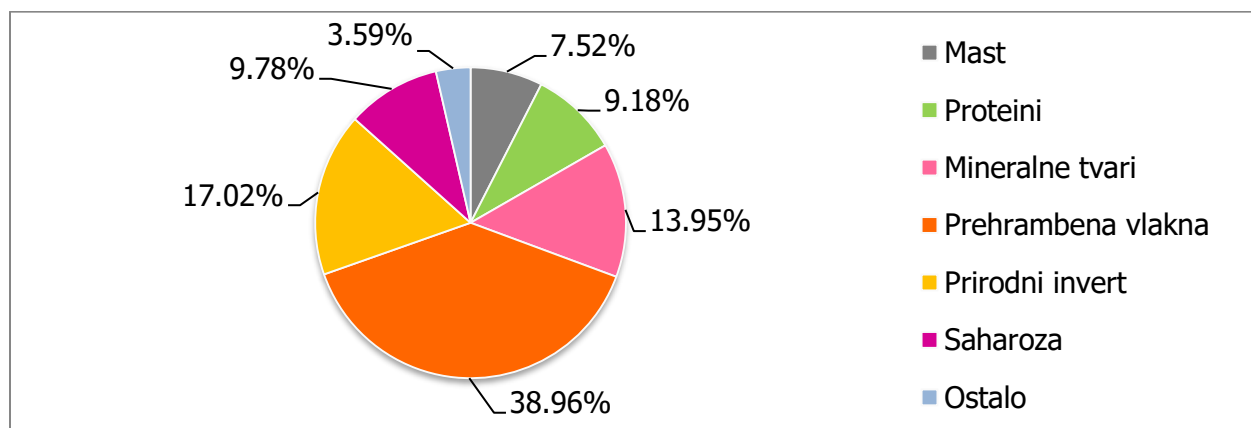
Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova praćeno je izuzimanjem alikvota uzoraka iz odgovarajućeg medija u određenim vremenskim razmacima ($0 - 24\text{h}$). Kao medij za otpuštanje korištena je otopina simulacijskih uvjeta gastrointestinalnog trakta pri niskom pH ($\text{pH}=2,0$). Kao parametri kojima se određivala kinetika otpuštanja su udjel ukupnih polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom (poglavlje 3.2.4.1.) te antioksidacijski kapacitet ABTS metodom (poglavlje 3.2.4.3.). Za određivanje kinetike otpuštanja, približno 0,5 g usitnjenih filmova suspendira se u 30 mL medija. Čestice su konstatno miješane na magnetskoj miješalici (namještenoj na 100 rpm) te se u određenim vremenskim razmacima iz otopine izuzima po 2 mL tekućine. Uzorci se dalje uzimaju u određenim vremenskim razmacima do posljednjeg uzorkovanja u 3. satu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

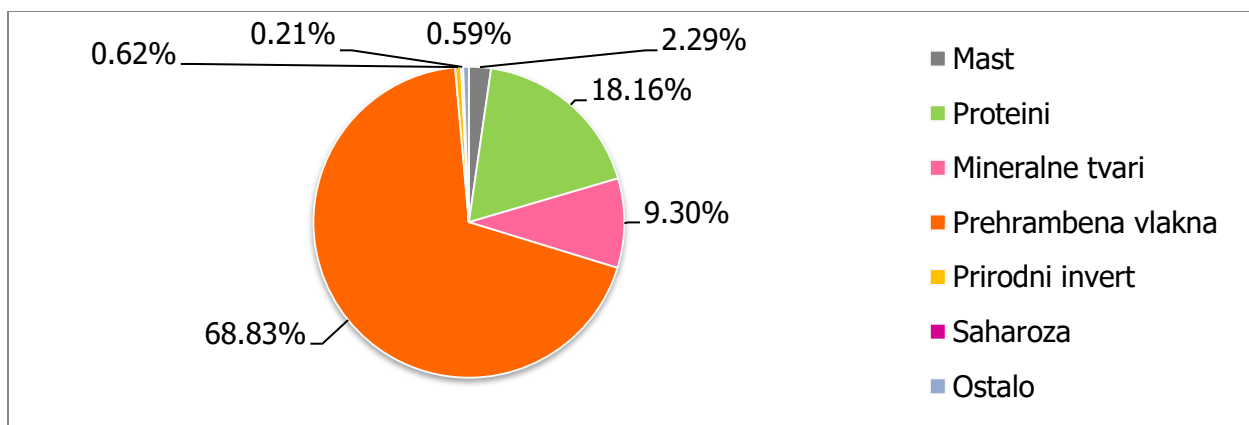
U ovom radu korišteno je šest sekundarnih biljnih sirovina (kora banane, ljuska kakaovog zrna, mahuna graška, ljuska crvenog luka, kora cikle i ljuska oraha) kojima je određen sastav osnovnih nutrijenata te udjel mikro- i makroelemenata i pigmentata. Etanolnom ekstraktu svih odabranih biljnih sirovina i vodenom ekstraktu kore banane analiziran je bioaktivni sastav određivanjem polifenola i antioksidacijskog kapaciteta. Vodeni ekstrakt kore banane odabran je kao izvor bioaktivnih sastojaka kojima su se obogatili jestivi filmovi na bazi alginata i pektina. U svrhu poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava jestivih filmova, uz čiste zasebne filmove svakog pojedinog biopolimera, pripremljene su i kombinacije biopolimera izlivanjem mješavine ili sloja. Pripremljenim filmovima određena su fizikalno-kemijska, mehanička i bioaktivna svojstva te su uspoređeni rezultati kontrolnih filmova i onih obogaćenih ekstraktom kore banane.

4.1. Osnovni sastav sekundarnih biljnih sirovina

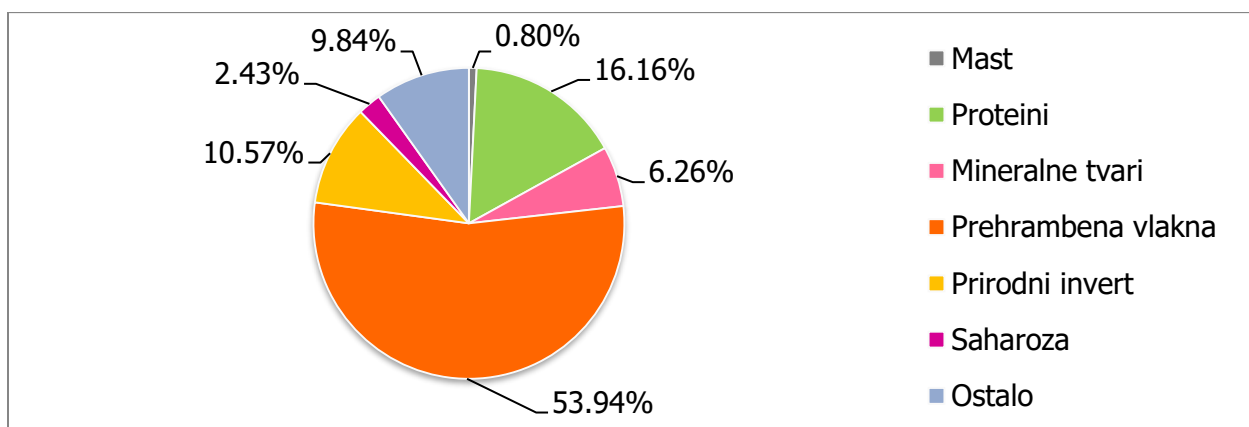
Sastav osnovnih nutrijenata sekundarnih biljnih sirovina (udjel masti, proteina, mineralnih tvari, prehrambenih vlakana, prirodnog inverta, saharoze) izraženi su kao postotak suhe tvari te su redom prikazani za: koru banane (Slika 5), ljusku kakaovog zrna (Slika 6), mahunu graška (Slika 7), ljusku crvenog luka (Slika 8), koru cikle (Slika 9) i ljusku oraha (Slika 10). Dobiveni rezultati za osnovni sastav, makro- i mikroelemente te pigmente kore cikle nisu uspoređeni s literaturnim podacima zbog nedostatka istih.



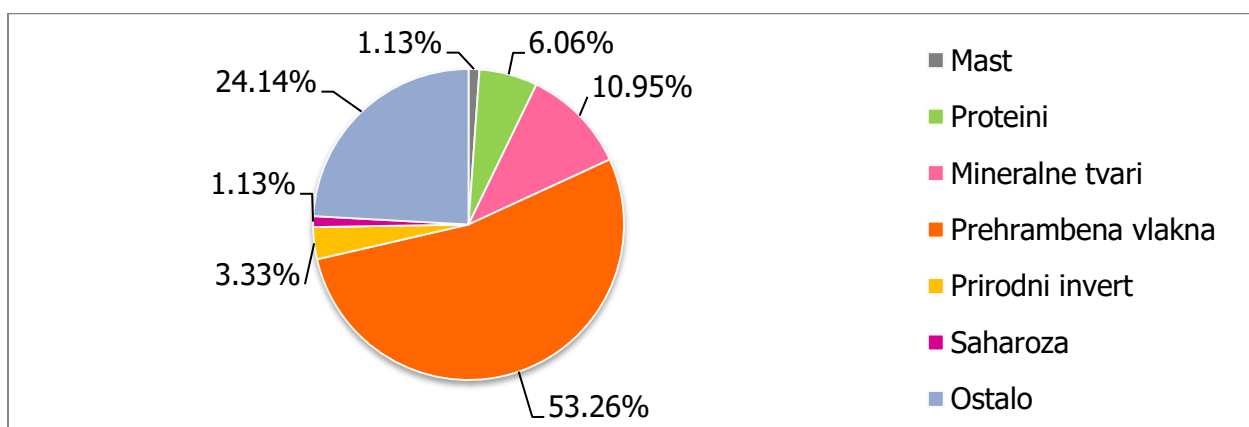
Slika 5. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata kore banana (KB)



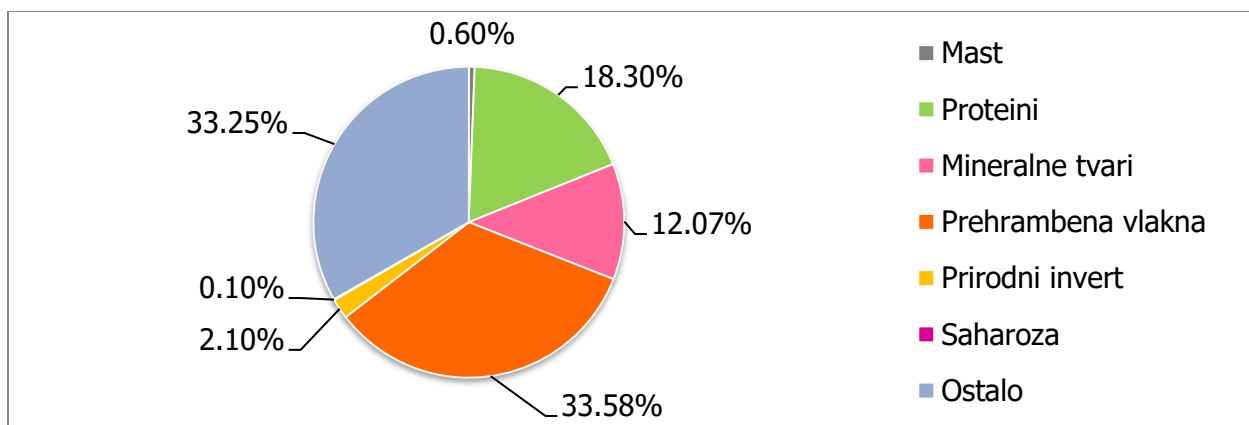
Slika 6. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata ljuške kakaovog zrna (LJKZ)



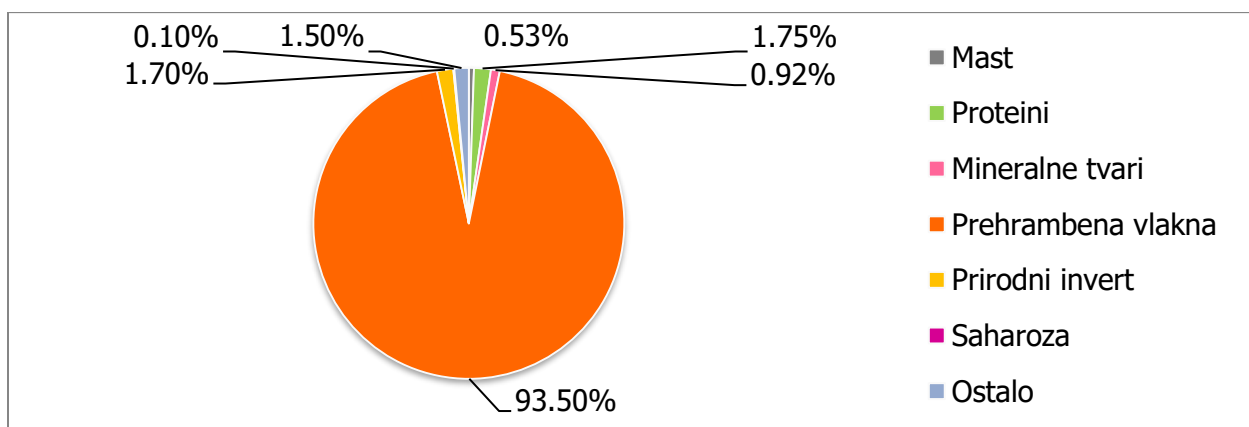
Slika 7. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata mahune graška (MG)



Slika 8. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata ljuške crvenog luka (LJCL)



Slika 9. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata kore cikle (KC)



Slika 10. Sastav (% suhe tvari) osnovnih nutrijenata ljuske oraha (LJO)

Iz dobivenih rezultata o osnovnom sastavu nutrijenata vidljivo je da sekundarne biljne sirovine općenito sadrže niske udjele **masti**. Najmanji udjel masti određen je u LJO (0,53 %), a slijede KC (0,60 %), MG (0,80 %), LJCL (1,13 %), LJKZ (2,29 %) te KB sa značajno većim udjelom masti od svih navedenih sirovina (7,52 %). Udjeli masti određeni u ovom radu sukladni su dostupnim literaturnim podacima (izraženima kao postotak na suhu tvar) koji iznose 0,61 % za LJO (Vojvodić i sur., 2016), 1,06 % za MG (Belghith-Fendri i sur., 2016), 0,91 % za LJCL (Vojvodić i sur., 2016), 2,02 – 2,05 % za LJKZ (Martínez i sur., 2012). U literaturi postoje različiti podaci o udjelu masti u KB - 10,44 % (Aboul-Enein i sur. 2016) te 4,32 % (Agama-Acevedo i sur., 2015), što se razlikuje od rezultata u ovome radu i može se pripisati različitim korištenim varijetetima kore banana, kao i različitom stupnju zrelosti te uvjetima rasta.

Najveći udjel **proteina** određen je u LJKZ (18,16 %), potom u KC (18,30 %), MG (16,16 %),

KB (9,18 %), LJCL (6,06 %), a najmanji u LJO (1,75 %). Vidljiva je sukladnost dobivenih rezultata s prethodnim istraživanjima koji pokazuju vrijednosti izražene na isti način, primjerice od 15,79 do 15,85 % za LJKZ (Martínez i sur., 2012), 13,37 % za MG (Belghith-Fendri i sur., 2016), 8,85 % za KB (Agama-Acevedo i sur., 2015), 6,92 % za LJCL i 1,29 % za LJO (Vojvodić i sur., 2016).

Najveći udjel **mineralnih tvari** određen je u KB (13,95 %), zatim u KC (12,07 %), LJCL (10,95 %), LJKZ (9,30 %) te MG (6,26 %), dok je u LJO određen znatno manji udjel mineralnih tvari u odonosu na druge sirovine (0,92 %). Rezultati dobiveni u ovom radu sukladni su referentnim literaturnim podacima udjela mineralnog ostatka u sekundarnim biljnim sirovinama koji pokazuju vrijednosti (izražene kao postotak na suhu tvar) od 1,02 % za LJO (Vojvodić i sur., 2016), 6,6 % za MG (Mateos-Aparicio i sur., 2010), 6,76 – 7,35 % za LJKZ (Martínez i sur., 2012), 9,35 % za LJCL (Vojvodić i sur., 2016) te 13,42 % za KB (Aboul-Enein i sur., 2016).

Najmanji udjel **prehrambenih vlakana** određen je u KC (33,25 %) i KB (38,96 %). U ostalim sirovinama udjel je >50 %, odnosno 53,26 % u LJCL, 53,94 % u MG, 68,83 % u LJKZ te daleko najveći udjel prehrambenih vlakana od svih sirovina određen je u LJO (93,50 %). Literaturne i određene vrijednosti za udjel prehrambenih vlakana nisu izravno usporedive zbog nedosljednosti u pripremi uzoraka i analitičkih protokola. Literaturni podaci (izraženi kao postotak na suhu tvar) iznose 43,77 % za KB (Agama-Acevedo i sur., 2015), 43,87 % i 58,6 % za MG (Belghith-Fendri i sur., 2016; Mateos-Aparicio i sur., 2010), 51,88 – 56,70 % za LJKZ (Martínez i sur., 2012), a za LJCL 654 mg/g (Benítez i sur., 2017). Za LJO nisu pronađeni referentni podaci o ukupnom udjelu prehrambenih vlakana, ali udjel netopivih prehrambenih vlakana (hemiceluloze, lignina i celuloze) u radu Kara (2011) iznosi 97 % udjela suhe tvari, što je daleko više od udjela ukupnih prehrambenih vlakana u ostalim sirovinama.

Prema dobivenim rezultatima, analizirane sekundarne biljne sirovine sadrže relativno mali udjel **prirodnog inverta** i **saharoze**, uz iznimku KB. Najveći udjel prirodnog inverta sadrži KB (17,02 %), potom MG (10,57 %), LJCL (3,33 %), KC (2,10 %), LJO (1,70 %) te LJKZ (0,62 %). U KB određen je daleko veći udjel saharoze (9,78 %) u odnosu na ostale sirovine, zatim u MG (2,43 %), LJCL (1,13 %), LJKZ (0,21 %) te u LJO i KC u kojima je određen jednak udjel (0,10 %). Prema dostupnim literaturnim podacima, udjel saharoze u MG iznosi 7,9 g/100 g s. tv. (Mateos-Aparicio i sur., 2010), 40,22 mg/g s. tv. u KB (Pereira i sur., 2017), 38 – 51 m/g s. tv. u LJCL (Benítez i sur., 2011), 1 % s. tv. LJKZ te <1 % s. tv. LJO (Vojvodić i sur., 2016).

Udjeli makroelemenata u ispitivanim sekundarnim biljnim sirovinama prikazani su u Tablici 5, a udjeli mikroelemenata u Tablici 6.

Tablica 5. Udjeli makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u sekundarnim biljnim sirovinama

$\mu\text{g/g}$	KB	LJKZ	MG	LJCL	KC	LJO
Na	38 \pm 0	33 \pm 1	116 \pm 6	415 \pm 16	4380 \pm 189	11 \pm 1
Mg	150 \pm 14	5671 \pm 168	3330 \pm 127	2149 \pm 61	6570 \pm 356	240 \pm 4
K	75061 \pm 563	33636 \pm 878	14827 \pm 432	6944 \pm 238	41854 \pm 1366	2780 \pm 49
Ca	2698 \pm 3	2800 \pm 89	10787 \pm 207	22828 \pm 606	2851 \pm 153	1876 \pm 22
Fe	33 \pm 4	306 \pm 5	114 \pm 9	1465 \pm 59	159 \pm 10	56 \pm 7
P	2900 \pm 31	6014 \pm 226	3128 \pm 84	1323 \pm 96	7811 \pm 393	305 \pm 5

Tablica 6. Udjeli mikroelemenata ($\mu\text{g/g}$ ili $\mu\text{g/kg}$) u sekundarnim biljnim sirovinama

$\mu\text{g/g}$	KB	LJKZ	MG	LJCL	KC	LJO
Cu	2900 \pm 31	6014 \pm 226	3128 \pm 84	1323 \pm 96	7811 \pm 393	305 \pm 5
Zn	49 \pm 2	38 \pm 2	18 \pm 2	13 \pm 1	14 \pm 0	1 \pm 0
Mo	135 \pm 3	300 \pm 4	103 \pm 34	2149 \pm 61	580 \pm 11	261 \pm 36
Hg	49 \pm 2	200 \pm 15	13 \pm 2	1326 \pm 96	36 \pm 1	23 \pm 1
Tl	5 \pm 0	16 \pm 0	10 \pm 0	13 \pm 1	94 \pm 3	2 \pm 0
$\mu\text{g/kg}$						
V	38 \pm 0	33 \pm 1	116 \pm 6	415 \pm 16	4380 \pm 189	11 \pm 1
Mn	1501 \pm 14	567 \pm 168	3330 \pm 127	2149 \pm 61	6570 \pm 356	240 \pm 4
Cr	75061 \pm 563	33636 \pm 878	14827 \pm 432	6944 \pm 238	41854 \pm 1366	2780 \pm 49
Co	2698 \pm 3	2800 \pm 89	10787 \pm 207	22828 \pm 606	2851 \pm 153	1876 \pm 22
Ni	33 \pm 4	306 \pm 5	114 \pm 9	1465 \pm 59	159 \pm 10	56 \pm 7
As	91 \pm 6	227 \pm 4	34 \pm 3	748 \pm 20	8 \pm 0	9 \pm 0
Se	13 \pm 0	91 \pm 3	10 \pm 1	415 \pm 16	26 \pm 1	2 \pm 0
Cd	11 \pm 7	142 \pm 1	33 \pm 3	6944 \pm 238	421 \pm 8	1 \pm 0
Sn	23 \pm 1	20 \pm 1	169 \pm 54	22828 \pm 606	17 \pm 1	13 \pm 1
Sb	8 \pm 1	8 \pm 1	21 \pm 2	1465 \pm 59	9 \pm 1	3 \pm 0
Pb	49 \pm 8	150 \pm 4	633 \pm 156	748 \pm 20	152 \pm 4	42 \pm 1

Općenito najzastupljeniji **makroelement** u odabranim sekundarnim biljnim sirovinama je K kojeg je najviše određeno u KB (75061 µg/g). No, u LJCL najzastupljeniji makroelement je Ca (22828 µg/g). Na, Mg i P je daleko više u KC (4380 µg/g, 6570 µg/g i 7811 µg/g) nego u ostalim sirovinama, dok je Ca i Fe najviše u LJCL (22828 µg/g i 1465 µg/g). U KB, MG i KC najmanje je Fe (33 µg/g, 114 µg/g i 159 µg/g), a u LJKZ, LJCL i LJO Na (33 µg/g, 415 µg/g i 11 µg/g). Općenito ukupan udjel određivanih makroelemenata najveći je u KB (80880 µg/g), a u LJO je daleko najmanji (5268 µg/g). Udjeil K i Ca u KB u rezultatima Aboul-Eneina i suradnika (2016) (9,39 i 0,44 g/100 g s. tv.) nešto je veći od udjela određenog u ovom radu no, Feumba i suradnici (2016) odredili su znatno manji udjel Ca (19,86 mg/100 g). Udjeli Na, Mg i Fe određenih u ovom radu znatno su manji od udjela koje su odredili Aboul-Enein i suradnici (2016) (0,18 i 0,71 g/100 g s. tv te 96,50 mg/kg), a veći udjel Fe odredili su i Feumba i suradnici (2016) (15,15 mg/100 g). No, određeni udjel P znatno je veći od udjela u rezultatima Aboul-Eneina i suradnika (2016) (0,09 g/100 g s. tv.). Udjel K (0,409 g/100 g s. tv.) nešto je manji, dok su udjeli Na, Ca i Mg (1,739, 3,043 i 0,507 g/100 g s. tv.) nešto veći u rezultatima Belghith-Fendria i suradnika (2016) u MG, u odnosu na ovo istraživanje, no, odstupanja nisu velika kao u slučaju mikroelemenata. Dobiveni rezultati makroelemenata u MG slični su rezultatima Mateos-Aparicioa i suradnika (2010). Udjeli makroelemenata određeni u ovom istraživanju u LJCL i LJO razlikuju se od udjela u istraživanju Beníteza i suradnika (2011), u čijim je rezultatima vidljivo da udjeli makroelemenata uvelike ovise o varijetetu luka, te Queirós a i suradnika (2019). Tako su Beníteza i suradnici (2011) u vanjskoj smeđoj ljusci luka odredili udjel 4,2 – 7,3 mg/g s. tv. K, 22,1 – 30,7 mg/g s. tv. Ca i 1,1 – 1,5 mg/g s. tv. Mg. Queirós i suradnici (2019) u LJO odredili su znatno veći udjel Ca (9080,8 mg/kg s. tv.), koji je i najzastupljeniji makroelement u LJO u tom istraživanju, Fe (3094,8 mg/kg s. tv.), Na (554,5 mg/kg s. tv.), Mg (1283,0 mg/kg s. tv.), K (5202,4 mg/kg s. tv.) i P (691,4 mg/kg s. tv.). Općenito najzastupljeniji **mikroelement** je Cu, a najviše ga je određeno u KC (7811 µg/g). No, u LJCL najviše je zastupljen Mo (2149 µg/g). U KB i LJKZ najmanje je Sb (8 µg/kg), dok je u MG, LJCL i LJO najmanje Se (10 µg/kg, 415 µg/kg i 2 µg/kg), a u KC As (8 µg/kg). V, Mn, Cu i Tl određeno je najviše u KC, a u KB Cr i Zn. Co, Ni, As, Se, Cd, Sn, Sb, Pb, Mo i Hg određeni su u LJCL u puno većim udjelima u odnosu na ostale sirovine, stoga se može zaključiti da je od svih odabranih sekundarnih biljnih sirovina LJCL najbogatija mikroelementima. V, Mn, Cr, Co, Se, Cd, Sn, Sb, Pb, Cu, Zn i, već spomenuti Tl, najmanje su zastupljeni u LJO, iz čega je vidljivo da su u istoj mikroelementi općenito najmanje zastupljeni. Udjeli Cu i Zn određeni u ovom radu

u KB veći su od udjela u rezultatima Aboul-Eneina i suradnika (2016) (3,73 mg/kg i 27,95 mg/kg), a udjel Zn veći je i od udjela koji su odredili Feumba i suradnici (2016) (1,72 mg/100 g). No, određeni udjel Mn znatno je manji od udjela koji su odredili Aboul-Eneina i suradnici (2016) (35,01 mg/kg) te Feumba i suradnici (2016) (9,05 mg/100 g). Udjeli Mn, Cu i Zn (mg/100 g s. tv.) koje su odredili Belghith-Fendri i suradnici (2016) te Mateos-Aparicio i suradnici (2010) u MG (0,923, 1,086 i 0,923; 0,27, 0,06 i 0,16), znatno su manji od udjela određenih u ovom radu. Udjeli mikroelemenata određeni u ovom istraživanju u LJCL i LJO razlikuju se od udjela određenih u istraživanju Beníteza i suradnika (2011), u čijim je rezultatima vidljivo da udjeli mikroelemenata uvelike ovise o varijetetu luka, i Queirósa i suradnika (2019). Beníteza i suradnici (2011) su u vanjskoj smeđoj ljusci luka odredili ($\mu\text{g/g}$ s. tv.) 119,8 – 419,4 Fe, 14,9 – 419,4 Zn, 8,3 – 25,3 Mn i 0,9 – 1,5 Se. Udjeli mikroelemenata koje su odredili Queirós i suradnici (2019) u LJO znatno se razlikuju od udjela dobivenih u ovom istraživanju. Tako su Queirós i suradnici (2019) odredili znatno manji udjel Cu (6,2 mg/kg s. tv.), Zn (18,1 mg/kg s. tv.) i Mo (9,9 mg/kg s. tv.), a znatno veći udjel Mn (110,9 mg/kg s. tv.) i Zn (18,1 mg/kg s. tv.). Dostupni su literaturni podaci za mineralni sastav epikarpa kakaovca (Ozung i sur., 2016), no ne i za ljusku kakaovog zrna. Razlike u udjelima makro- i mikroelemenata određenim u ovom radu u odnosu na literaturne podatke posljedica su mnogih čimbenika, kao što su vrsta tla, geografski položaj, okolišni uvjeti, botanička struktura biljke, koji utječu na unos mineralnih tvari iz zemlje u biljku i dr.

4.2. Analiza bioaktivnog sastava odabranih sekundarnih biljnih sirovina

Udjeli pigmenata u ispitivanim sekundarnim biljnim sirovinama prikazani su u Tablici 7.

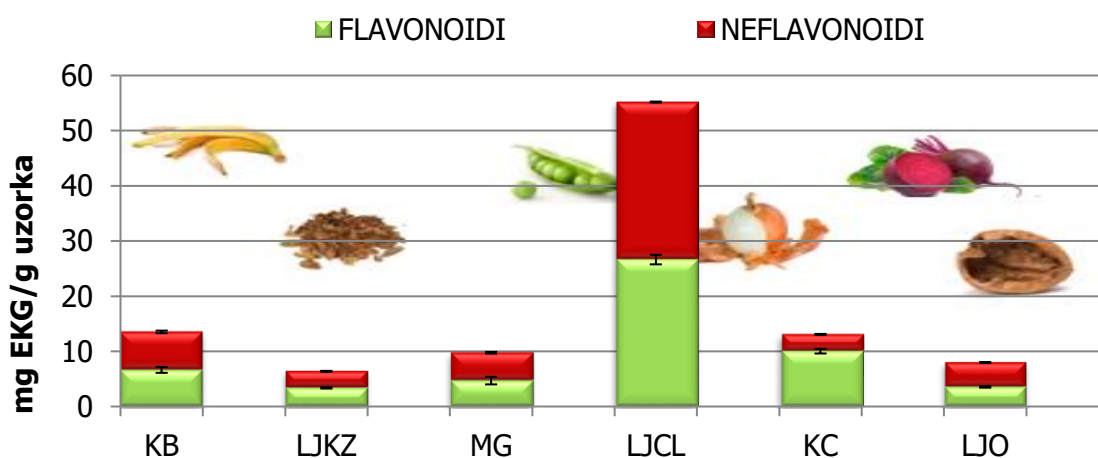
Tablica 7. Udjeli pigmenata u ispitivanim sekundarnim biljnim sirovinama

Uzorak	Klorofil a ($\mu\text{g/g}$ uzorka)	Klorofil b ($\mu\text{g/g}$ uzorka)	Karotenoidi ($\mu\text{g/g}$ uzorka)	Antocijani (mg Ac/g uzorka)
KB	13,63 \pm 0,00	25,55 \pm 0,00	61,15 \pm 0,22	0,55 \pm 1,17
LJKZ	14,05 \pm 0,00	66,16 \pm 0,00	18,73 \pm 0,26	n.d.
MG	97,59 \pm 0,69	30,34 \pm 5,35	21,50 \pm 0,04	1,58 \pm 0,00
LJCL	17,01 \pm 2,96	65,07 \pm 1,09	17,82 \pm 0,27	3,80 \pm 0,06
KC	71,32 \pm 0,00	146,99 \pm 0,00	10,01 \pm 0,00	105,59 \pm 6,17
LJO	14,05 \pm 0,00	66,16 \pm 0,00	11,10 \pm 0,07	n.d.

*n.d. – nisu detektirani

Prema dobivenim rezultatima, od svih određivanih pigmenata, općenito je najzastupljeniji klorofil, točnije klorofil b, i to u KC (146,99 $\mu\text{g/g}$), a najmanje su zastupljeni antocijani i to u KB (0,55 mg/g), u kojoj ima najviše karotenoida (61,15 $\mu\text{g/g}$). Udjeli pigmenata uvelike ovise o stupnju zrelosti, varijetetu, predtretmanu, uvjetima skladištenja i drugim čimbenicima te su u skladu s time pronađeni različiti literaturni podaci udjela pigmenata u odabranim biljnim vrstama. Fu i suradnici (2018) odredili su 29,64 $\mu\text{g/g}$ svježeg uzorka karotenoida i 23,75 μg cijanidin-3-rutinozida/g svježeg uzorka antocijana u KB. Vu i suradnici (2019) odredili su u KB 64 $\mu\text{g/g}$ suhog uzorka karotenoida čiji udjel raste i za 50 % povećanjem stupnja zrelosti, a ovisi i o varijetetu i tretmanu etilenom, dok je udjel klorofila u istom istraživanju u početnoj fazi dozrijevanja 291 $\mu\text{g/g}$ suhog uzorka te 13 $\mu\text{g/g}$ suhog uzorka u punoj zrelosti. Belghith-Fendri i suradnici (2016) u MG odredili su veći udjel klorofila a (18,067 mg 100 g s. tv.) i klorofila b (11,530 mg 100 g s. tv.) u odnosu na ovo istraživanje. Lessa i suradnici (2017) odredili su 0,2 mg β -karotena/100 g karotenoida u LJKZ. Albishi i suradnici (2013) odredili su udjel antocijana od $10,04 \pm 0,91$ mg antocijanidin-3-glukozida/100 g u vanjskoj ljusci luka. Za ostale sirovine nije pronađen literaturni podatak udjela pigmenata u istima.

4.2.1. Udjeli ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina



Slika 11. Udjel ukupnih polifenola (mg EKG/g uzorka) u etanolnom ekstraktu ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina

Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola (UP) u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina prikazani su na Slici 11 kao zbroj ukupnih flavonoida (UF) i neflavonoida (UN). U LJCL određen je najveći udjel UP u odnosu na druge sirovine (55,18±0,96 mg EKG/g uzorka). Najmanji udjel određen je u LJKZ (6,37±0,96 mg EKG/g uzorka). Poredak ostalih sirovina prema udjelu UP prikazan je padajućim nizom: KB>KC>MG>LJO. Između KB (13,52±0,3 mg EKG/g uzorka) i KC (13,07±0,5 mg EKG/g uzorka) određena je vrlo mala razlika u udjelu UP. Najveći udjel **UF** određen je u LJCL (26,63±0,87 mg EKG/g uzorka), a najmanji u LJKZ (3,38±0,12 mg EKG/g uzorka). Poredak ostalih sirovina prema udjelu UF prikazan je padajućim nizom: KC>KB>MG>LJO. Poredak sirovina prema udjelu UF u korelaciji je s poretkom sirovina prema udjelu UP, osim što je udjel UF veći u KC u odnosu na KB. Međutim, poredak sirovina prema zastupljenosti UF u UP je znatno drugačiji te je prikazan padajućim nizom: KC>LJKZ>KB>LJCL>MG>LJO. Iz rezultata je vidljivo da je udjel UF u UP u KC znatno veći u odnosu na druge sirovine te iznosi 77 %. Najveći udjel **UN** određen je u LJCL (22,85±0,09 mg EKG/g uzorka), a najmanji u LJKZ (3,00±0,09 mg EKG/g uzorka). Poredak ostalih sirovina prema udjelu UN prikazan je padajućim nizom: KB>MG>LJO>KC. Budući da je iz udjela UP i UN određen udjel UF, povezan je odnos između ove tri veličine. Stoga je poredak sirovina prema udjelu UN u UP obrnut poretku UF u UP. Tako je u LJO određen najveći udjel UN u UP u odnosu na ostale sirovine te iznosi 56 %.

Literaturni podaci udjela UP u ekstraktima odabranih sekundarnih biljnih sirovina prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Literaturni podaci ekstrakcije ukupnih polifenola (UP) za odabrane sekundarne biljne sirovine

Uzorak	Vrsta ekstrakcije	Parametri ekstrakcije	Udjel UP	Referenca
KB	ultrazvučna kupelj	voda:metanol, 5 min	29,2 mg GAE/g uzorka	Rebello i sur. (2014)
	konvencionalna ekstrakcija	voda, sobna temperatura, tijekom noći	9,89 mg GAE/g s.tv.	Aboul-Enein i sur. (2016)

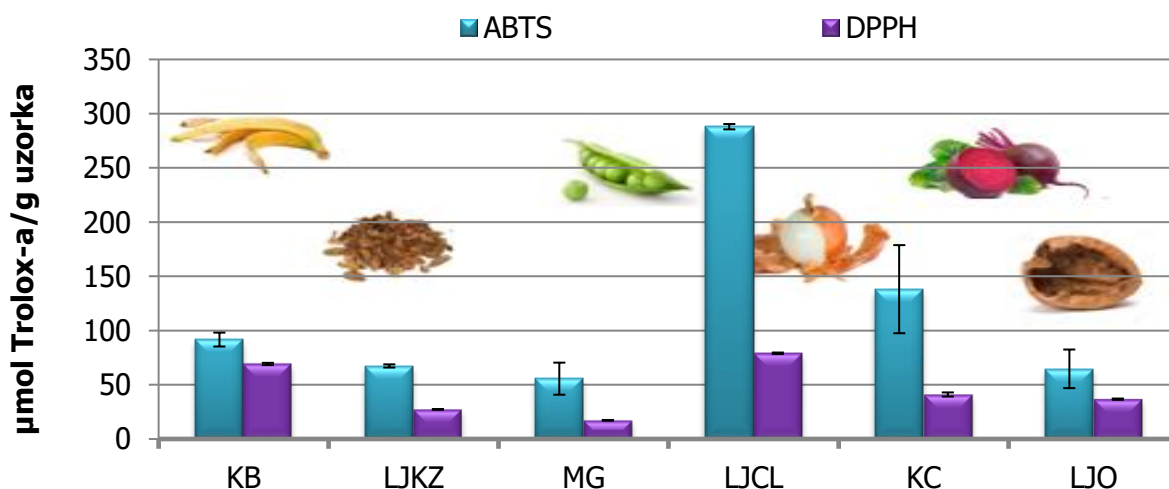
* nastavak Tablice 8

	konvencionalna ekstrakcija	voda, 60 °C, 12 h	5 mg GAE/100 g s. tv.	Hernández-Carranza i sur. (2015)
LJKZ	ekstrakcija mikrovalovima	80 %-tni etanol, >50 °C, 5 min, 500 W	23,36 mg GAE/g uzorka	Nsor-Atindana i sur. (2012)
	konvecionalna ekstrakcija	čisti etanol, sobna temperatura, 24 h	80,17 i 82,37 mg GAE/100 g	Martínez i sur. (2012)
	ekstrakcija pulzirajućim električnim poljem	voda, 50 Hz	17,88 – 55,16 mg GAE/g s. tv.	Barbosa-Pereira i sur. (2018)
LJCL	ekstrakcija superkritičnom vodom	30 bara, 30 min, 170 – 230 °C	171,83 – 264,62 (mg GAE/g s. tv.)	Munir i sur. (2018)
	konvencionalna ekstrakcija	70 %-tni etanol, 60 °C, 3 h	26,22 – 99,72 (mg GAE/g s. tv.)	
	konvencionalna ekstrakcija	75 %-tni etanol, 37 °C, 24 h	53,61 mg GAE/g ekstrakta	Elsebaie i Essa (2018)
MG	refluksiranje	80 %-tni kloroform, 60 °C	8,00 mg GAE/g s. tv. uzorka	Babbar i sur. (2014)
KC	konvencionalna ekstrakcija	80 %-tni metanol, 45 min	24,10 mg GAE/g uzorka	Kujala i sur. (2001)
	konvencionalna ekstrakcija	voda, 11 min	15,5 mg GAE/g uzorka	Kujala i sur. (2000)
	konvencionalna ekstrakcija	80 %-tni metanol, 1 min	4,30 mg GAE/g s. tv.	Kähkönen i sur. (1999)
LJO	konvencionalna ekstrakcija	95 %-tni etanol, 45 °C, 4 h	14,81 g GAE/100 g uzorka	Wang i sur. (2014)
	Soxhlet ekstrakcija	čisti etanol, 60 °C, 30 min	9,39 – 32,11 mg GAE/100 g uzorka	Akbari i sur. (2012)
	ultrazvučna sonda	50 %-tni etanol, 25 °C, 15 min	51,2 mg GAE/g s. tv. uzorka	Han i sur. (2018)

* s. tv. – suha tvar

Martínez i suradnici (2012) odredili su znatno manji udjel UP u LJKZ u odnosu na ovaj rad, a u istom istraživanju metanol:acetona otopina doprinjela je skoro duplo većem prinosu UP (154,43 i 144,83 mg GAE/100 g) u odnosu na čisti etanol. Elsebaie i Essa (2018) su u svom istraživanju ekstrakciju UP provodili s 50, 75 i 100 %-tnim metanolom, među kojima je 75 %-tni metanol imao najbolju ekstrakcijsku učinkovitost. Kujala i suradnici (2001) su u svom istraživanju u KC odredili veći udjel UP uporabom većeg volumena otapala i duljom ekstrakcijom koja je ponovljena još dva puta, a pri tom se udjel UP ne razlikuje znatno pri korištenju 80 %-tnog metanola ($24,1 \pm 0,3$ mg/g GAE) ili vode kao otapala ($20,5 \pm 0,4$ mg/g GAE). Akbari i suradnici (2012) dokazali su da udjel UP varira ovisno o varijetetu LJO. Han i suradnici (2018) dokazali su da veličina čestica uzorka uvelike utječe na prinos UP te su veličine čestica 0,354 – 0,150 mm u tom istraživanju doprinjele najboljoj ekstrakcijskoj učinkovitosti. Razlike u udjelu UP u ekstraktima analiziranim u ovom radu s dostupnih literaturnim podacima mogu se pripisati korištenju različitih varijeteta sekundarnih biljnih sirovina, njihovom stupnju zrelosti, a i samoj pripremi materijala i u konačnici korištenjem različitih otapala.

4.2.2. Antioksidacijski kapacitet

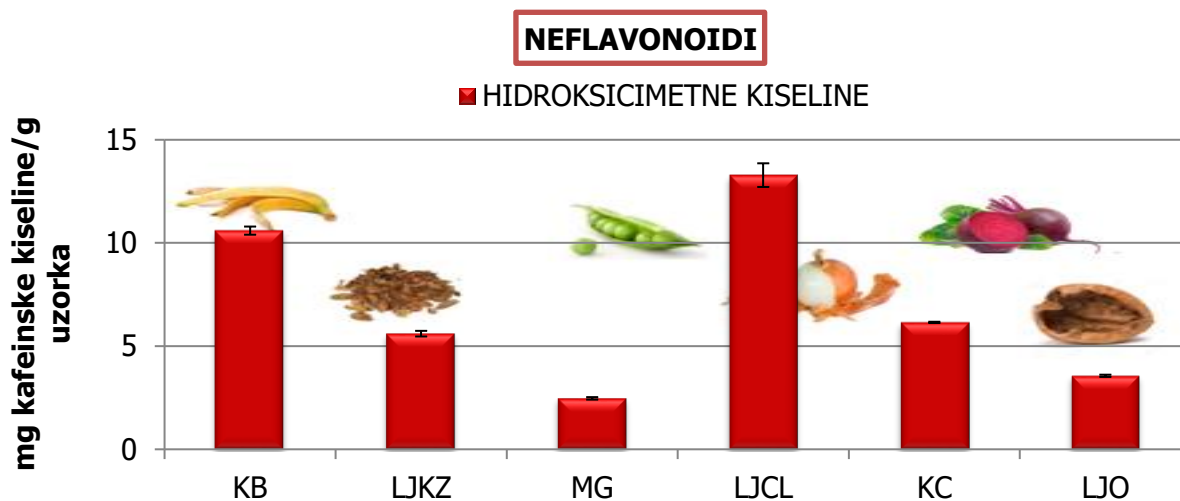


Slika 12. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox-a/g}$ uzorka) etanolnog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina

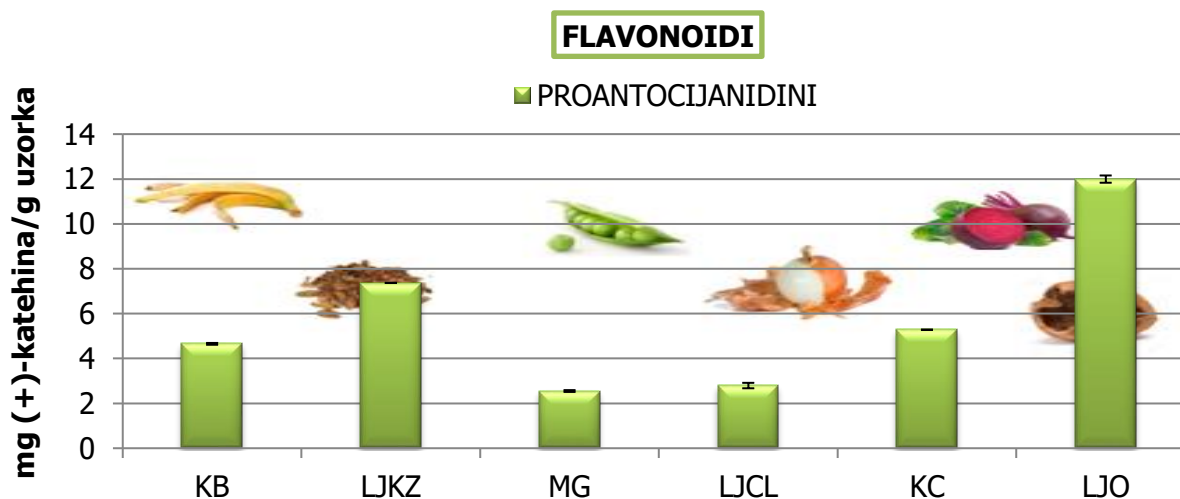
Rezultati antioksidacijskog kapaciteta, određenih ABTS i DPPH metodama, prikazan je na Slici 12. Vrijednosti dobivene DPPH metodom niže su od vrijednosti dobivenih ABTS metodom, što je i očekivano s obzirom na različit mehanizam djelovanja tih dviju metoda i različitu reaktivnost

ABTS i DPPH radikala. DPPH radikal ima veću stabilnost (a time i nižu reaktivnost), reagira s polifenolima, ali ne i s polifenolnim kiselinama. Prednost ABTS radikala je njegova visoka reaktivnost (Mareček i sur., 2017). Iz rezultata je vidljivo da prema ABTS metodi najveći antioksidacijski kapacitet ima LJCL ($287,96 \pm 2,47 \mu\text{mol Trolox-a/g}$ uzorka), a najmanji MG ($55,61 \pm 14,79 \mu\text{mol Trolox-a/g}$ uzorka). Isti je poredak i za rezultate određene DPPH metodom, s vrijednostima $79,01 \pm 0,69 \mu\text{mol Trolox-a/g}$ uzorka za LJCL i $17,19 \pm 0,35 \mu\text{mol Trolox-a/g}$ uzorka za MG. Poredak ostalih sirovina prema antioksidacijskom kapacitetu određenom ABTS metodom prikazan je padajućim nizom: LJCL>KC>KB>LJKZ>LJO>MG. Poredak ostalih sirovina prema antioksidacijskom kapacitetu određenom DPPH metodom prikazan je padajućim nizom: LJCL>KB>KC>LJO>LJKZ>MG. U istraživanju Rebelloa i suradnika (2014) antioksidacijski kapacitet KB određen ABTS metodom iznosio je $242,2 \mu\text{M Trolox-a/g}$, a vrijednost antioksidacijskog kapaciteta LJKZ koje su odredili Barbosa-Pereira i suradnici (2018) iznosi $101,10 - 321,97 \mu\text{M Trolox-a/g}$ s. tv., što je u skladu sa znatno većim udjelom UP ekstrahiranih ultrazvukom, odnosno pulsirajućim električnim poljem, nego u ovom radu. Martínez i suradnici (2012) ABTS metodom ($2,56 - 2,89 \mu\text{M TE/g}$) odredili su veći antioksidacijski kapacitet nego DPPH metodom ($1,57 - 1,71 \mu\text{M TE/g}$) u LJKZ, kao što je općenito uočeno i u ovom radu, a te vrijednosti su znatno manje od vrijednosti dobivenih u ovom radu što je u skladu s određenim i manjim udjelom UP. Babbar i suradnici (2014) odredili su da MG reducira DPPH radikal 72 %, a butilirani hidrositoluen (BHT), sintetski antioksidans, 82 %. U istraživanju Munira i suradnika (2018) antioksidacijski kapacitet LJCL određen DPPH metodom iznosio je $66,52 - 157,64 \text{ mmol Trolox-a/g}$ s.tv. što je u skladu s vrijednošću dobivenom u ovom radu, s obzirom na slične ekstrakcijske uvjete. U istom istraživanju dokazano je da je veličina čestica vrlo bitna za ekstrakcijsku učinkovitost, tj. UP, UF i DPPH vrijednosti su veće što je velična čestica uzorka manja. Sawicki i suradnici (2016) odredili su antioksidacijski kapacitet ABTS metodom u KC od $51,29 \mu\text{mol Trolox/g}$ s. tv., dok je DPPH metodom isti iznosio $54,78 \mu\text{mol Trolox/g}$ s. tv., ali obje vrijednosti su manje od vrijednosti određenih u ovom radu. Akbari i suradnici (2012) odredili su da LJO reducira DPPH radikal $7,99 - 17,27 \%$.

4.2.3. Udjeli odabranih grupa polifenolnih spojeva



Slika 13. Udjel hidrokscimetnih kiselina (mg kafeinske kiseline/g uzorka) u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina



Slika 14. Udjel proantocijanidina (mg (+)-katehina/g uzorka) u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina

Tablica 9. Udjel flavona, flavonola i flavan-3-ola u etanolnim ekstraktima ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina

Uzorak	Flavoni i flavonoli	Flavan-3-oli
	(mg kvercetina/g uzorka)	(mg (+)- katehina/g uzorka)
KB	1,14±0,06	0,96±0,06
LJKZ	n.d.	1,06±0,03
MG	0,83±0,20	0,85±0,04
LJCL	12,84±0,55	n.d.
KC	n.d.	n.d.
LJO	n.d.	0,95±0,05

*n.d. – nisu detektirani

Od **neflavonoida**, u sekundarnim biljnim sirovinama određivan je udjel hidroksicimetnih kiselina te su rezultati prikazani na Slici 13. Najveći udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u LJCL (13,29±0,57 mg kafeinske kiseline/g uzorak) i KB (10,60±0,20 mg kafeinske kiseline/g uzorak), dok su u ostalim sirovinama udjeli znatno manji. Najmanji je udjel u MG (2,47±0,06 mg kafeinske kiseline/g uzorak), iako je u njoj određeno više UP i UN u odnosu na LJO i LJKZ. Udjel hidroksicimetnih kiselina u ostalim sirovinama prikazan je padajućim nizom: KC>LJKZ>LJO. Od **flavonoida** u sekundarnim biljnim sirovinama određivani su proantocijanidini (Slika 14), flavoni i flavonoli te flavan-3-oli (Tablica 9). Najveći udjel proantocijanidina određen je u LJO (12,00±0,16 mg (+)-katehina/g uzorka), a najmanji udjel u MG (2,55±0,44 mg (+)-katehina/g uzorka). Udjel proantocijanidina u ostalim sirovinama prikazan je padajućim nizom LJKZ>KC>KB>LJCL>MG. Najveći udjel flavona i flavonola određen je u LJCL (12,84±0,55 mg kvercetina/g uzorka), što je puno veći udjel u odnosu na KB i MG (1,14±0,06 i 0,83±0,20 mg kvercetina/g uzorka) u kojima je određen približan udjel, dok isti nisu detektirani u ostalim sirovinama. Određeni udjel flavan-3-ola podjednak je za sve sirovine u kojima su isti detektirani, a najveći je u LJKZ (1,03±0,03 mg (+)- katehina/g uzorka). S obzirom na to da su koristili brašno KB koje je podvrgnuto termičkoj obradi, udjel flavan-3-ola (0,13 mg (+)-katehina/g) i proantocijanidina (3,95 mg (+)-katehina/g) koje su odredili Rebello i suradnici (2014) manji je od udjela određenog u ovom radu, dok je udjel flavonola iznosio 128,7±12,8 mg kvercetin-3-rutinozida/kg. Nije pronađen literaturni podatak za ukupan udjel hidroksicimetnih kiselina u KB, a Passo Tsamo i suradnici (2015b) odredili su udjel pojedinačnih

hidroksicimetnih kiselina u 9 varijeteta banane. U literaturi se navode brojni polifenolni spojevi u kakaovcu, međutim ljuska kakaovog zrna još nije dovoljno istražena. Grillo i suradnici (2018) odredili su nešto manje od 4 g/100 g oligomernih proantocijanidina u LJKZ. Prema literaturi, flavan-3-oli su glavni polifenolni spojevi kakaovog zrna (Vriesmann i sur., 2011). Povećanom antioksidacijskom kapacitetu LJKZ u odnosu na UP doprinose i metilksantini teobromin i kafein u istoj. Elsebaie i Essa (2018) odredili su da 0,09 % glavnih polifenolnih spojeva LJCL čini kafeinska, a 0,21 % ferulinska kiselina, dok su Burri i suradnici (2017) u vanjskoj ljusci odredili 30,7 µg/g s. tv. ferulinske kiseline i značajne udjele derivata kvercetina među flavanolima u vanjskoj i unutarnjoj ljuci. Budući da su flavan-3-oli detektirani u ovojnici sjemenke graška, očekuje se njihova prisutnost i u mahuni (Ferraro i sur., 2014). Nisu pronađeni referentni literaturni podaci za udjel hidroksicimetnih kiselina u MG, KC i LJO za koje nije pronađen podatak niti o ostalim određivanim podskupinama polifenolnih spojeva.

4.3. Analiza bioaktivnog sastava vodenog ekstrakta kore banane

Tablica 10. Udjel ukupnih polifenola, odabranih grupa polifenola i antioksidacijski kapacitet vodenog ekstrakta kore banane

Ukupni polifenoli			
Flavonoidi (mg EKG/g uzorka)		Neflavonoidi (mg EKG/g uzorka)	
11,75±0,61		3,73±0,02	
Flavoni i flavonoli (mg kvercetina/g uzorka)	Flavan-3-oli (mg (+)-katehina/g uzorka)	Proantocijanidini (mg (+)-katehina/g uzorka)	Hidroksicimetne kiseline (mg kafeinske kiseline/g uzorka)
0,20±0,02	1,45±0,14	14,41±0,38	7,46±0,06
Antioksidacijski kapacitet (µmol Trolox-a/g uzorka)			
ABTS		DPPH	
40,66±0,03		31,12±0,02	

Udjel ukupnih i odabranih grupa polifenola i antioksidacijski kapacitet vodenog ekstrakta KB prikazan je u Tablici 10. U vodenom ekstraktu KB određen je veći udjel UP (15,48 mg EKG/g uzorka), to jest znatno veći udjel UF, a znatno manji udjel UN nego u etanolnom ekstraktu, u kojemu je 13,52±0,3 mg EKG/g uzorka UP, 6,64±0,54 i 6,88±0,24 mg EKG/g uzorka UF i UN. U

vodenom ekstraktu određeno je više hidroksicimetnih kiselina, flavona i flavonola te flavan-3-ola, dok je udjel proantocijanidina puno veći u odnosu na etanolni. No, antioksidacijski kapacitet vodenog ekstrakta manji je od etanolnog koji je $91,67 \pm 6,41$ (ABTS) i $69,17 \pm 1,04$ (DPPH) μmol Trolox-a/g uzorka. U vodenom ekstraktu također je određen niži antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u odnosu na ABTS metodu. Aboul-Enein i suradnici (2016) i Hernández-Carranza i suradnici (2015) odredili su manji udjel UP u vodenim ekstraktima kore banane u odnosu na ovaj rad (Tablica 8).

4.4. Karakterizacija formuliranih jestivih filmova

4.4.1. Određivanje suhe tvari, debljine i mehaničkih svojstava

Tablica 11. Fizikalno-kemijska i mehanička svojstva formuliranih filmova

Uzorak	Udjel suhe tvari (%)	Debljina (μm)	Čvrstoća (N)	Elastičnost (mm)	Rad (J)	
kontrolni	2PV	$76,98 \pm 0,04$	$42,50 \pm 4,07$	X	X	X
	AV	$86,18 \pm 0,21$	$53,14 \pm 10,59$	63,92	2,30	27,44
	PAV	$84,01 \pm 0,07$	$73,14 \pm 6,69$	39,08	2,08	12,30
funkcionalni	AE	$88,55 \pm 0,10$	$84,29 \pm 8,38$	22,66	0,54	2,25
	APE	$87,89 \pm 0,23$	$109,57 \pm 13,74$	10,12	1,14	1,97
	MIX	$80,09 \pm 0,02$	$88,86 \pm 4,42$	21,97	5,41	16,50
	SLOJ	$83,56 \pm 0,31$	$98,71 \pm 22,58$	34,56	0,89	4,24

* oznake filmova prikazane su u Tablici 4 na stranici 37

X – nije bilo moguće izmjeriti

U Tablici 11 prikazani su rezultati određivanja udjela suhe tvari, debljine i mehaničkih svojstava (čvrstoća, elastičnost i rad) formuliranih jestivih filmova. Izrada jestivog filma od 4 % pektina u ekstraktu kore banane (PE) nije uspjela (Slika 16b), stoga nije korišten za daljnje analize. Kontrolni film 2 % pektina (Slika 14a) nije bilo moguće u cjelosti odvojiti od Petrijeve zdjelice pa mu je određen samo udjel suhe tvari i debljina.

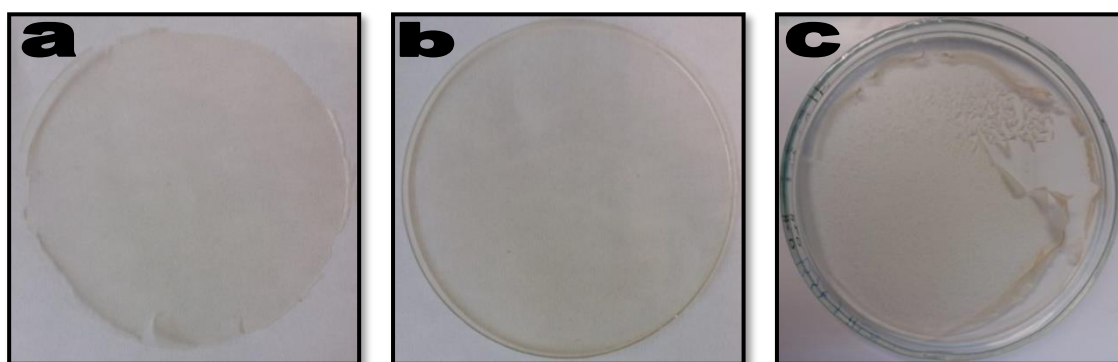
Najveći **udjel suhe tvari** određen je u alginatnom filmu obogaćenom ekstraktom kore banane (AE) (88,55%), a najmanji u kontrolnom filmu s 2 % pektina (2PV) koji jedini ima udjel suhe tvari <80 % (76,98 %). Nije primjećen općeniti trend povećanja ili smanjenja udjela suhe tvari

ovisno o primjeni ekstrakta kore banane, već on ovisi o hidrokolooidnim svojstvima biopolimera. Zasebni alginatni filmovi imaju veći udjel suhe tvari od ostalih filmova.

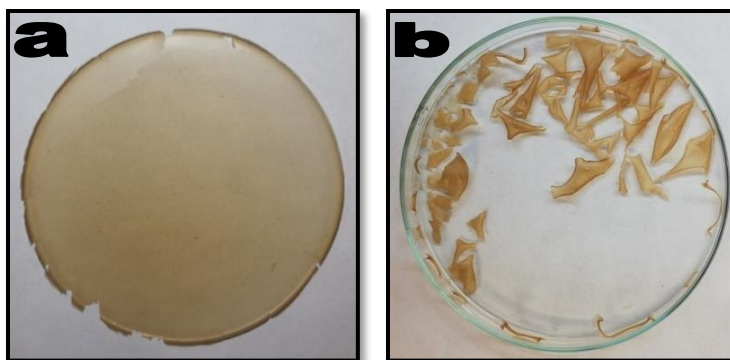
Najveća **debljina** određena je filmu pripremljenom miješanjem 4 % alginata i 2 % pektina u omjeru 1:1 (APE) ($109,57 \pm 13,74 \mu\text{m}$), dok je najmanja debljina određena za film 2PV ($42,50 \pm 4,07 \mu\text{m}$). Općenito se može primjetiti da su deblji filmovi s inkorporiranim bioaktivnim spojevima, u ovom slučaju kore banane, što je zabilježeno i u referentnim istraživanjima (Nisar i sur., 2017; Norajit i sur., 2010).

U istoj tablici prikazana su mehanička svojstva jestivih filmova. Najbolju **vlačnu čvrstoću** pokazao je kontrolni alginatni film (AV) (63,92 N), što je ujedno znatno veća vrijednost u odnosu na ostale filmove, a značajno manju vlačnu čvrstoću pokazao je film APE (10,12 N). Film izrađen od mješavine alginata i pektina u vodi i alginata i pektina u ekstraktu u omjeru 1:1 (MIX) pokazao je vrlo visoku **elastičnost** u odnosu na ostale filmove (5,41 mm), a najmanju elastičnost ima alginatni film (AE) (0,54 mm). Daleko veći **rad** pokazao je kontrolni alginatni film (AV) (27,44 J) u odnosu na ostale, zatim MIX i PAV u također visokim udjelima, dok su vrijednosti rada za ostale filmove znatno manje, a najmanja za film APE (1,97 J). Vrijednosti rada prate trend vrijednosti čvrstoće, s tim da se film MIX izdvaja iz tog slijeda. Film MIX pokazao je niske vrijednosti čvrstoće, ali visoke vrijednosti rada. To definira njegovu najmanju krtost među filmovima (najteže puca), a isto potkrepljuje i rezultat njegove najveće elastičnosti.

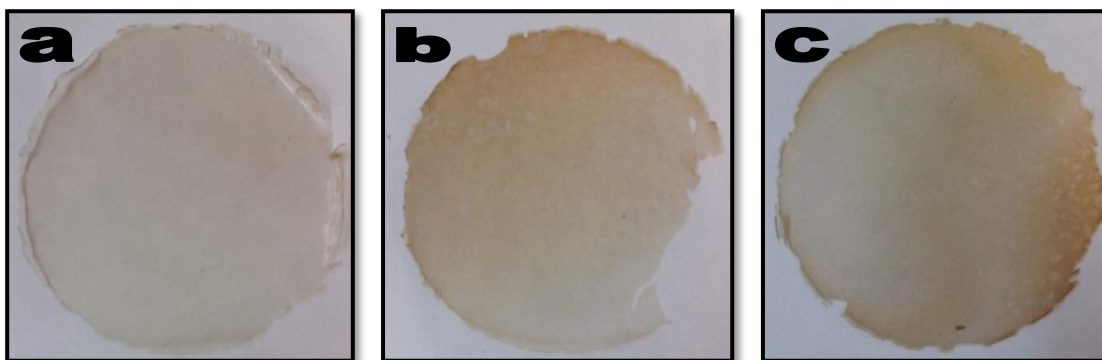
4.4.2. Vizualni izgled formuliranih jestivih filmova i određivanje boje



Slika 15. Fotografije formuliranih kontrolnih filmova **a)** 2 % pektin (2PV) **b)** 4 % alginat (AV) **c)** mješavina 2 % pektina i 4 % alginata (PAV)



Slika 16. Fotografije formuliranih filmova obogaćenih ekstraktom kore banane **a)** 4 % alginata (AE) **b)** 4 % pektina (PE)



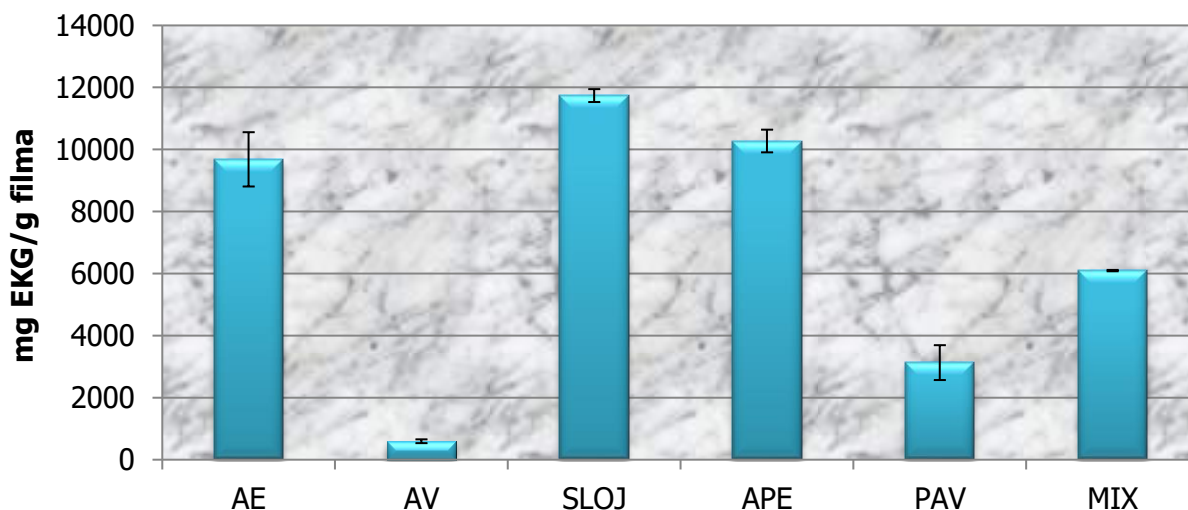
Slika 17. Fotografije formuliranih filmova **a)** mješavina 2 % pektina i 4 % alginata u ekstraktu (APE) **b)** sloj 2 % pektina u ekstraktu na 4 % alginata u ekstraktu (SLOJ) **c)** mješavina 2 % pektina i 4 % alginata u ekstraktu s mješavinom 2 % pektina i 4 % alginata u vodi (1:1) (MIX)

Tablica 12. Parametri boje formuliranih filmova

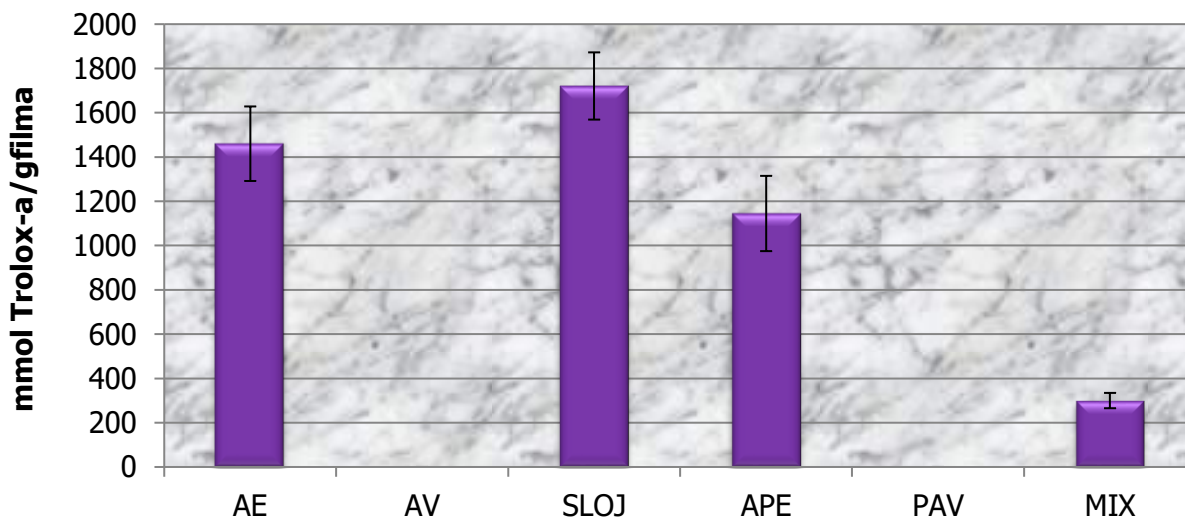
Uzorak	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab}	C	H°
2PV	33,31±0,03	-0,10±0,00	0,94±0,01	X	0,95±0,01	95,7±0,19
AV	32,96±0,00	-0,25±0,01	1,68±0,00	X	1,70±0,00	98,6±0,26
PAV	32,13±0,04	-0,14±0,02	0,95±0,01	X	0,96±0,01	98,2±0,91
AE	30,22±0,01	0,59±0,01	4,08±0,02	3,74±0,01	4,12±0,01	81,9±0,20
APE	30,72±0,01	0,22±0,00	3,81±0,01	2,60±0,04	3,81±0,01	86,8±0,08
MIX	31,44±0,03	0,04±0,01	2,19±0,04	1,43±0,07	2,19±0,04	88,9±0,25
SLOJ	31,22±0,01	0,05±0,02	3,37±0,01	2,59±0,02	3,37±0,00	89,3±0,3

Rezultati određivanja boje jestivih filmova prikazani su u Tablici 12. Numeričke vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* pokazuju velike razlike ovisno o tome da li je film pripremljen u vodi ili ekstraktu. Prema vizualnim karakteristikama filmova, kontrolni filmovi (Slika 15) su blijedo žute boje za razliku od filmova s ekstraktom kore banane koji su znatno tamniji (Slike 16 i 17). Najveću L^* vrijednost ima kontrolni pektinski film (2PV, Slika 14a) ($33,31 \pm 0,03$) što znači da je on najsvjetliji, dok je alginatni film pripremljen u ekstraktu kore banane (AE) najtamniji zbog najmanje L^* vrijednosti ($30,22 \pm 0,01$). Prema dobivenim rezultatima, veće a^* vrijednosti imaju filmovi obogaćeni ekstraktom kore banane u usporedbi s kontrolnim filmovima, pri čemu uzorak AE ima najveću a^* vrijednost ($0,59 \pm 0,01$), što označava najviši intenzitet crvene boje u tom filmu. Kontrolni filmovi imaju viši intenzitet zelene boje od filmova obogaćenih ekstraktom kore banane što se zaključuje iz manjih vrijednosti parametra a^* , a pri tome najmanju a^* vrijednost ima uzorak AV ($-0,25 \pm 0,01$). Viši intenzitet žute boje općenito imaju filmovi obogaćeni ekstraktom kore banane, što se zaključuje iz većih vrijednosti parametra b^* , a pri tom najveću b^* vrijednost ima uzorak AE ($4,08 \pm 0,02$). Sukladno tome viši intenzitet plave boje imaju kontrolni filmovi od filmova obogaćenih ekstraktom kore banane, što se zaključuje iz manjih vrijednosti parametra b^* , a pri tom najmanju vrijednost tog parametra ima uzorak 2PV ($0,94 \pm 0,01$). Prema numeričkim vrijednostima (poglavlje 3.2.6.4.), vidljiva je razlika boje između kontrolnih filmova i APE, MIX i SLOJ filmova obogaćenih ekstraktom kore banane (ΔE^*_{ab} je 1 – 3), dok se za AE film razlika boje dobro vidi (ΔE^*_{ab} je 3 – 6). Najveću C vrijednost (zasićenje ili intenzitet boje) općenito imaju filmovi obogaćeni ekstraktom kore banane, pri čemu je ta vrijednost najveća za AE film ($4,12 \pm 0,01$), a najmanja za 2PV film ($0,95 \pm 0,01$). H° vrijednost označava vizualni doživljaj boje čije vrijednosti se kreću $0 - 90^\circ$ za filmove obogaćene ekstraktom, što označava crveno-narančastu boju, a za kontrolne filmove $90 - 180^\circ$, što označava žuto-zelenu boju.

4.4.3. Bioaktivni sastav formuliranih jestivih filmova



Slika 18. Udjel ukupnih polifenola (mg EKG/g filma) u formuliranim filmovima

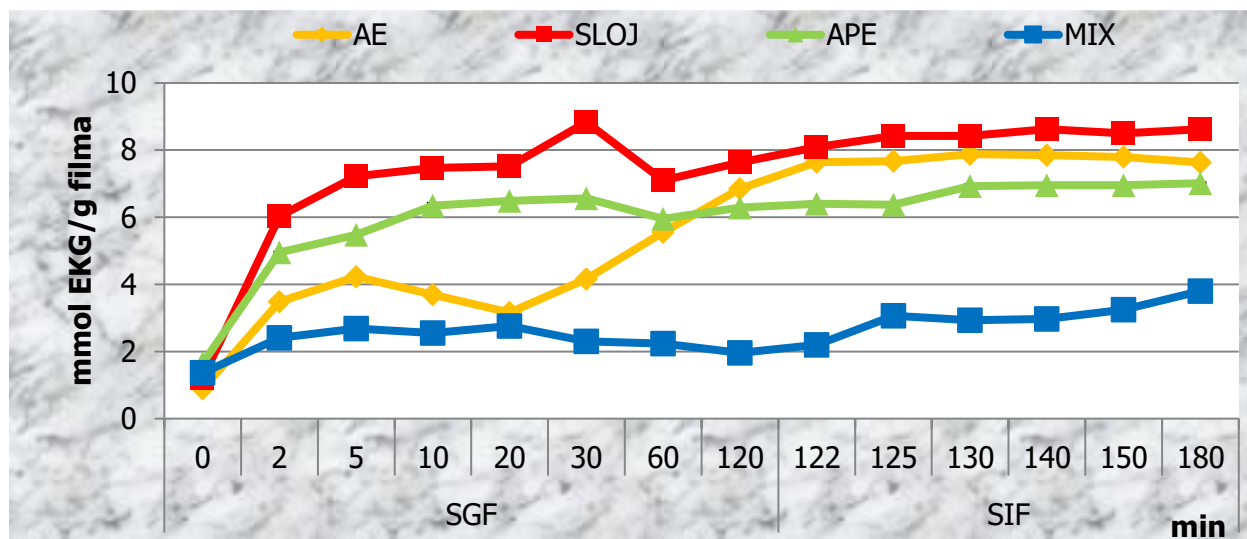


Slika 19. Antioksidacijski kapacitet (ABTS) (mmol Trolox-a/g filma) formuliranih filmova

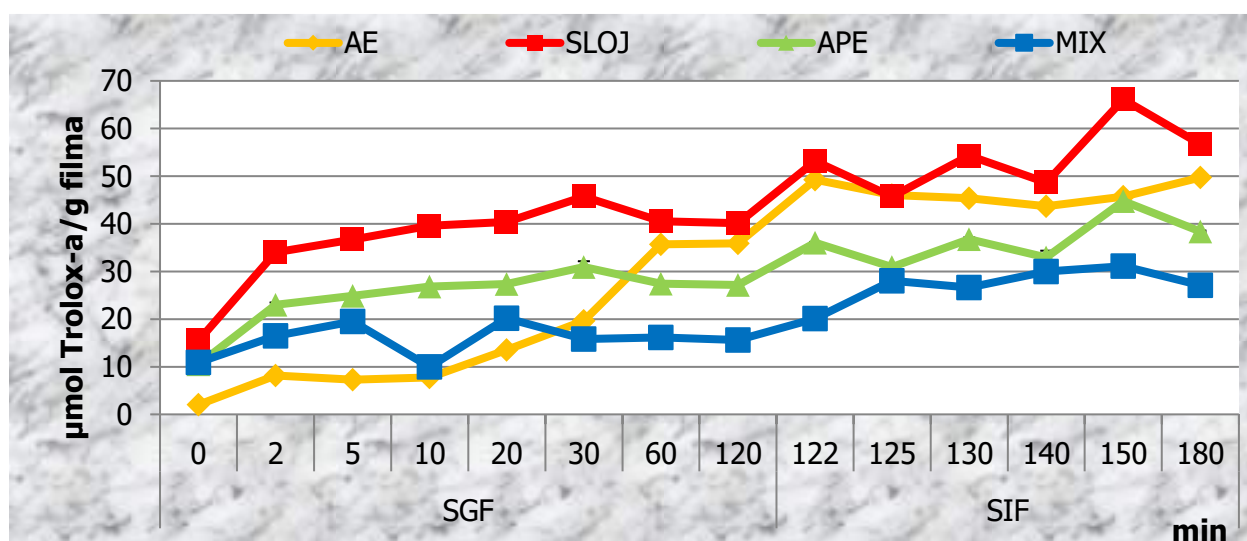
Kao izvor bioaktivnih spojeva, posebice polifenola, u ovom radu korišten je ekstrakt kore banane. Slika 18 prikazuje udjele UP koji su jako mali u kontrolnim filmovima, što je u skladu s očekivanjima. Najveći udjel UP određen je u filmu SLOJ (11737,97 mg EKG/g filma), u kojem je određen i najveći antioksidacijski kapacitet (1720,79 mmol/g filma) (Slika 19). Najmanji udjel UP određen je u filmu MIX (6096,07 mg EKG/g filma) kojemu je određen i najmanji antioksidacijski kapacitet (300,00 mmol/g filma).

Iako je AE filmu određen manji udjel UP, pokazao je veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na film APE, što može biti posljedica utjecaja biopolimera. Kombiniranje biopolimera u obliku mješavina i slojeva nije rezultiralo povećanjem ili smanjenjem antioksidacijskog kapaciteta s obzirom na to da je jednak poredak uzoraka kao i za udjel UP.

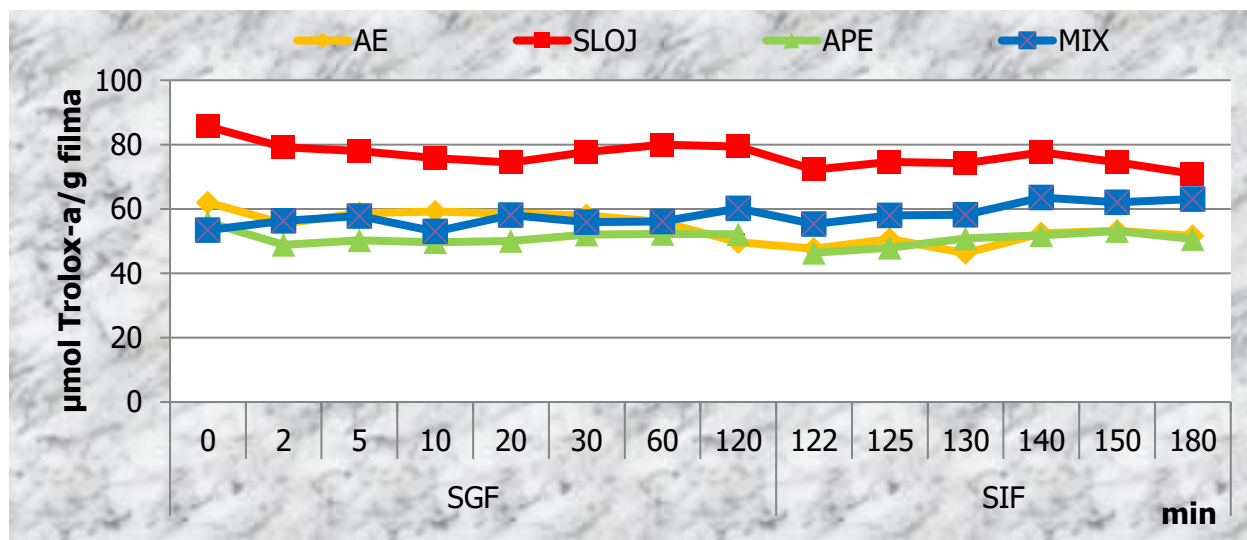
4.4.4. Kinetika otpuštanja bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova u simuliranim uvjetima gastro-intestinalnog trakta



Slika 20. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mmol EKG/g filma) formuliranih filmova



Slika 21. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (ABTS) (µmol Trolox-a/g filma) iz formuliranih filmova



Slika 22. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) ($\mu\text{mol Trolox/g}$ filma) iz formuliranih filmova

Prema rezultatima otpuštanja UP (Slika 20), primijećuje se postupno otpuštanje do 130.-te minute (uz poneke fluktuacije), nakon čega se postiže ravnotežno stanje. Može se zaključiti da vrsta biopolimera i njihove kombinacije nisu utjecali na zadržavanje UP u filmu. Otpuštanje iz filma SLOJ pokazalo je najpovoljniji profil, prema kojem se UP otpuštaju kontinuirano (uz fluktuaciju u 30.-oj minuti) i u najvećem udjelu, što je u skladu s prethodno određenim najvećim udjelom UP, a obrnut slučaj je za film MIX.

Poredak uzoraka prema profilu otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta određen ABTS metodom (Slika 21) jednak je poretku uzoraka prema profilu otpuštanja UP, tj. film SLOJ pokazao je najveći, a film MIX najmanji profil. Poredak uzoraka prema profilu otpuštanja antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom (Slika 22) ne slijedi trend otpuštanja određen ABTS metodom, što je posljedica već spomenutih različitih mehanizama djelovanja i reaktivnosti ABTS i DPPH radikala.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati analize osnovnih nutrijenata odabranih sekundarnih biljnih sirovina pokazuju relativno mali udjel masti masti (<3 % s.tv.) te prirodnog inverta i saharoze, uz iznimku kore banane u kojoj je udjel masti 7,52 % s. tv., a udjel prirodnog inverta 17,02 % s. tv. te saharoze 9,78 % s. tv. Najveći udjel proteina određen je u ljusci kakaovog zrna (18,16 % s. tv.) te kori cikle i mahuni graška, u rasponu 15 – 20 % s. tv., dok je najmanji udjel proteina određen u ljusci oraha (1,75 % s. tv.). Najveći udjel mineralnih tvari određen je u kori banane (13,95 % s. tv.), a najmanji u ljusci oraha (0,92 % s. tv.). Udjeli prehrambenih vlakana za koru cikle i koru banane kreću se 30 – 40 % s. tv., dok su za ostale sirovine >50 % s. tv., a daleko najveći udjel određen je u ljusci oraha (93,50 % s. tv.).

2. Najveći udjel makroelemenata određen je u kori banane, a najmanji u ljusci oraha. Najzastupljeniji makroelement u sekundarnim biljnim sirovinama je K (75061 µg/g u kori banane), no u ljusci crvenog luka najviše je Ca (22828 µg/g). Na, Mg i P određeno je najviše u KC (4380 µg/g, 6570 µg/g i 7811 µg/g), a Ca i Fe u ljusci crvenog luka. Najzastupljeniji mikroelement je Cu, a među ispitivanim sirovinama najveći udjel mu je određen u kori cikle (7811 µg/g). Ljuska crvenog luka najbogatija je mikroelementima među svim ispitivanim sirovinama, dok je ljuska oraha najmanje bogata određivanim mikroelementima.

3. Analizom bioaktivnog sastava, u ljusci crvenog luka određeno je najviše ukupnih polifenola (55,18±0,97 mg EKG/g uzorka) i ukupnih flavonoida (26,63±0,87 mg EKG/g uzorka) među svim sekundarnim biljnim sirovinama, dok ih je najmanje zastupljeno u ljusci kakaovog zrna. Ukupnih neflavonoida određeno je najviše u ljusci crvenog luka (28,55±0,09 mg EKG/g uzorka), a najmanje u ljusci kakaovog zrna (3,00±0,09 mg EKG/g uzorka).

4. U skladu s najvećim udjelom ukupnih polifenola, ljuska crvenog luka ima najveći antioksidacijski kapacitet (287,96±2,47 (ABTS) i 79,01±0,69 µmol Trolox-a/g uzorka (DPPH)), dok mahuna graška ima najmanji antioksidacijski kapacitet (55,61±14,79 (ABTS) i 17,19±0,35 (DPPH) µmol Trolox-a/g uzorka).

5. U ljusci crvenog luka i kori banane određeno je najviše ukupnih hidroksicimetnih kiselina (13,29±0,57 mg kafeinske kiseline/g uzorka), a najmanje ih je u mahuni graška (2,47±0,06 mg kafeinske kiseline/g uzorka). Proantocijanidina je najviše određeno u ljusci oraha (12,00±0,16 mg (+)-katehina/g uzorka), a najmanje u mahuni graška (2,55±0,44 mg

(+)-katehina/g uzorka). Flavoni i flavonoli su najzastupljeniji u ljusci crvenog luka ($12,84 \pm 0,55$ mg kvercetina/g uzorka), dok je u kori banane i kori cikle njihov udjel približno mali ($1,14 \pm 0,06$ i $0,83 \pm 0,20$ mg kvercetina/g uzorka), a u ostalim sirovinama nisu detektirani. Najveći udjel flavan-3-ola određen je u ljusci kakaovog zrna ($1,03 \pm 0,03$ mg (+)-katehina/g uzorka).

6. Klorofil je najzastupljeniji određivani pigment, i to klorofil b u KC ($146,99 \pm 0,00$ μ g/g uzorka), u kojoj je određen i najveći udjel antocijana ($105,59 \pm 6,17$ mg Ac/g uzorka). Najveći udjel karotenoida ($61,15 \pm 0,22$ μ g/g uzorka) određen je u kori banane.

7. Vodeni ekstrakt kore banane karakterizira viši udjel ukupnih polifenola ($15,48 \pm 0,59$ mg EKG/g uzorka) i ukupnih neflavonoida ($11,75 \pm 0,61$ mg EKG/g uzorka). No, ukupnih neflavonoida manje je u vodenom ekstraktu ($3,37 \pm 0,02$ mg EKG/g uzorka) u odnosu na etanolni. Također je u vodenom ekstraktu više hidroksicimetnih kiselina ($7,46 \pm 0,06$ mg kafeinske kiseline/g uzorka), flavona i flavonola ($0,20 \pm 0,02$ mg kvercetina/g uzorka), flavan-3-ola ($1,45 \pm 0,14$ mg (+)-katehina/g uzorka) te značajno više proantocijanidina ($14,41 \pm 0,38$ mg (+)-katehina/g uzorka). Međutim, antioksidacijski kapacitet vodenog ekstrakta niži je od etanolnog.

8. Ekstrakt kore banane doprinio je većoj debljini jestivih filmova. Također, jestivi filmovi od ekstrakta kore banane su tamniji s crveno-narančastim komponentama boje među kojima se posebno ističe film s alginatom, dok kontrolni filmovi sadrže više komponenti hladnih boja. Film izrađen od mješavine 4 % alginata i 2 % pektina u vodi te 4 % alginata i 2 % pektina u ekstraktu u omjeru 1:1 pokazao je najveću elastičnost, a najmanju krutost od svih formuliranih filmova.

9. Film od sloja pektina na alginatu sadrži najveći udjel ukupnih polifenola, kao i najveći antioksidacijski kapacitet. Najmanji udjel ukupnih polifenola određen je u filmu MIX ($6096,07 \pm 21,83$ mg EKG/g filma), kojemu je određen i najmanji antioksidacijski kapacitet ($300,00 \pm 34,65$ mmol/g filma).

10. Računanjem kinetike otpušanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, funkcionalni film obogaćen ekstraktom kore banane pripremljen u dva sloja rezultirao je najpovoljnijim profilom, otpuštajući bioaktivne parametre kontinuirano i u najvećem udjelu, za razliku od filma dobivenog izlivanjem mješavine nosača koji se pokazao najlošijim.

6. LITERATURA

1. Abdel Aziz, M. S., Salama, H. E., Sabaa, M. W. (2018) Biobased alginate/castor oil edible films for active food packaging. *LWT - Food Science and Technology* **96**, 455 – 460.
2. Aboul-Enein, A. M., Salama, Z. A., Gaafar, A. A., Aly, H. F., Abou-Elella, F., Ahmed, H. A. (2016) Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradaisica* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **8**, 46 – 55.
3. Agama-Acevedo, E., Sañudo-Barajas, J. A., Vélez De La Rocha, R., González-Aguilar, G. A., Bello-Peréz, L. A. (2015) Potential of plantain peels flour (*Musa paradisiaca* L.) as a source of dietary fiber and antioxidant compound. *CyTA - Journal of Food* **14**, 117 – 123.
4. Ahmad, G., Kudesia, R., Srivastava, M. K. (2010) Evaluation of genetic diversity in pea (*Pisum sativum* L.) using RAPD analysis. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* **2010**, 1 – 15.
5. Akbari, V., Jamei, R., Heidari, R., Esfahlan, A. J. (2012) Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chemistry* **135**, 2404 – 2410.
6. Akdeniz, B., Gulum, S., Sahin, S. (2017) The effects of maltodextrin and gum arabic on encapsulation of onion skin phenolic compounds. *Chemical Engineering Transactions* **57**, 1891 – 1896.
7. Albishi, T., John, J. A., Al-Khalifa, A. S., Shahidi, F. (2013) Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods* **5**, 1191 – 1203.
8. Amini Khoozani, A., Birch, J., Bekhit, A. E.-D. A. (2019). Production, application and health effects of banana pulp and peel flour in the food industry. *Journal of Food Science and Technology* **56**, 548 – 559.
9. Anal, A. K., Jaisanti, S., Noomhorm, A. (2012) Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata Colla AAA*) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 2632

– 2639.

10. Anonymous 1 <<http://www.gosocial.co/heres-never-throw-away-banana-peels/>> Pristupljeno 07. svibnja 2019.
11. Anonymous 2 (2011) <<http://www.rgbstock.com/photo/nfHI4to/beetroot+peelings2>> Pristupljeno 07. svibnja 2019.
12. Anonymous 3 <<https://www.indiamart.com/proddetail/walnut-shells-18132083612.html>> Pristupljeno 07. svibnja 2019.
13. Anonymous 4 <<https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photo-garbage-pile-pea-pods-image10050715>> Pristupljeno 07. svibnja 2019.
14. Anonymous 5 (2013) <<http://itsastitchup.co.uk/blog/dyeing-with-onion-skins/>> Pristupljeno 07. svibnja 2019.
15. AOAC (1990a) Moisture in animal feed - AOAC method 930.15. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.
16. AOAC (1990b) Fat (crude) or ether extract in animal feed - AOAC method 920.39. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.
17. AOAC (2012) Insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods - AOAC- method 2011.25. Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Ireland
18. Ayranci, E., Tunç, S. (1997) Cellulose-based edible films and their effects on fresh beans and strawberries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung A* **205**, 470 – 473.
19. Ayrilmis, N., Kaymakci, A., Ozdemir, F. (2013) Physical, mechanical, and thermal properties of polypropylene composites filled with walnut shell flour. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **19**, 908 – 914
20. Azeredo, H. M. C. (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability-a review. *International Journal of Food Science & Technology* **44**, 2365 – 2376.

21. Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., Bhargav, V. K. (2014) Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 2568 – 2575.
22. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**, 191 – 203.
23. BananaLink <<http://www.bananalink.org.uk/how-bananas-are-grown>> Pristupljeno 23. srpnja 2019.
24. Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R., Raychaudhuri, U. (2007) A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT - Food Science and Technology* **40**, 842 – 851.
25. Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A., Zeppa, G. (2018) Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology* **11**, 818 – 835.
26. Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I. C. F. R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry* **111**, 61 – 66.
27. Bate-Smith, E. C. (1973) Tannins in herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* **12**, 1809 – 1812.
28. Belghith-Fendri, L., Chaari, F., Kallel, F., Zouari-Ellouzi, S., Ghorbel, R., Besbes, S., Ellouzi-Chaabouni, S., Ghribi-Aydi, D. (2016) Pea and broad bean pods as a natural source of dietary fiber: The impact on texture and sensory properties of cake. *Journal of Food Science* **81**, 2360 – 2366.
29. Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Esteban, R. M. (2017) Physicochemical properties and *in vitro* antidiabetic potential of fibre concentrates from onion by-products. *Journal of Functional Foods* **36**, 34 – 42.
30. Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Cools, K.,

- Terry, L. A., Esteban, R. M. (2011) Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* **66**, 48 – 57.
31. Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**, 205 – 212.
 32. Blanco-Fernandez, B., Rial-Hermida, M. I., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2012) Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin E and antioxidant activity. *Journal of Applied Polymer Science* **129**, 626 – 635.
 33. Boumans, P.W.J.M. (1987) *Basic concepts and characteristics of ICP-AES, inductively coupled plasma emission spectroscopy - Methodology, instrumentation, and performance, Part 1*. Wiley, New York.
 34. Bourtoom, T. (2008) Review article - Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* **15**, 237 – 248.
 35. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**, 25 – 30.
 36. Burri, S. C. M., Ekholm, A., Håkansson, Å., Tornberg, E., Rumpunen, K. (2017) Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *Journal of Functional Foods* **38**, 119 – 127.
 37. Caballero, E., Soto, C. (2019) Valorization of agro-industrial waste into bioactive compounds: Techno-economic considerations. *Biorefinery*, 235 – 252.
 38. Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., Oomah, B. D. (2018) Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* **81**, 172 – 184.
 39. Cardoso, S., Maraschin, M., Peruch, L. A. M., Rocha, M., Pereira, A. (2017) A chemometrics approach for nuclear magnetic resonance data to characterize the partial metabolome banana peels from Southern Brazil. *Journal of Integrative Bioinformatics* **14**, 1 – 10.

40. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**, 178 – 182.
41. Chong, J., Poutaraud, A., Huguene, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* **177**, 143 – 155.
42. Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihar, H. (2006) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing Ltd, London, str. 1 – 21.
43. Demirbaş, A. (2005) Estimating of structural composition of wood and non-wood biomass samples. *Energy Sources* **27**, 761 – 767.
44. Devatkal, S. K., Kumboj, R., Paul, D. (2011) Comparative antioxidant effect of BHT and water extracts of banana and sapodilla peels in raw poultry meat. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 387 – 391.
45. Dhanapal, A., Sasikala, P., Rajamani, L., Kavitha, V., Yazhini, G., Banu, M. S. (2012) Edible films from polysaccharides. *Food Science and Quality Management* **3**, 9 – 18.
46. DiStefano, R., Cravero, M.C., Gentilini, N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli del vino. *L'Enotecnico* **25**, 83 – 89.
47. Eça, K. S., Sartori, T., Menegalli, F. C. (2014) Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology* **17**, 98 – 112.
48. Elsebaie, E. M., Essa, R. Y. (2018) Microencapsulation of red onion peel polyphenols fractions by freeze drying technology and its application in cake. *Journal of Food Processing and Preservation* **42**, 1 – 7.
49. Ertürk, U., Akça, Y. (2014) Overview of walnut culture in Turkey. *Acta Horticulturae* **1050**, 369 – 372.
50. Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., McHugh, T. H. (2014) Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids* **35**, 287 – 296.
51. FAO (2019) <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Pristupljeno 28. svibnja 2019.

52. FAO (2019) <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Pristupljeno 05. lipnja 2019.
53. FAO (2019) Banana facts and figures <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.XPQkRBYzbIW>> Pristupljeno 02. lipnja 2019.
54. Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D. (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84**, 895 – 900.
55. Ferraro, K., Jin, A. L., Nguyen, T.-D., Reinecke, D. M., Ozga, J. A., Ro, D.-K. (2014) Characterization of proanthocyanidin metabolism in pea (*Pisum sativum*) seeds. *BMC Plant Biology* **14**, 1 – 17.
56. Feumba, D.R., Ashwini, R. P., Ragu, S. M. (2016) Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology* **4**, 12 – 21.
57. Fu, X., Cheng, S., Liao, Y., Huang, B., Du, B., Zeng, W., Jiang, Y., Duan, X., Yang, Z. (2018) Comparative analysis of pigments in red and yellow banana fruit. *Food Chemistry* **239**, 1009 – 1018.
58. Fuss, E. (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Reviews* **2**, 307 – 320.
59. Gabbay Alves, T. V., Silva da Costa, R., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P., Carréra Silva Júnior, J. O., Ribeiro Costa, R. M., Converti, A. (2017) Microencapsulation of *Theobroma cacao* L. waste extract: Optimization using response surface methodology. *Journal of Microencapsulation* **34**, 111 – 120.
60. Galić, K. (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 23 – 31.
61. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2014) Biological activities of plant pigments betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**, 937 – 945.
62. Ganesapillai, M., Mathew, M., Singh, A., Simha, P. (2016) Influence of microwave and ultrasound pretreatment on solvent extraction of bio-components from walnut (*Julgans regia* L.) shells. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* **60**, 40 – 48.

63. Gasztonyi, M. N., Daood, H., Hájos, M. T., Biacs, P. (2001) Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var *conditiva*) varieties on the basis of their pigment components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 932 – 933.
64. Gawlik-Dziki, U., Kaszuba, K., Piwowarczyk, K., Świeca, M., Dziki, D., Czyż, J. (2015) Onion skin - raw material for the production of supplement that enhances the health-beneficial properties of wheat bread. *Food Research International* **73**, 97 – 106.
65. González-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., González, M. (2010) Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry* **119**, 1030 – 1039.
66. Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. (2002) Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Research* **16**, 603 – 615.
67. Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., Cravotto, G., Chemat, F., Dizhbite, T., Lauberte, L., Telysheva, G. (2018) Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International* **15**, 200 – 208.
68. Gupta, P., Premavalli, K. S. (2011) In-vitro studies on functional properties of selected natural dietary fibers. *International Journal of Food Properties* **14**, 397 – 410.
69. Han, H., Wang, S., Rakita, M., Wang, Y., Han, Q., Xu, Q. (2018) Effect of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds on the characteristics of walnut shells. *Food and Nutrition Sciences* **9**, 1034 – 1045.
70. Happi Emaga, T., Andrianaivo, R. H., Wathelet, B., Tchango, J. T., Paquot, M. (2007) Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry* **103**, 590 – 600.
71. Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltrán, J. A., Navarro-Cruz, A. R., Corona-Jiménez, E., Ochoa-Velasco, C. E. (2015) Optimization of antioxidant compounds extraction from fruit by-products: Apple pomace, orange and banana peel. *Journal of Food Processing and Preservation* **40**, 103 – 115.
72. HRN EN ISO 20483 (2014), Žitarice i mahunarke, Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina - Prema Kjeldahl metodi.

73. HRN EN ISO 2171 (2010), Žitarice, Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem.
74. Huang, Y., Sheng, J., Yang, F., Hu, Q. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *Journal of Food Engineering* **78**, 687 – 692.
75. Huber, K. C., Embuscado, M. E. (2009) *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Springer, New York.
76. Iahnke, A. O. e S., Costa, T. M. H., de Oliveira Rios, A., Flôres, S. H. (2015) Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) residues. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, 1 – 10.
77. ICCO (2019) <<https://www.icco.org/about-us/icco-news/405-february-2019-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>> Pristupljeno 19. srpnja 2019.
78. Iwata, E., Hotta, H., Goto, M. (2009) The screening method of a bifidogenic dietary fiber extracted from inedible parts of vegetables. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **55**, 385 – 388.
79. Jackman, R. L., Smith, J. L. (1996) Anthocyanins and betalains. U: *Natural Food Colorants* (Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., ured.), Chapman & Hall, London, str. 244 – 309.
80. Jalili Safaryan, M., Ganjloo, A., Bimakr, M., Zarringhalami, S. (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from green pea pods. *Foods* **5**, 1 – 15.
81. Jalili, A., Heydari, R., Sadeghzade, A. and Alipour, S. (2012) Reducing power and radical scavenging activities of phenolic extracts from *Juglans regia* hulls and shells. *African Journal of Biotechnology* **11**, 9040 – 9047.
82. Ji, L., Srzednicki, G. (2015) Extraction of aromatic compounds from banana peels. *Acta Horticulturae* **1088**, 541 – 546.
83. Jokić, S., Gagić, T., Knez, Ž., Šubarić, D., Škerget, M. (2018) Separation of active compounds from food by-product (cocoa shell) using subcritical water extraction. *Molecules* **23**, 1 – 17.

84. Jozinović, A., Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Babić, J., Pajin, B., Miličević, B., Guberac, S., Vrdoljak, A., Šubarić, D. (2018) Cocoa husk application in the enrichment of extruded snack products. *Journal of Food Processing and Preservation* **43**, 1 – 9.
85. Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3954 – 3962.
86. Kanazawa, K., Sakakibara, H. (2000) High content of dopamine, a strong antioxidant, in *Cavendish* banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 844 – 848.
87. Kar, Y. (2011) Co-pyrolysis of walnut shell and tar sand in a fixed-bed reactor. *Bioresource Technology* **102**, 9800 – 9805.
88. Kara, D. (2009) Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry* **144**, 347 – 354.
89. Konica-Minolta (1998) *Precise color communication: Color control from perception to instrumentation*. Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka.
90. Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5338 – 5342.
91. Kujala, T., Klika, K., Ovcharenko, V., Loponen, J., Vienola, M., Pihlaja, K. (2001) 5,5',6,6'-Tetrahydroxy-3,3'-biindolyl from beetroot (*Beta vulgaris*) peel extract. *Zeitschrift für Naturforschung* **56**, 714 – 718.
92. Kumar, S., Brooks, M. S.-L. (2017) Use of red beet (*Beta vulgaris* L.) for antimicrobial applications - a critical review. *Food and Bioprocess Technology* **11**, 17 – 42.
93. Kurhade, A., Patil, S., Sonawane, S. K., Waghmare, J. S., Arya, S. S. (2015) Effect of banana peel powder on bioactive constituents and microstructural quality of chapatti: unleavened Indian flat bread. *Journal of Food Measurement and Characterization* **10**, 32 – 41.

94. Lambale, K. J., Hill, S. J. (1998) Microwave digestion procedures for environmental matrices. *The Analyst* **123**, 103 – 133.
95. Lancaster, J. E., Lister, C. E., Reay, P. F., Triggs, C. M. (1997) Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**, 594 – 598.
96. Lee, E.-H., Yeom, H.-J., Ha, M.-S., Bae, D.-H. (2010) Development of banana peel jelly and its antioxidant and textural properties. *Food Science and Biotechnology* **19**, 449 – 455.
97. Lessa, O. A., Reis, N. dos S., Leite, S. G. F., Gutarra, M. L. E., Souza, A. O., Gualberto, S. A., Rangel de Oliveira, J., Franco, M. (2017) Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology* **27**, 107 – 113.
98. Li, X., Du, X., Liu, Y., Tong, L., Wang, Q., Li, J. (2019) Rhubarb extract incorporated into an alginate-based edible coating for peach preservation. *Scientia Horticulturae* **257**, 1 – 7.
99. Manohar, C. M., Kundgar, S. D., Doble, M. (2016) Betanin immobilized LDPE as antimicrobial food wrapper. *LWT - Food Science and Technology* **80**, 131 – 135.
100. Manzano, P., Hernández, J., Quijano-Avilés, M., Barragán, A., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., Valle, O. (2017) Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **29**, 45 – 50.
101. Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., Cerkal, R. (2017) ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* **73**, 40 – 45.
102. Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2006) Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), ascorbic acid, red beet root (*Beta vulgaris*), and sodium lactate and their mixtures on the stability of fresh pork sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4674 – 4680.

103. Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2012) Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* **49**, 39 – 45.
104. Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., Fiszman, S. M. (2011) Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 729 – 736.
105. Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A., Tenorio-Sanz, M.-D. (2010) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1467 – 1470.
106. Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2**, 321 – 330.
107. Mir, S. A., Dar, B. N., Wani, A. A., Shah, M. A. (2018) Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. *Trends in Food Science & Technology* **80**, 141 – 154.
108. Mohapatra, D., Mishra, S., Sutar, N. (2010) Banana and its by-product utilisation: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* **69**, 323 – 329.
109. Mohd, Y. (2017) Agro-industrial waste materials and their recycled value - added applications: review. *Handbook of Ecomaterials*, 1 – 11.
110. Mourtzinis, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D. P., Biliaderis, C. G., Moschakis, T. (2018) Natural food colorants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. *Electrophoresis* **39**, 1975 – 1983.
111. Munir, M. T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., Young, B. R. (2018) Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *Journal of Cleaner Production* **183**, 487 – 494.
112. Nisar, T., Wang, Z.-C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., Guo, Y. (2017) Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier,

- antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **106**, 670 – 680.
113. Norajit, K., Kim, K. M., Ryu, G. H. (2010) Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering* **98**, 377 – 384.
114. Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., Lagnika, C. (2012) Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells. *Pakistan Journal of Nutrition* **11**, 574 – 579.
115. Official Methods of Analysis of AOAC International, 14th ed., Arlington (1985) Secs. 31.037 – 31.044
116. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Vol. 2. Arlington (1995) Secs. 37.1.51.; 37.1.52; 44.1.16; 44.1.17.
117. Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., Rodrigues, C. E. C. (2017) Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* **63**, 103 – 112.
118. Ortiz, L., Dorta, E., Gloria Lobo, M., Antonio González-Mendoza, L., Díaz, C., González, M. (2017) Use of banana peel extract to stabilise antioxidant capacity and sensory properties of orange juice during pasteurisation and refrigerated storage. *Food and Bioprocess Technology* **10**, 1883 – 189.
119. Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.
120. Öztürk, E., Ova, G. (2018) Evaluation of cocoa bean hulls as a fat replacer on functional cake production. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* **6**, 1043 – 1050.
121. Ozung, P. O., Kennedy Oko, O. O., Agiang, E. A. (2016) Chemical Composition of Differently Treated Forms of Cocoa POD Husk Meal (CPHM). *Asian Journal of Agricultural Sciences* **8**, 5 – 9.

122. Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, B., Pavlović, N. (2018) Cocoa shell: A by-product with great potential for wide application. *Molecules* **23**, 1 – 14.
123. Parreidt, T., Müller, K., Schmid, M. (2018) Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods* **7**, 1 – 38.
124. Passo Tsamo, C. V., Herent, M.-F., Tomekpe, K., Happi Emaga, T., Quetin-Leclercq, J., Rogez, H., Larondelle, Y., Andre, C. M. (2015a) Effect of boiling on phenolic profiles determined using HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS, physico-chemical parameters of six plantain banana cultivars (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis* **44**, 158 – 169.
125. Passo Tsamo, C. V., Herent, M.-F., Tomekpe, K., Happi Emaga, T., Quetin-Leclercq, J., Rogez, H., Larondelle, Y., Andre, C. M. (2015b) Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa sp.*). *Food Chemistry* **167**, 197 – 204.
126. Pereira, A., Maraschin, M. (2015) Banana (*Musa spp*) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *Journal of Ethnopharmacology* **160**, 149 – 163.
127. Pereira, G. A., Arruda, H. S., Molina, G., Pastore, G. M. (2017) Extraction optimization and profile analysis of oligosaccharides in banana pulp and peel. *Journal of Food Processing and Preservation* **42**, 1 – 10.
128. Pérez, C. D., Fissore, E. N., Gerschenson, L. N., Cameron, R. G., Rojas, A. M. (2012) Hydrolytic and Oxidative stability of l-(+)-ascorbic acid supported in pectin films: Influence of the macromolecular structure and calcium presence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 5414 – 5422.
129. Porter, L.J., Hrstich, L., Chan, B. G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25**, 223 – 230.
130. Price, M. L., Van Scoyoc, S., Butler, L. G. (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 1214 – 1218.

131. Puraikalan, Y. (2018) Characterization of proximate, phytochemical and antioxidant analysis of banana (*Musa Sapientum*) peels/skins and objective evaluation of ready to eat/cook product made with banana peels. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* **6**, 382 – 391.
132. Queirós, C. S. G. P., Cardoso, S., Lourenço, A., Ferreira, J., Miranda, I., Lourenço, M. J. V., Pereira, H. (2019) Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1 – 14.
133. Ravindran, R., Jaiswal, A. K. (2016) Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology* **34**, 58 – 69.
134. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**, 1231 – 1237.
135. Rebello, L. P. G., Ramos, A. M., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Castillo-Muñoz, N., Hermosín-Gutiérrez, I. (2014) Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International* **55**, 397 – 403.
136. Rudra, S.G., Nishad, J., Jakhar, N., Kaur, C. (2015) Food industry waste: mine of nutraceuticals. *International Journal of Science and Technology* **4**, 205 – 229.
137. Sadh, P. K., Duhan, S., Duhan, J. S. (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* **5**, 1 – 15.
138. Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., Lobo, M. G. (2018) Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**, 512 – 531.
139. Sarengaowa, Hu, W., Jiang, A., Xiu, Z., Feng, K. (2017) Effect of thyme oil-alginate-based coating on quality and microbial safety of fresh-cut apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**, 2302 – 2311.
140. Sawicki, T., Bączek, N., Wiczowski, W. (2016) Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional*

Foods **27**, 249 – 261.

141. Singh, B., Hathan, B. S. (2014) Chemical composition, functional properties and processing of beetroot - a review. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **5**, 679 – 684.
142. Singh, R., Kausk, R., Gosewade, S. (2018) Bananas as underutilized fruit having huge potential as raw materials for food and non-food processing industries: A brief review. *The Pharma Innovation Journal* **7**, 574 – 580.
143. Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144 – 158.
144. Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., Jakopic, J. (2015) HPLC-MSⁿ Identification of betalain profile of different beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) parts and cultivars. *Journal of Food Science* **80**, 1952 – 1958.
145. Socaci, S. A., Rugină, D. O., Diaconeasa, Z. M., Pop, O. L., Fărcaș, A. C., Păucean, A., Tofană, M., Pintea, A. (2017) Antioxidant compounds recovered from food wastes. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*, 1 – 21.
146. Stalikas, C. D. (2010) Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. *Methods in Molecular Biology* **610**, 65 – 90.
147. STATISTA (2019) <<https://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>> Pristupljeno 23. srpnja 2019.
148. Sucheta, Rai, S. K., Chaturvedi, K., Yadav, S. K. (2019) Evaluation of structural integrity and functionality of commercial pectin based edible films incorporated with corn flour, beetroot, orange peel, muesli and rice flour. *Food Hydrocolloids* **91**, 127 – 135.
149. Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, Ooi, K. L. (2011) Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis* **24**, 1 – 10.
150. Sürmen, Y., Demirbaş, A., (2003) Cofiring of biomass and lignite blends: resource facilities;

- technological and environmental issues. *Energy Source* **25**, 175 – 187.
151. Taha, N. A., Al-wadaan, M. A. (2011) Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: a review. *African Journal of Microbiology Research* **5**, 5796 – 5805.
152. Tamer, C. E., Çopur, Ö. U. (2014) Development of value-added products from food wastes. *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*, 453 – 475.
153. Tran, T. N., Athanassiou, A., Basit, A., Bayer, I. S. (2017) Starch-based bio-elastomers functionalized with red beetroot natural antioxidant. *Food Chemistry* **216**, 324 – 333.
154. Tran, T. N., Heredia-Guerrero, J. A., Mai, B. T., Ceseracciu, L., Marini, L., Athanassiou, A., Bayer, I. S. (2017) Bioelastomers based on cocoa shell waste with antioxidant ability. *Advanced Sustainable Systems*, 1 – 11.
155. Ulusoy, Y., Ulukardeşler, A.H., Ünal, H., Alibaş, K. (2009) Analysis of biogas production in Turkey utilising three different materials and two scenarios. *African Journal of Agricultural Research* **4**, 996 – 1003.
156. Verma, N., Bansal, M. C., Kumar, V. (2011) Pea peel waste: A lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *BioResources* **6**, 1505 – 1519.
157. Vinay, D. (2018) Nutritional evaluation of pea peel and pea peel extracted byproducts. *International Journal of Food Science and Nutrition* **3**, 65 – 67.
158. Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. (1998) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 3630 – 3634.
159. Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2016) Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Research International* **89**, 565 – 573.
160. Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011) Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products* **34**, 1173 – 1181.

161. Vu, H. T., Scarlett, C. J., Vuong, Q. V. (2019) Changes of phytochemicals and antioxidant capacity of banana peel during the ripening process; with and without ethylene treatment. *Scientia Horticulturae* **253**, 255 – 262.
162. Vulić, J. J., Čebović, T. N., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S., Čanadanović, V. M., Djilas, S. M., Tumbas Šaponjac, V. T. (2013) *In vivo* and *in vitro* antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *Journal of Functional Foods* **6**, 168 – 175.
163. Wang, X., Zhao, M., Su, G., Cai, M., Zhou, C., Huang, J., Lin, L. (2014) The antioxidant activities and the xanthine oxidase inhibition effects of walnut (*Juglans regia* L.) fruit, stem and leaf. *International Journal of Food Science & Technology* **50**, 233 – 239.
164. Yang, J., Qiu, K. (2010) Preparation of activated carbons from walnut shells via vacuum chemical activation and their application for methylene blue removal. *Chemical Engineering Journal* **165**, 209 – 217.
165. Yangilar, F. (2015) Effects of green banana flour on the physical, chemical and sensory properties of ice cream. *Food Technology and Biotechnology* **53**, 315 – 323.
166. Zhang, H., Tsao, R. (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* **8**, 33 – 42.
167. Žitňanová, I., Ranostajová, S., Sobotová, H., Demelová, D., Pecháň, I., Ďuračková, Z. (2006) Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. *Biologia* **61**, 279 – 284.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Marija Doanles

ime i prezime studenta