

# Priprema jestivog biofilma od kitozana i gume arabike s dodatkom ekstrakta sjemenki grožđa

---

**Bionda, Helena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:952030>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET U ZAGREBU

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Helena Bionda  
1379/PI

**PRIPREMA JESTIVOG BIOFILMA  
OD KITOZANA I GUME ARABIKE  
S DODATKOM EKSTRAKTA  
SJEMENKI GROŽĐA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za pakiranje hrane na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marija Ščetara, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Mie Kurek.

*Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Mariju Ščetar na prihvaćenom mentorstvu te stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade rada. Hvala na strpljenju i razumijevanju za situacije koje su se dogodile tijekom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala i doc.dr.sc. Miji Kurek na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela.*

*Hvala bratu Filipu na ogromnom strpljenju i pomoći pri rješavanju tehničkih poteškoća.*

*I na kraju, mojoj obitelji i prijateljima te svima koji su vjerovali u mene i bili mi podrška tijekom studija od srca, najiskrenije hvala! Bez vas bi svaki pad bio teži, a svaki uspjeh manji.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za pakiranje hrane

Diplomski rad

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### PRIPREMA JESTIVOG BIOFILMA OD KITOZANA I GUME ARABIKE S DODATKOM EKSTRAKTA SJEMENKI GROŽĐA

*Helena Bionda, 1379/PI*

**Sažetak:** *S ciljem smanjenja ekološkog problema nastalog sporom razgradnjom plastike, istraživanja se usmjeravaju prema pronalasku alternativnog pakiranja. Jestivi filmovi predstavljaju dobru alternativu plastičnoj ambalaži. U ovom radu pripremljeni su kompozitni jestivi biofilmovi sačinjeni od kitozana i gume arabike. Dio filmova obogaćen je ekstraktom sjemenki grožđa. Ekstrakt sjemenki grožđa sadrži visok udio polifenola te ima antioksidativno, antiupalno, antikancerogeno i bakteriostatsko djelovanje. Film s ekstraktom sjemenki grožđa ima veću debljinu, bolju transparentnost i pruža bolju barijeru prema vodenoj pari u odnosu na film bez ekstrakta, ali i neočekivano manju topljivost u vodi. Udio ukupnih fenola se povećao s dodatkom veće količine ekstrakta sjemenki grožđa u film.*

**Ključne riječi:** *jestivi biofilm, kitozan, guma arabika, ekstrakt sjemenki grožđa, polifenoli*

**Rad sadržava:** 57 stranica, 12 slika, 6 tablica, 109 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Mario Ščetar

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Mia Kurek

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. *Mia Kurek*
2. Doc. dr. sc. *Mario Ščetar*
3. Doc. dr. sc. *Maja Repajić*
4. Prof. dr. sc. *Verica Dragović Uzelac* (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Food Packaging

Graduate Thesis

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### PREPARATION OF EDIBLE BIOFILM FROM CHITOSAN AND GUM ARABIC WITH ADDITION OF GRAPE SEEDS EXTRACT

*Helena Bionda, 1379/PI*

**Abstract:** *In order to reduce the environmental problem caused by the slow plastic decomposition, nowadays research is mostly focused on finding alternative packaging. Edible films are good alternative for plastic packaging. In this research, composite edible films were made from chitosan and gum arabic. Part of the films are enriched with grape seed extract. Grape seed extract contains a high content of polyphenols and has antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and bacteriostatic activity. The film prepared with grape seed extract has a greater thickness, better transparency and provides a better barrier to water vapor compared to the film without the extract, but also unexpectedly less solubility in water. The proportion of total phenols values increased with the addition of a larger amount of grape seed extract to the film.*

**Keywords:** *edible biofilm, chitosan, gum arabic, grape seed extract, polyphenols*

**Thesis contains:** 57 pages, 12 figures, 6 tables, 109 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Mario Ščetar, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD. Mia Kurek, Assistant professor

**Reviewers:**

1. PhD. *Mia Kurek*, Assistant professor
2. PhD. *Mario Ščetar*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
4. PhD. *Verica Dragović Uzelac*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 28 September 2021

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. JESTIVA AMBALAŽA .....	3
2.1.1. Hidrokoloidi .....	5
2.1.2. Voskovi, lipidi i derivati .....	5
2.1.3. Kompoziti .....	5
2.2. OBLIKOVANJE FILMOVA .....	6
2.3. JESTIVI BIOFILMOVI .....	8
2.3.1. Kitozan .....	10
2.3.1. Guma arabika .....	12
2.3.3. Kompozitni film pripremljen od kitozana i gume arabike .....	13
2.4. AKTIVNO PAKIRANJE I FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI .....	13
2.4.1. Ugradnja bioaktivnih komponenti u jestive filmove .....	14
2.4.2. Ekstrakt sjemenki grožđa kao izvor funkcionalnih svojstava .....	15
2.5. SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA .....	17
2.5.1. Fizikalno-kemijska svojstva .....	17
2.5.1.1. Debljina jestivih filmova .....	17
2.5.1.2. Topljivost i udio vode jestivih filmova .....	18
2.5.2. Mehanička svojstva .....	18
2.5.3. Optička svojstva .....	18
2.5.4. Barijerna svojstva .....	19
2.5.4.1. Propusnost plinova i vodene pare .....	19
2.6. ZAKONSKA REGULATIVA O JESTIVIM FILMOVIMA I PREMAZIMA .....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
3.1. MATERIJALI .....	23
3.2. PRIPREMA FILMOVA .....	23
3.2. METODE .....	26
3.2.1. Debljina filmova .....	26
3.2.2. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz biopolimerni film .....	26
3.2.3. Određivanje boje biopolimernog filma .....	27
3.2.4. Mjerenje transparentnosti biopolimernog filma .....	29
3.2.5. Određivanje topljivosti biopolimernog filma u vodi .....	29
3.2.6. Mjerenje pH vrijednosti otopina biopolimera .....	30
3.2.7. Mjerenje viskoznosti otopine biopolimera .....	30
3.2.8. Određivanje ukupnih fenola u otopini biopolimera .....	31



3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
4.1. DEBLJINA FILMOVA.....	35
4.2. PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU .....	36
4.3. BOJA JESTIVIH FILMOVA.....	37
4.4. TRANSPARENTOST BIOPOLIMERNOG FILMA .....	38
4.5. TOPLJIVOST BIOPOLIMERNIH FILMOVA U VODI .....	39
4.6. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI FILMOGENIH OTOPINA .....	40
4.7. VISKOZNOST BIOPOLIMERNIH FILMOVA .....	41
4.8. UDIO UKUPNIH FENOLA U BIOPOLIMERNIM FILMOVIMA.....	42
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>46</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>58</b>

# 1. UVOD

Pakiranje hrane, iako posljednji, jedan je od najbitnijih koraka u procesu proizvodnje hrane. Pakiranjem hranu osiguravamo od mikrobiološkog zagađenja i mehaničkih oštećenja, od nepoželjnog utjecaja vlage, kisika i svjetlosti te joj tako produljujemo rok trajnosti i osiguravamo da zdravstveno sigurna i senzorski ispravna hrana stigne do krajnjeg potrošača.

Ambalažni materijali za pakiranje hrane mogu biti: staklo, papir, metal, keramika, plastika te složeni (kombinirani) materijali. Zbog izuzetno dobrih svojstava poput lakog oblikovanja, nepropusnosti na plinove, vodenu paru, svjetlost, arome i masnoće, postojanosti na visokim odnosno niskim temperaturama i vrlo lakog oblikovanja te izrazito niske cijene, plastika je najzastupljenija vrsta ambalažnog materijala. Danas na tržištu postoji više od 900 vrsta plastičnih masa (Fuk, 2019). Iako je plastika izvrstan ambalažni materijal, s druge strane ona zbog neracionalnog korištenja i nepropisnog odlaganja zagađuje okoliš. Razgradnja plastike traje nekoliko stotina pa i do tisuću godina. Nakon što završi u prirodi, plastika podliježe različitim procesima degradacije te dolazi do njezinog usitnjavanja, čime nastaje mikroplastika koju organizmi poput riba unose u prehrambeni lanac i koja u konačnici završava u tijelu čovjeka (Bule i sur., 2020). Također, pretpostavlja se da će se do 2050. godine u morima i oceanima nalaziti više plastike nego ribe (Wang i sur., 2019).

To sveukupno predstavlja veliki globalni i ekološki problem. Stoga pojava jestive ambalaže na tržištu predstavlja alternativu plastičnoj ambalaži. Jestiva ambalaža se proizvodi od prirodnih materijala i štiti proizvod od nepoželjnog utjecaja vlage i plinova, mikrobiološkog zagađenja te istovremeno produžava rok trajnosti prehrambenih proizvoda. Najveća prednost jestive ambalaže je ta što se ona zajedno s proizvodom jede te se na taj način smanjuje količina otpada koja bi nastala kada bi proizvod pakirali u plastičnu ambalažu. Osim toga, razvoj jestive ambalaže motiviran je s više drugih aspekata: (i) nutritivni (smanjuje se transfer vlage kod heterogenih proizvoda); (ii) ekonomski (smanjuju se ukupni troškovi pakiranja); (iii) marketinški (stvaraju se novi proizvodi - "različiti" od drugih) (Hun i Gennadios, 2005). Jestivi se filmovi mogu obogatiti različitim bioaktivnim tvarima te tako dobivaju obilježja funkcionalne hrane. Bogat izvor bioaktivnih tvari je komina grožđa, odnosno ekstrakt sjemenki grožđa. Ekstrakt sjemenki grožđa ima antioksidacijsko, antimikrobno, antiupalno i antibakterijsko djelovanje zbog sadržaja bioaktivnih tvari - polifenola.

Ciljevi ovog diplomskog rada bili su:

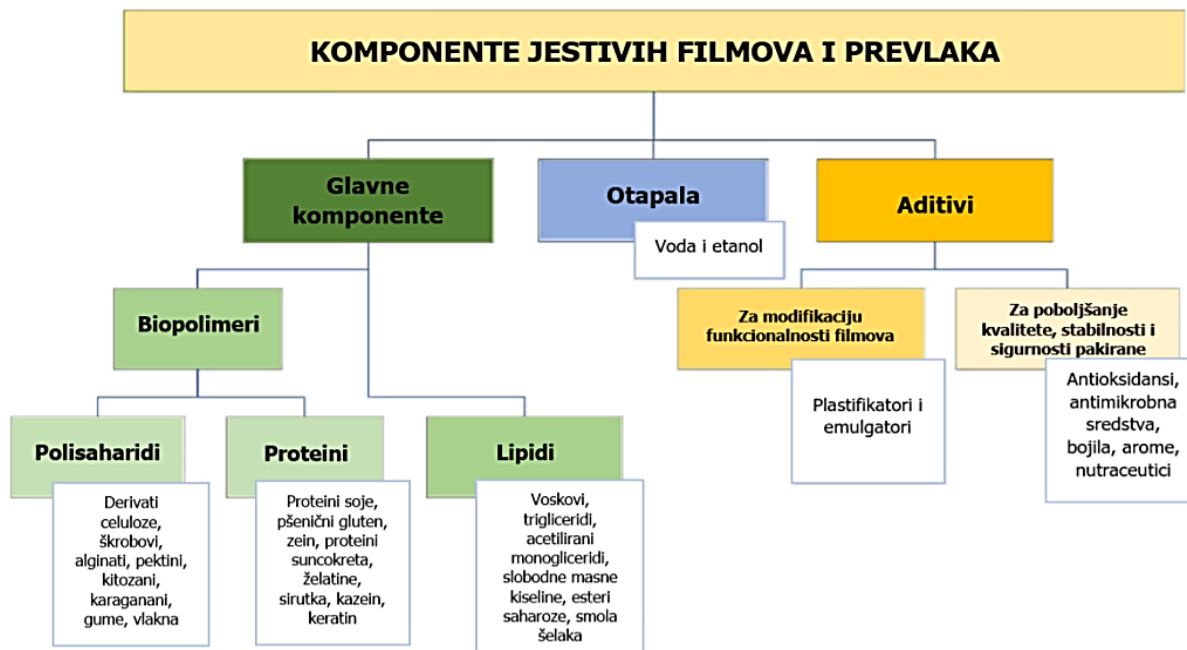
- Priprema jestivih kompozitnih biofilmova upotrebom kitozana i gume arabike
- Dodatak ekstrakta sjemenki grožđa u biofilmove
- Karakterizacija i usporedba fizikalno–kemijskih svojstva pripremljenih biofilmova s i bez ekstrakta sjemenki grožđa

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. JESTIVA AMBALAŽA

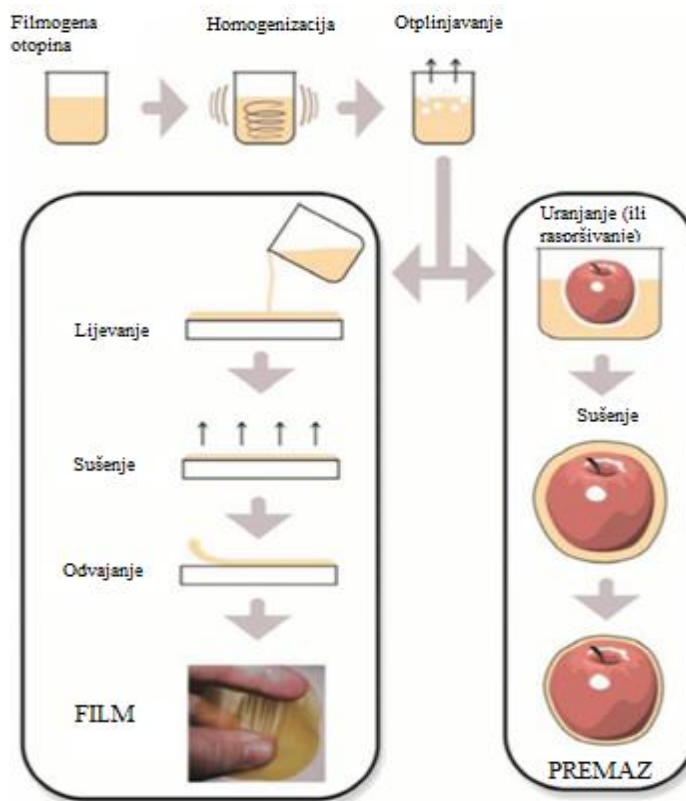
Današnji potrošač zahtjeva minimalno procesiranu hranu, bez umjetnih aditiva i konzervanasa, sa što duljim rokom trajanja i poželjnih senzorskih karakteristika. Također, zbog sve veće osviještenosti potrošača o štetnosti plastike na okoliš, porasla je potražnja za biorazgradivim i ekološkim materijalima. To je utjecalo na pojavu inovativnih tehnika pakiranja u prehrambenoj industriji pa tako danas postoji jestiva i biorazgradiva ambalaža. Iako je postupak prevlačenja hrane bilo voskovima ili želatinom patentiran daleke 1800. godine (Galić, 2009), jestivi se biofilmovi rijetko nalaze u komercijalnoj primjeni. Razlog tomu je što nejestiva ambalaža pruža bolju zaštitu proizvodu u odnosu na jestivu.

Jestiva se ambalaža proizvodi od jestivih komponenti koje moraju biti odobrene za ljudsku konzumaciju od strane službenih institucija za sigurnost hrane i materijala u dodiru s hranom; u Europskoj uniji tu funkciju obavlja Europska agencija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*), a u Americi Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*). Moguće komponente jestivih filmova i prevlaka prikazane su na slici 1.



Slika 1. Komponente jestivih filmova i prevlaka (Salgado i sur., 2015)

Razlikujemo dvije vrste jestive ambalaže: jestivi premazi i jestivi biofilmovi. Glavna razlika između jestivog premaza i biofilma je u načinu nanošenja na proizvod. Jestivi premaz nastaje izravnim nanošenjem otopine na proizvod postupkom uranjanja, prskanja ili premazivanja, te se zatim suši pri čemu nastaje tanki sloj premaza na površini proizvoda. Pod pojmom jestivi biofilm podrazumijevamo suhi film koji nastaje sušenjem otopine na supstratu. Nakon sušenja se film odvaja od supstrata i nanosi na proizvod kojeg želimo zaštititi. Shematski prikaz nastajanja jestivog filma i jestivog premaza prikazan je na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz nastajanja jestivog filma i jestivog premaza (Otoni i sur., 2017)

Temeljeno prema materijalu od kojega je izgrađen, jestivi filmovi se dijele na (prema Skurtys i sur., 2010):

- Hidrokoloide koji se rade iz proteina i polisaharida
- Lipide
- Kompozite, tj. kombinacije različitih materijala, npr. hidrokoloida i lipida

### 2.1.1. Hidrokoloide

Hidrokoloide materijali korišteni u proizvodnji jestivih filmova definirani su kao hidrofilni polimeri biljnog, životinjskog, mikrobnog ili sintetskog podrijetla (Dhapanal i sur., 2012). Zajedničko svojstvo svih hidrokoloida je veliki afinitet vezanja vode zbog prisutnosti hidroksilnih skupina. Hidrokoloide su dispergirani u prisutnosti vode te formiraju sustav koji nije niti prava otopina niti suspenzija, nego nešto između toga, a pokazuje svojstva koloida (Milani i Maleki, 2012). Hidrokoloide dijelimo na proteinske i polisaharidne filmove, a materijali od kojih se proizvode su navedeni u tablici 1.

Ovakvi filmovi pokazuju dobru zaštitu protiv oksidacije lipida i drugih osjetljivih sastojaka hrane, dok im je svojstvo zaštite od vlage ograničeno (Milani i Maleki, 2012). Kako bi se taj nedostatak izbjegao, svojstva proteina se poboljšavaju kemijskim, fizikalnim i enzimskim procesima te kombiniranjem s hidrofobnijim materijalima (Bourtoom, 2009).

### 2.1.2. Voskovi, lipidi i derivati

Lipidi koji se mogu koristiti za jestive premaze i filmove su trigliceridi, acetilirani monogliceridi, masni alkoholi, saharozni esteri masnih kiselina, masne kiseline (Schellhammer i Krochta, 1997; Martin-Polo i sur., 1992) i ulja (biljna, životinjska i mineralna) (Baldwin i sur., 1995 a,b). Lipidni jestivi premazi i filmovi su hidrofobni, a u usporedbi s ostalim jestivim prevlakama i filmovima pružaju bolju zaštitu od utjecaja vlage. Tako npr. navodi se da je permeacija vode kroz film od pčelinjeg voska deseterostruko manja u odnosu na permeaciju vode kroz lecitinske ili acetostearinske filmove, odnosno 25 puta manja u odnosu na uljne i 100-200 puta manja od propusnosti kroz kazeinske ili pektinske filmove (Galić, 2009). Dodatak lipida u proteinske ili polisaharidne emulzije može poboljšati njihova fizikalna svojstva (Galus i Kadzińska, 2016). Glavni nedostatak masnih prevlaka je sklonost užeglosti i masna površina (Galić, 2009) te posjeduju loša organoleptička svojstva (voštani okus).

### 2.1.3. Kompoziti

Kompoziti su složeni filmovi proizvedeni od dvije ili više različitih komponenti s ciljem uklanjanja ili smanjivanja negativnih svojstava pojedinačnih materijala. Neke od kombinacija koje se ispituju su škrob i alginati, škrob i guma, dekstrin i polisaharidne želatine, pektin i želatina, itd. Primjerice, kombinacijom lipidnog s hidrofilnijim materijalom mogu se smanjiti loša mehanička i organoleptička svojstva lipida, a poboljšati slaba barijera hidrofilnih materijala prema vlazi.

Tablica 1. Materijali za izradu jestivih filmova i premaza (Galić, 2009)

<b>Funkcionalni sastav</b>	<b>Materijali</b>	
Materijali za izradu filmova	Proteini	Kolagen, želatina, kazein, proteini sirutke, zein, pšenični gluten, proteini bjelanjka
	Polisaharidi	Škrob, modificirani škrob, modificirana celuloza (CMC, MC, HPC, HPMC)*, alginat, karagenan, pektin, pululan, kitozan, gelan guma, ksantan guma
	Voskovi, lipidi	Voskovi (pčelinji vosak, parafin, karnauba vosak), smole (šelak), acetogliceridi
Plastifikatori (omekšavala)	Glicerin, propilen glikol, sorbitol, saharoza, polietilen glikol, kukuruzni sirup, voda	
Funkcionalni aditivi	Antioksidansi, antimikrobne tvari, nutrijenti, nutraceutici, tvari okusa i boje	
Ostali aditivi	Emulgatori (lecitin), tekuće emulzije (jestivi voskovi, masne kiseline)	

\*CMC - karboksimetil celuloza, MC - metil-celuloza, HPC - hidroksipropil celuloza, HPMC - hidroksipropilmetil-celuloza

## 2.2. OBLIKOVANJE FILMOVA

Iako postoji veliki broj različitih kombinacija biopolimera, s različitim fizikalno-kemijskim i mehaničkim svojstvima te raznovrsnim dodacima, jestivi se filmovi mogu nanijeti na proizvod pomoću nekoliko različitih tehnika. U takvim sustavima, hrana – jestivi film, djeluju dvije vrste sile. To su sile kohezije i sile adhezije. Sile kohezije djeluju među polimernim molekulama od kojih je sačinjen film, a sile adhezije djeluju između filma i supstrata odnosno hrane. Sile kohezije i adhezije ovise o strukturi i kemijskoj građi polimera (molekulska masa, pravilnost lančane strukture, razgranatost strukture, polarnost i raspodjela polarnih skupina uzduž polimernog lanca) (Galić, 2009). Što je stupanj uređenosti polimernog lanca veći, to će krutost i kohezivnost filma biti bolja. Prilikom izrade filma preporuča se upotreba toplih otopina, ali važno je paziti na temperaturu otopine. Previsoka ili preniska temperatura otopine može uzrokovati nastanak

nekohezivnog i rupičastog filma ili može dovesti do ljuštenja filma. Odabir tehnike za izradu filma ovisit će o vrsti filma, ali i o svojstva filma koje želimo dobiti.

Tehnike koje se primjenjuju za izradu jestivih filmova su:

1. Ekstruzija
2. Lijevanje otopine jestivog filma
3. Premazivanje
4. Prskanje
5. Uranjanje

### **2.2.1. Ekstruzija**

Ekstruzija je kontinuirani, učinkovit i ekonomski prihvatljiv proces, pogodan za proizvodnju većih količina jestivih filmova (Garcia i sur., 2016). Postupak se temelji na termoplastičnim svojstvima polimera. U polimer se dodaju plastifikatori, punila, stabilizatori, maziva i drugi aditivi kako bi dobili proizvod s željenim svojstvima. Sastojci se pomoću jednog ili dva vijka postavljenih u cijevi guraju prema naprijed u kućište ekstrudera. Uslijed rotacije vijaka dolazi do postupnog povećanja tlaka i temperature te tako dolazi do sabijanja i miješanja sastojaka. Prilikom izlaska proizvoda dolazi do ekspanzije. U ovom je postupku važno kontrolirati ključne parametre poput brzine uvlačenja, brzine vrtnje, konfiguracije vijka, omjera duljine i promjera vijka, temperatura i oblik cijevi, itd. Filmovi proizvedeni postupkom ekstruzije pokazuju bolja mehanička, barijerna i mikrostrukturalna svojstva u odnosu na filmove dobiveni lijevanjem (Hernandez-Izquierdo i sur., 2008).

### **2.2.2. Lijevanje otopine jestivog filma**

Lijevanje je najčešći postupak proizvodnje hidrokoloidnih filmova. Postupak se temelji na lijevanju otopine filma na prikladnu podlogu te se zatim suše u konvekcijskoj pećnici na određenoj temperaturi kroz određeno vrijeme. Sušenjem otapalo isparava i dobivamo film u krutom obliku. Poželjno je sušiti film do udjela vlage 5-10 % m/v. U ovom postupku važno je odabrati prikladni supstrat kako bi se film nakon sušenja mogao odvojiti od podloge bez oštećenja. Konačan izgled i svojstva filma ne ovise samo o uvjetima sušenja (relativna temperatura i vlažnost zraka) već ovise i o sastavu otopine za lijevanje te debljini mokrog lijevanja.



### **2.2.3. Premazivanje**

Premazivanje je postupak ručnog nanošenja otopine filma pomoću četke na željeni proizvod. Film nastaje skrućivanjem na sobnoj temperaturi ili sušenjem na povišenoj temperaturi. Premazivanje se pokazalo boljim od postupka uranjanja ili omatanja u smislu smanjenja gubitka vlage u proizvodu koji se želi zaštititi (Pamuković, 2017).

### **2.2.4. Prskanje**

Prskanje ili raspršivanje je najčešća tehnika koja se koristi za oblikovanje jestivog premaza (Skurtys i sur., 2010). Definira se kao postupak jednolikog nanošenja otopine filma sustavom raspršivanja na proizvod velike površine. Ovaj postupak nije pogodan za viskozne otopine jer se one teško ili uopće ne raspršuju. Sprej izlazi iz mlaznice kao dvodimenzionalni list tekućine koji se razbija u seriju cilindričnih vrpca (Novak, 2015) te tako nastaje tanki sloj filma s minimalnom količinom vode na proizvodu. Ova tehnika zahtjeva okretanje proizvoda kako bi se film nanio sa svih strana proizvoda.

### **2.2.5. Uranjanje**

Uranjanje je postupak u kojem jestivi premaz nastaje potapanjem proizvoda u jestivu otopinu te naknadnim cijeđenjem. Postupak potapanja traje 5-30 sekundi, a obično se primjenjuje za namirnice nepravilnog oblika i kada je otopina filma vrlo viskozna. Kod ovakvog načina nanošenja filma debljina i pokrivenost filmom mogu biti manje jednolični nego kod ostalih postupaka (Pamuković, 2017).

## **2.3. JESTIVI BIOFILMOVI**

Jestivi zaštitni filmovi mogu se definirati kao tanki sloj materijala koji potrošač može konzumirati, a koji osigurava barijeru prema plinovima i vodenoj pari (Galić, 2009; Robertson, 2006; Laohakunjit i Noomhorm, 2004; Park i Chinnan, 1995; Gennadios i sur., 1994a, 1994b; Gennadios i sur., 1993; Greener i Fennema, 1989).

Jestivi filmovi osim zaštitne uloge, mogu poboljšati kvalitetu hrane, njenu trajnost i funkcionalnost. Mogu se koristiti kao sloj između komponenti hrane ukoliko se radi o heterogenoj hrani ili se filmom može u potpunosti prekriti cijeli proizvod. Od suvremenih zaštitnih filmova zahtijeva se: (i) odgovarajuća barijera prema vlazi; (ii) dobra barijera na kisik; i (iii) dobra

mehanička i organoleptička svojstva (Galić, 2009). Važno je osigurati da film tijekom prerade i skladištenja zadrži željena svojstva. Kako bi se to osiguralo, u filmove se mogu dodati plastifikatori, arome, antimikotne tvari ili antioksidansi. Poželjno je da oni u međusobnim interakcijama ne mijenjaju organoleptička svojstva samog proizvoda, a budući se uglavnom koriste u malim koncentracijama, smatra se da je taj utjecaj uglavnom zanemariv (Zhao i McDaniel, 2005).

Primjena jestivih filmova uglavnom je ograničena na prehrambene proizvode s niskim ili srednjim udjelom vlage, kao i na smrznute proizvode (Galić, 2009). Proizvode koji su pakirani u jestivu ambalažu je potrebno zaštititi nejestivim ambalažnim slojem kako bi se očuvala svojstva zaštitnog filma i kvaliteta samog upakiranog proizvoda. Primjena jestivih filmova mora biti odabrana prema specifičnoj namirnici, vrsti prehrambenog proizvoda i glavnom mehanizmu smanjenja kvalitete proizvoda (Peterson i sur., 1999). Neki od primjera primjene jestivih filmova prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Primjena jestivih filmova (Galić, 2009)

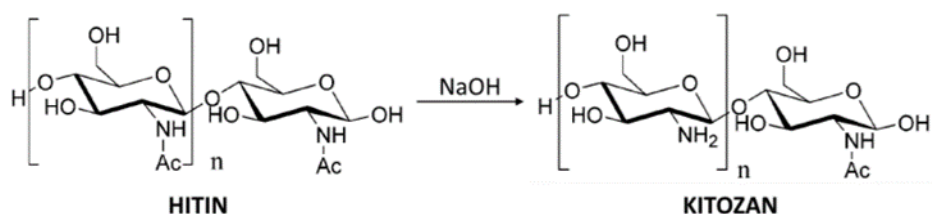
<b>Svrha</b>	<b>Željena kvaliteta</b>	<b>Primjene</b>
<b>Zaštita od vlage i kisika</b>	Dobra svojstva prevlačenja, niska propusnost na vodenu paru i kisik (mogući dodatak antioksidansa)	Svježa riba, sir, meso, mesni proizvodi; hrana srednjeg sadržaja vlage; suha hrana, orasi, suhi pekarski proizvodi, grickalice
Usporavanje mikrobnog kvarenja izvana	Dodatak antimikrobnih agenasa	Hrana srednjeg sadržaja vlage
Kontrola ravnoteže vlage unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu	Heterogeni proizvodi (pite, pizze, kolači), sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Kontrola migracije otopine, boja, arome unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu i otapala	Usalamureni smrznuti proizvodi (škampi, rakovi i sl.)

Poboljšanje mehaničkih svojstava tijekom rukovanja	Dobra adhezivnost i kohezivnost	Restrukturirani mesni i riblji proizvodi, mehanički otkošteno meso; liofilzirane porcije hrane ili porcije suhe hrane
Osiguranje adhezivnosti smjese za paniranje tijekom prženja	Dobra adhezivnost	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Sprečavanje migracije vlage pri nanošenju prevlake maslaca i krušnih mrvica u procesu paniranja	Dobra adhezivnost i niska propusnost na vodu	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Zaštita većeg broja manjih komada hrane (pakiranih u vrećice ili šalice)	Niska propusnost na vodu; ne smije biti ljepljiv	Sir, procesirane kockice sira, voće srednjeg sadržaja vlage; smrznuta hrana; sladoled; proizvodi veličine jednog zalogaja

### 2.3.1. Kitozan

Kitozan (poli[ $\alpha\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza] je linearni kopolimer. Izgrađen je od dvije vrste ponavljajućih monomernih podjedinica N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza (acetilirana podjedinica) i 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza (deacetilirana podjedinica) (Carneiro-da-Cunha i sur., 2010) koje su međusobno povezane  $\alpha$ -(1→4) glikozidnim vezama. Kitozan je derivat hitina koji se dobiva kemijskim putem, reakcijom N-deacetilacije hitina uz prisutnost lužine. Reakcija dobivanja kitozana prikazana je na slici 3. Kitozan je otkriven 1859. godine (Martinac i Filipović-Grčić, 2002) kada je francuski kemičar Charles Rouget kuhajući hitin u koncentriranom kalijevu hidroksidu dobio tvar koja je bila topljiva u razrijeđenim kiselim otopinama.

Za razliku od hitina, kitozan je pogodan za tvorbu biofilмова, biorazgradiv i biokompatibilan (Vuillemin i sur., 2019). Osim toga, kitozan posjeduje antioksidativnu (Ngo i Kim, 2014; Ojagh i sur., 2010) i antimikrobnu aktivnost prema velikom broju patogenih mikroorganizama, uključujući gljive (kvasce i plijesni), Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (van den Broek i sur., 2015; Friedman i Juneja, 2010; Kong i sur., 2010). Zbog svega navedenoga, kitozan je prepoznat kao potencijalni prirodni konzervans.



Slika 3. Dobivanje kitozana iz hitina (Rabea, 2003)

Postoji nekoliko teorija s kojima se nastoji objasniti mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana. Najprihvaćenija teorija govori o elektrostatskoj interakciji između protonskih amino grupa ( $\text{NH}^+$ ) glukozamina na okosnici kitozana i stanične membrane mikroorganizama koja ima negativni naboj zbog fosfatnih skupina u fofolipidima, aminokiselina i različitih lipopolisaharida (Mousavi Khaneghah i sur., 2018; Elsabee i Abdou, 2013). Interakcija uzrokuje promjene u permeabilnosti membrane što dovodi do poremećaja u transportu nutrijenata i proteina što u konačnici dovodi do smrti stanice mikroorganizma. Druga teorija objašnjava da kitozan reagira sa staničnom DNA mikroorganizma te tako sprječava DNA transkripciju, RNA translaciju i sintezu proteina (Sharif i sur., 2018; Verlee i sur., 2017; Raafat i Shal, 2009). Zapravo, kitozan je zajednički naziv za sve deacetilirane oblike hitina, koji se međusobno razlikuju po stupnju deacetilacije i molnoj masi, a gotovo sva funkcionalna svojstva kitozana ovise upravo o duljini polimernog lanca te o gustoći i raspodjeli naboja (Martinac i Filipović-Grčić, 2002). Na tržištu ga možemo pronaći u obliku otopine, praška, kuglica ili vlakana, a koristi se u biomedicini, prehrambenoj i kemijskoj industriji.

Čisti kitozanski filmovi su obično kohezivni i kompaktni, dok im je površina glatka, bez pora i pukotina (Skurtys i sur., 2010), ali su slabo propusni za plinove ( $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$ ) i imaju veliku

propusnost vodene pare. Kako bi se poboljšala zaštitna svojstva propusnosti vode u kitozanske filmove se često inkorporiraju različite hidrofobne komponente (Bourbon i sur., 2011).

### 2.3.1. Guma arabika

Guma arabika je prirodni polisaharid koji se dobiva iz stabljike i grana akacija drveća (*Acacia Senegal* i *Acacia Seyal*), a sastoji se od polisaharida i glikoproteina. Guma arabika sadrži tri različite frakcije: 85-90 % čini arabinogalaktan, 10 % arabinogalaktan - protein kompleks i 2 % čini jedan ili dva glikoproteina (Lopez-Torrez i sur., 2015). Frakcije gume arabike s većim sadržajem proteina koji su odgovorni za površinsku aktivnost gume arabike, prisutne su u većoj količini u gumi arabici izoliranoj iz *Acacia Senegal* u odnosu na gumu arabiku dobivenu iz *Acacia Seyal* (Lopez-Torrez i sur., 2015). Na sastav gume arabike utječe puno čimbenika poput: podrijetla, klime, sezoni žetve, starosti stabla i uvjetima proizvodnje (npr. sušenje) (Mariod, 2018).

Guma arabika ima široku primjenu zbog visoke topljivosti i niske viskoznosti pri visokim koncentracijama (Sakloestsakun i sur., 2015) te djeluje kao ulje-voda emulgator (Vuillemin i sur., 2019). Brzo se topi u hladnoj ili toploj vodi te ju to svojstvo čini najtopljivijim hidrokoloidom (Chranioti i Tzia, 2014; Nie i sur., 2013; Desplanques i sur., 2012). U prehrambenoj se industriji guma arabika koristi kao stabilizator, a dodijeljen joj je E broj 414. Koristi se u proizvodnji sokova za razrjeđivanje, gumenih slatkiša poput gumenih bombona, i sljezovih kolačića, čokoladnih slatkiša i jestivih šljokica (Mariod, 2018). Nadalje, guma arabika se koristi kao emulgator i sredstvo za zgušnjavanje glazure, punila, žvakaćih guma i drugih slastičarskih proizvoda (Rinsky i Rinsky, 2009). Chung i suradnici (2016) su proveli istraživanje o utjecaju gume arabike na stabilnost antocijana u komercijalnim pićima. Ispitali su degradaciju koncentracije antocijana u pićima s  $\alpha$ -askorbinskom kiselinom tijekom skladištenja na svjetlu kroz 5 dana pri 40 °C (reakcija prvog reda). Rezultati su pokazali da dodatak gume arabike značajno povećava stabilnost antocijana. Drugo istraživanje su proveli Idham i suradnici (2012), koji su mikroinkapsulirali antocijane u kombinaciji s maltodekstrinom i gumom arabikom te promatrali degradaciju pigmenta. Rezultati ovog istraživanja su pokazala da kombinacija navedenih materijala osigurava najmanje promjene u pigmentu boje tijekom skladištenja. Stoga možemo zaključiti da se guma arabika može koristiti kao stabilizator boje. Novija istraživanja pokazuju da se guma arabika može koristiti kao antikorozivni materijal, posebice u vodenim elektrolitima. Zbog sadržaja različitih

polarnih grupa bogatih elektronima, guma arabika se lako adsorbira na površinu metala i ponaša kao učinkoviti antikorozivni materijal (Verma i Quarashi, 2021).

### 2.3.3. Kompozitni film pripremljen od kitozana i gume arabike

Kako bi se smanjili nedostaci filmova napravljenih od pojedinačnih komponenti, došlo je do razvoja kompozitnih filmova. Kompozitni film sačinjen od kitozana i gume arabike posjeduje poželjna ambalažna svojstva (Rao i sur., 2010). Kitozan je pozitivno nabijeni polisaharid dok je guma arabika negativno nabijen polisaharid-protein kompleks s izvrsnim emulgirajućim svojstvima (Shi i sur., 2017). Kompozitni film nastaje zbog vodikovih veza, elektrostatskih i hidrofobnih interakcija između kitozana i gume arabike uslijed suprotno nabijenih polova. Tehnika kojim film nastaje naziva se ionsko geliranje. U postupku ionskog geliranja polisaharidi (alginat, gelan i pektin) se otapaju u vodi ili u slabo kiselom mediju, pri čemu se otopina polisaharida zatim ukapava uz konstantno miješanje u otopinu koja sadrži ione, najčešće katione suprotnog naboja (Blažanin, 2015) te nastaje polielektrolitni kompleks. Glavna prednost ionskog geliranja je visok stupanj zaštite inkapsulirane tvari u sustav nosača i duže zadržavanje njene aktivnosti u formiranoj čestici (Vugrinec, 2018). Faktori koji utječu na učinkovitost inkapsulacije te veličinu i oblik hidrogel čestica su koncentracija polimera i otopine iona, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija otopine bioaktivnog sastojka (Racovića i sur., 2009).

## 2.4. AKTIVNO PAKIRANJE I FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI

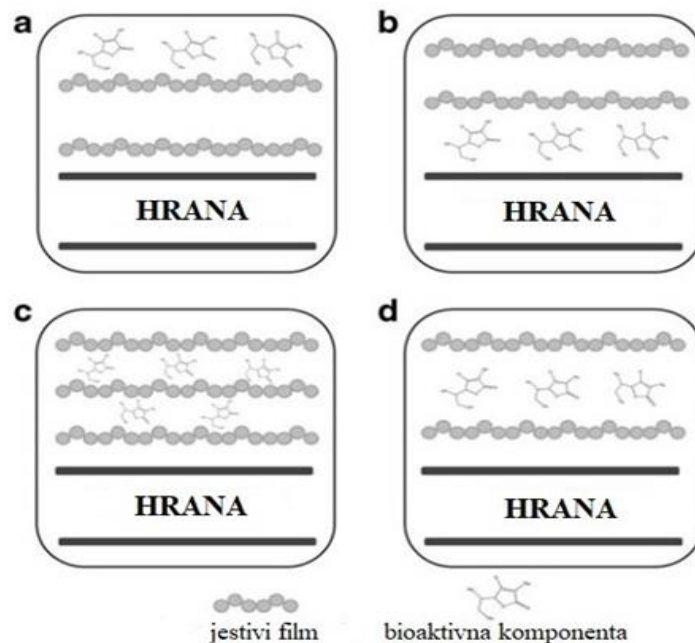
Izraz aktivnog pakiranja prvi put je primijenjen 1987. godine (Jakupić i sur., 2019), a podrazumijeva ambalažni materijal koji otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbira u cilju produljenja roka trajnosti ili održavanja odnosno poboljšavanja uvjeta pakiranja. Aktivna ambalaža, uz inteligentnu, pripada pametnoj ambalaži. Pametna ambalaža je ona ambalaža koja osim temeljne zaštite proizvoda obavlja i druge zadaće (Jakupić i sur., 2019). Aktivna ambalaža ulazi u aktivnu interakciju sa zapakiranim proizvodom te ju zbog toga nazivamo još interaktivna ambalaža. Aktivna tvar može biti (i) umiješana u polimerni materijal, (ii) kao premaz na polimernom materijalu, (iii) u posebnom spremniku unutar pakiranja (npr. vrećica), a ovisno o funkciji koju obavlja razlikujemo: apsorbere kisika, apsorbere ili izračivače ugljikovog dioksida, adsorbere i regulatore vlage, apsorbere etilena, apsorbere UV zračenja, izračivače etanola i antimikrobne tvari. Aktivni materijali koji se koriste ne smiju mijenjati prekrivati proces kvarenja

već ga trebaju spriječiti. Osim u prehrambenoj industriji, aktivna se ambalaža primjenjuje u farmaceutskoj, cvjetnoj te elektroindustriji.

Jestivi filmovi također mogu biti nosioci bioaktivnih tvari te tako pridonose funkcionalnim svojstvima hrane. Odnosno, zbog sadržaja jedne ili više bioaktivnih komponenti jestivi filmovi djeluju pozitivno na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu pa ih možemo nazvati funkcionalni jestivi filmovi. Najčešće korišteni bioaktivni spojevi su antioksidansi, antimikrobne tvari, probiotici i arome (Muranyi, 2013; Ayala-Zavala i sur., 2011). Nekoliko je studija pokazalo da ugradnja bioaktivnih komponenti u jestive filmove, poput antimikrobnih sastojaka, antioksidanasa ili nutraceutika, može poboljšati sigurnost proizvoda, produljiti rok trajnosti te osigurati kvalitetu proizvoda tijekom skladištenja (Ângelo i sur., 2016). Jestivi filmovi predstavljaju funkcionalnu barijeru jer kontrolirano otpuštaju odnosno dozvoljavaju migraciju komponenti s površine, omogućujući da se održi točno određena koncentracija bioaktivnih sastojaka upravo tamo gdje je to potrebno.

#### 2.4.1. Ugradnja bioaktivnih komponenti u jestive filmove

Nedostatak bioaktivnih komponenti je manjkavost okusa, brza razgradnja i interakcija s drugim sastojcima hrane što dovodi do gubitka funkcionalnih svojstava. Kako bi se umanjili takvi nedostaci, bioaktivne komponente se ugrađuju u jestive filmove. Ovisno o prirodi i svrsi bioaktivne tvari mogu se primijeniti četiri različite tehnike ugradnje. Bioaktivna se tvar može ugraditi i) s vanjske strane jestivog filma, ii) na granici sustava hrana - jestivi film, iii) između više slojeva filma, ivi) raspršeno između različitih slojeva filma. Shematski prikaz ugradnje bioaktivne tvari prikazan je na slici 4.



Slika 4. Načini ugradnje bioaktivne komponente u film: a) ugradnja na vanjsku površinu filma, b) u međuprostor između filma i hrane, c) između više slojeva jestivog filma, d) raspršena između različitih dijelova filma (Quirós-Sauceda i sur., 2014)

#### 2.4.2. Ekstrakt sjemenki grožđa kao izvor funkcionalnih svojstava

U procesu proizvodnje vina kod prerade grožđa zaostaje velika količina komine (nusproizvod) čije nepropisno odlaganje predstavlja rizik za okoliš kao površinska i dubinska zagađenja, stoga zbrinjavanje vinarima predstavlja dodatno ekonomsko opterećenje (Moslavac i sur., 2019). Na godišnjoj razini proizvede se oko milijun tona grožđa (lat. *Vitis vinifera* L.), odnosno 20 - 30 % od te količine čini komina. Organski otpad odnosno vinska komina sadrži sjemenke (oko 35 %), pulpu i pokožicu, peteljke te lišće (Teixeira i sur., 2014). Komina je dobar izvor antioksidanasa zbog visokog sadržaja polifenola (Negro i sur., 2003) i bogat izvor dijetalnih vlakana; sadrži visok udio celuloze i nešto manji udio pektina i hemiceluloze (González-Centeno i sur., 2010, Kammerer i sur., 2005). Danas se sve više traže rješenja o kvalitetnom korištenju takvog otpada radi dodatnog porasta ekonomičnosti proizvodnje, stvaranja dodatne vrijednosti kroz razvoj novih proizvoda i da bi se smanjila količina otpada ove vrste (Baydar i Akkurt, 2001). Tako se prerada vinske komine usmjerava u pravcu separacije koštice (20-30 %) te dobivanja biološki aktivnih sastojaka iz ljuske i pogače koštice (Moslavac i sur., 2019).



Ekstrakt sjemenki grožđa i njegova biološka aktivnost su privukle veliku pažnju znanstvenika u cilju pronalaska načina kako da se iskoriste ti vrijedni izvori (Unusan, 2020). Dosadašnja istraživanja su pokazala da ekstrakt sjemenki grožđa sadrži 15 polifenolnih komponenti, od čega je 11 flavan-3-alkohola kao što su: (+)-katehin, epigalokatehin galat, (-)-epikatehin, proantocijanidini B1, proantocijanidini B2, proantocijanidini B3, proantocijanidini B4, B1-3-*O*-galat, B2-3-*O*-galat, B2-3'-*O*-galat i galat C1), 3 flavonola (kaempferol, miristin i kvercetin) i fenolnu kiselinu (galna kiselina) (Rodríguez-Pérez i sur., 2019; Zhao i Lou, 2001). Polifenoli su biološki aktivne tvari koje djeluju blagotvorno na zdravlje i štite od razvoja bolesti, široko su rasprostranjeni u prirodi, a djelotvorni su i u vrlo malim količinama. Imaju znatan utjecaj na boju, okus i miris hrane, a njihov udio i sastav ovisi o svjetlosti, temperaturi, agrotehničkim mjerama, uvjetima dozrijevanja i skladištenja te postupcima obrade i prerade hrane. Aktivni sastojci ekstrakta sjemenki grožđa posjeduju antioksidativno, antiupalno, antikancerogeno, bakteriostatsko i neuroprotektivno djelovanje, snižavaju udio masnoće te djeluju na hipotenziju (Chen i sur., 2020), a pokazuju i inhibicijsko djelovanje prema bakterijama *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella* (Moradi i sur., 2012; Perumalla i Hettiarachchy, 2011; Bagchi i sur., 2000). Ekstrakt sjemenki grožđa posjeduje GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*), a na tržištu ga možemo pronaći u obliku suplementa i aditiva. Jedno novije istraživanje, provedeno na štakorima, pokazalo je da suplementacija s ekstraktom sjemenki grožđa značajno smanjuje oksidativni stres i oštećenja DNA uzrokovana PhIP-om. PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridin) je česti kancerogen koji nastaje termičkom obradom hrane bogate proteinima (Zhao i sur., 2021). Naime, cilj istraživanja bio je istražiti zaštitne učinke ekstrakta sjemenki grožđa na oštećenja crijeva uzrokovana kratkotrajnim izlaganjem PhIP-u. Dobiveni rezultati ukazuju da ekstrakt sjemenki grožđa poboljšava poremećaje intestinalne mikroflore i poremećaje metabolizma lipida uzrokovane s PhIP-om (Zhao i sur., 2021). Osim toga, istraživanja su pokazala da ekstrakt sjemenki grožđa ima jače antioksidacijsko djelovanje i bolju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u odnosu na vitamine C i E. U usporedbi s uobičajenim pakiranjem, dodatak 0,5 % ekstrakta sjemenki grožđa u kombinaciji s modificiranom atmosferom značajno utječe na smanjenje rasta aerobnih bakterija, *Pseudomonas spp.*, plijesni i kvasaca, smanjuje oksidaciju lipida u pečenim pilićima te održava stabilnost boje istih (Guo i sur., 2020).

Brojna su istraživanja provedena o utjecaju ekstrakta na svojstva jestivih filmova i pakirani proizvod, pa su tako Munir i suradnici (2019) u svom istraživanju došli do zaključka da dodatak

ekstrakta kore nara ili ekstrakt sjemenki grožđa u surimi jestive filmove, pri kiselom pH, poboljšava mehanička svojstva, barijerna svojstva na vodu i poboljšava termostabilnost proizvoda. Inkorporiranjem ekstrakta sjemenki grožđa i karvakola u kitozanske filmove produžen je rok trajnosti lososa za 4 - 7 dana (Alves i sur., 2018). Istraživanje provedeno na filetima pilećih prsa (pakirani u vakuumu i skladišteni pri temperaturi hladnjaka) je pokazalo da jestivi film kitozana s ugrađenim ekstraktom sjemenki grožđa utječe na produljenje roka trajnosti proizvoda, a povećanjem koncentracije ekstrakta u filmu postiže se bolji antimikrobni učinak. Stoga je dodatak ekstrakta sjemenki grožđa, zbog sposobnosti da spriječi oksidaciju i mikrobiološko kvarenje kroz antioksidativni i antimikrobni učinak, u jestive filmove kitozana najbolji izbor kako bi se poboljšala kvaliteta i produljio rok trajnosti različitih vrsta hrane (Sogut i Seydim, 2018).

## 2.5. SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA

Karakteristike i funkcionalnost jestivih filmova ovise o njegovim fizikalno-kemijskim, mehaničkim, optičkim i barijernim svojstvima. Karakteristike jestivih filmova usko su vezane za mehanička svojstva filma: obično su krhkiji i zahtijevaju pažljivije rukovanje u odnosu na plastične materijale, a zbog osjetljivosti posebnu pažnju treba obratiti na relativnu vlažnost i temperaturu (Guillard i sur., 2016).

### 2.5.1. Fizikalno-kemijska svojstva

#### 2.5.1.1. Debljina jestivih filmova

Debljina jestivih filmova je važan parametar jer izravno utječe na barijerna i mehanička svojstva filma te rok trajanja obložene hrane. Debljina je kontrolirana koncentracijom čvrste faze i količinom otopine (Liu, 2005) te ovisi o tehnici primjene i viskoznosti otopine. Kad je otopina vrlo viskozna, ona se teško razlijeva po podlozi i uzrokuje neravnomjernu raspodjelu i time visoku debljinu jestivog filma. Poželjno je da vrijednost debljine filma bude manja od 0,25 mm. Postoje dvije metode mjerenja debljine filma: kontaktna i ne-kontaktna metoda. Kontaktna metoda je jednostavnija i najčešće podrazumijeva mjerenje filma pomoću mikrometra. Ne-kontaktna metoda je djelotvornija, ali i složenija. Prednost ne-kontaktne metode u odnosu na kontaktnu je ta da kod nje ne može doći do oštećenja filma.

### 2.5.1.2. Topljivost i udio vode jestivih filmova

Topljivost odnosno netopljivost filma u vodi važna je karakteristika koja daje uvid u ponašanje i stabilnost filma u vodenom okruženju. Ovisno od kojih je komponenti film sačinjen, film može biti hidrofilan, odnosno topljiv ili hidrofoban odnosno netopljiv u vodi. Odabir vrste filma ovisit će o kemijskom sastavu hrane koja se želi zaštititi. Za namirnice koje su osjetljive na migraciju vode, poželjno je koristiti hidrofobne jestive filmove jer oni pružaju bolju zaštitu od utjecaja vlage. Hidrofilni filmovi štite proizvod na način da sprječavaju oksidaciju lipida i drugih osjetljivih sastojaka.

Udio vode je parametar koji predstavlja ukupni volumen vode umrežen u polimernoj strukturi filma (Buljan, 2020).

### 2.5.2. Mehanička svojstva

Mehanička otpornost i deformabilnost jestivih filmova mora se utvrditi kako bi se procijenila održivost integriteta filma tijekom rukovanja, pakiranja i ostalih daljnjih procesa (Debeaufort i sur., 1998). Od mehaničkih svojstava filma od velike važnosti su: savojna žilavost (eng. *impact strength*), savojna čvrstoća (eng. *flexural strength*), čvrstoća na odljepljivanje (eng. *peel strength*), fleksibilnost (eng. *flexibility*), stabilnost na temperaturne promjene te otpornost na utjecaj čimbenika iz okoline i na fizičke stresove (Galić, 2009). Mehanička su svojstva posljedica strukturnog stanja materijala odnosno tehnološkog postupka pripreme, a obzirom da jestivi filmovi imaju slabija mehanička svojstva u odnosu na sintetičke materijale, dodatkom stabilizatora, aditiva, plastifikatora i/ili emulgatora se može utjecati na njihovo poboljšanje. U teoriji, bio materijali mogu imati sličnu čvrstoću kao polimeri koje danas koristimo (Iguchi i sur, 2000), ali da bi se to ostvarilo u praksi potrebna su dodatna istraživanja. Mehanička svojstva definiraju 3 parametra: Young-ov modul elastičnosti, vlačna čvrstoća i postotak produljenja prije pucanja.

### 2.5.3. Optička svojstva

Optička svojstva jestivog filma su sjaj, boja i prozirnost, a ovise o sastavu filma i postupku izrade. Vizualni izgled proizvoda je karakteristika koja će odbiti ili privući kupca. Poželjno je da jestivi film ima sjaj te da ga ne karakterizira mutnoća, a intenzitet obojenja filma ovisit će o koncentraciji prisutnih pigmenata. Zaštita od svjetla koju nude jestivi filmovi ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući: prirodne apsorpcijske osobine materijala koji sačinjava film, debljinu filma, uvjete obrade filma i obojenje konačnog filma (Singh i Singh, 2005).

#### 2.5.4. Barijerna svojstva

Barijerna svojstva definiramo kao sposobnost filma da spriječi izmjenu vodene pare, plinova, aroma i masnoće između proizvoda i okoline, a ovisi o kemijskom sastavu i strukturi polimera upotrijebljenih za proizvodnju filma, debljini filma, karakteristikama proizvoda i uvjetima skladištenja. Barijerna svojstva jestivog filma utječu na rok trajnosti obloženog proizvoda. Neke namirnice (npr. sol i šećer) ne zahtijevaju prisutnost kisika ili njegova prisutnost ne utječe na njihova svojstva, dok primjerice meso i mesni proizvodi te voće i povrće zahtijevaju ambalažu koja će omogućiti propusnost kisika. Stoga pri odabiru jestivog filma valja uzeti u obzir svojstva proizvoda te tako odabrati više ili manje propustljiv film.

##### 2.5.4.1. Propusnost plinova i vodene pare

Prijelaz plinova i tekućina u sustavu naziva se permeacija ili propusnost, a plin ili tekućina koja migrira naziva se permeat. Prijelaz plinovitih komponenti kroz ambalažni materijal odvija se molekulskom difuzijom. Molekule se gibaju uslijed gradijenta koncentracije, a pri konstantnom tlaku i temperaturi pokoravaju se Fickovom zakonu. Transport plinova u jestivim filmovima se odvija u 3 koraka: i) adsorpcija plina na površinu jestivog filma ii) difuzija adsorbiranih čestica od jedne do druge strane filma iii) desorpcija čestica plina iz filma. Adsorpcija ovisi o molekulama koje se kondenziraju u polimeru, difuzija je uvjetovana veličinom i oblikom permeata te brojem difundirajućih mjesta, a desorpcija ovisi o silama na granici faza.

Jednadžba Fickovog zakona je [1] i [2]:

$$J = -D \cdot \left( \frac{\partial C}{\partial X} \right) \quad [1] (1)$$

gdje su:

$J$  - tok, neto količina otopljene tvari koja difundira kroz jedinicu površine u jedinici vremena ( $\text{g m}^{-2}$  ili  $\text{mL m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$D$  - koeficijent difuzije ili difuzivnost ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )

$C$  - koncentracija tvari koja difundira ( $\text{g m}^{-3}$  ili  $\text{mL m}^{-3}$ )

$X$  - debljina filma (m)

ili

$$J = D \cdot \frac{c_2 - c_1}{x} = \frac{Q}{(A \cdot t)} \quad [2] \quad (2)$$

gdje su:

$Q$  - količina plina koji difundira kroz film (g ili mL)

$A$  - površina filma ( $m^2$ )

$t$  - vrijeme (s)

(1) stacionarna difuzija

(2) pri konstantnom koeficijentu difuzije

Primjenom Henryevog zakona i preraspodjelom navedenih jednadžbi dobiva se jednadžba za određivanje propusnosti [3]:

$$\frac{Q}{A \cdot t} = D \cdot S \cdot \frac{p_2 - p_1}{X} = P \cdot \frac{\Delta p}{X} \quad [3]$$

gdje su:

$S$  - Henryjeva konstanta topljivosti ( $\text{mol atm}^{-1}$ )

$\Delta p$  - razlika parcijalnog pritiska plina kroz film (Pa)

$P$  - propusnost (mL ili g  $m^{-2}$  s Pa)

Prema Park i Chinnan (1995) propusnost kisika, ugljikovog dioksida i vodene pare može se izračunati pomoću jednadžbe [4]:

$$P = \frac{Q \cdot X}{A \cdot t \cdot \Delta p} \quad [4]$$

gdje su:

$P$  - propusnost (mL ili g m m<sup>-2</sup> s Pa)

$Q$  - količina plina koji difundira kroz film (g ili mL)

$X$  - debljina filma (m)

$A$  - površina filma (m<sup>2</sup>)

$t$  - vrijeme (s)

$\Delta p$  - razlika parcijalnog pritiska plina kroz film (Pa)

## 2.6. ZAKONSKA REGULATIVA O JESTIVIM FILMOVIMA I PREMAZIMA

Sa zakonodavnog stajališta jestivi filmovi i prevlake mogli bi se klasificirati kao: prehrambeni proizvod, dodatak hrani, sastojci hrane, tvari u dodiru s hranom ili materijali u dodiru s hranom (Galić, 2009). Svi prehrambeni proizvodi koji se nalaze na tržištu Republike Hrvatske, odnosno Europske unije moraju biti u skladu s Uredbom (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća kojom su definirana opća načela i uvjeti zakona o hrani,. Također, osnovana je Europska agencija za sigurnost hrane te su utvrđeni postupci u područjima sigurnosti hrane. U posljednje vrijeme popularna je strategija „*od polja do stola*“ kojom se želi uspostaviti održivi prehrambeni sustav koji će imati povoljan utjecaj na okoliš, zdravlje i društvo. Hrana je neophodna svim ljudima i bez nje nema života, stoga se zakonskim regulativama nastoji osigurati da sva dostupna hrana bude u prvom redu odobrena i zdravstveno sigurna za ljudsku konzumaciju. Da bi se to osiguralo, hrana se proizvodi u skladu s HACCP sustavom i preduvjetnim programima: dobra proizvođačka praksa DPP (eng. *Good manufacturing practices*), dobra higijenska praksa GHP (eng. *Good hygiene practices*), standardni operativni postupci SOP te sanitacijski standardni operativni postupci SSOP. Nadalje, Uredbom (EZ) br. 1935/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. listopada 2004. o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva 80/590/EEZ i 89/109/EEZ definirano je u članku 3.:

„1. Materijali i predmeti, uključujući aktivne i inteligentne materijale i predmete, proizvode se u skladu s dobrom proizvođačkom praksom tako da, pod uobičajenim i predvidivim uvjetima

uporabe, ne prenose svoje sastojke u hranu u količinama koje bi mogle: (a) ugroziti zdravlje ljudi; ili (b) uzrokovati neprihvatljivu promjenu u sastavu hrane; ili (c) uzrokovati pogoršanje organoleptičkih svojstava hrane.

2. Označivanje, oglašavanje i prezentacija materijala ili predmeta ne smije potrošača dovesti u zabludu.“

Uredba Komisije (EZ) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom nakon savjetovanja sa Europskom agencijom za hranu (EFSA) definira *Popis odobrenih tvari Zajednice*. Samo tvari uvrštene u *Popis* smiju biti korištene u aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima. U članku 5. ove uredbe stoji:

„Postoji mnogo različitih vrsta aktivnih i inteligentnih materijala i predmeta. Tvari odgovorne za aktivnu i/ili inteligentnu funkciju mogu se nalaziti u odvojenom spremniku, na primjer, u maloj papirnoj vrećici, ili te tvari mogu biti izravno ugrađene u ambalažu, na primjer, u plastiku plastične boce. Te tvari, odgovorne za aktivno i/ili inteligentno djelovanje tih materijala i predmeta (sastojci), treba ocjenjivati u skladu s ovom Uredbom. Pasivni dijelovi, kao što je spremnik, pakovanje u koje se stavlja taj spremnik i ambalaža u koju je tvar ugrađena, trebaju biti obuhvaćeni posebnim propisima Zajednice ili nacionalnim propisima primjenjivim na te materijale i predmete.“

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za pripremu jestivih biofilmova korišten je prirodni polimer kitozan (Francuska Chitin, Francuska, tip 652, molekulske mase 165 kDa, stupanj deacetiliranja iznad 85 %) i guma arabika (Enologica vason s.p.a., San Pietro in Carino, Italija). Za pripremu aktivnih filmova, dodani su bioaktivni sastojci iz ekstrakta sjemenki grožđa (Polyphenolics, SAD, udio ukupnih fenola iznosi 90 %, a izražen je kao ekvivalent galne kiseline ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ )). Za pripremu otapala upotrijebljena je destilirana voda i octena kiselina (ledena octena kiselina 100 %, Merck, Darmstadt, Njemačka) te biljni glicerol (minimalne čistoće 99,5 %) kao plastifikator.

#### 3.2. PRIPREMA FILMOVA

U ovom radu pripremljeni su filmovi od kitozana (K), gume arabike (GA) i ekstrakta sjemenki grožđa (E) uz dodatak glicerola. Za usporedbu pripremljeni su uzorci od kitozana (K), gume arabike (GA) i glicerola koji su korišteni kao slijepa proba u provedenim metodama.

#### Aparatura i pribor:

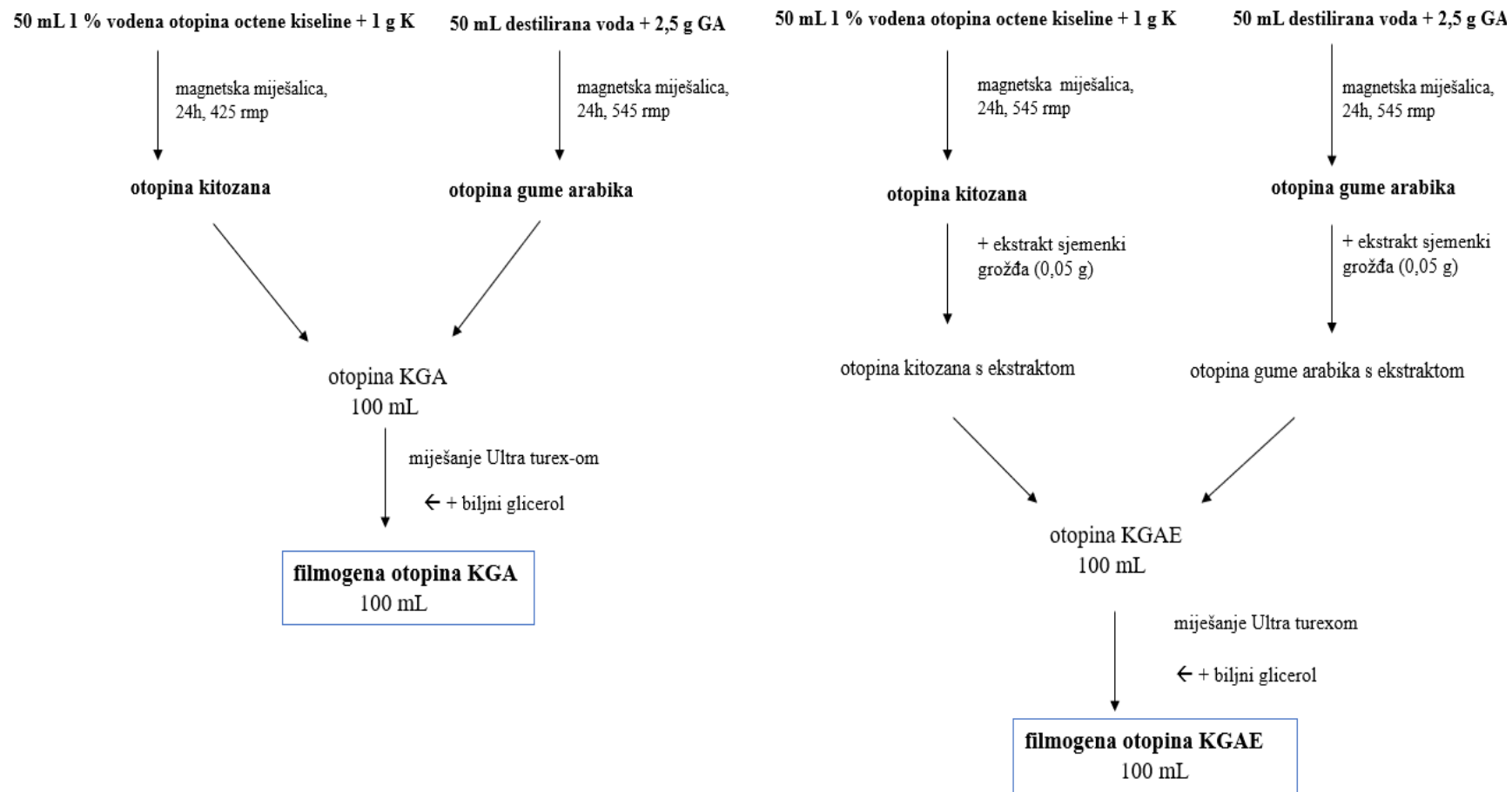
- 1.) Analitička vaga (KERN KB 2000-2N)
- 2.) Staklene čaše (100 mL)
- 3.) Magnetska miješalica i magneti (Witeg ms-mp8, Njemačka)
- 4.) Petrijeve zdjelice (promjer 11,8 cm)
- 5.) Ultra turrax (IKA T18 digital, Njemačka)
- 6.) Ventilirana klima komora (HPP110, Memmert, Njemačka)
- 7.) Eksikator
- 8.) Lađica za vaganje
- 9.) Špatula, pinceta

#### Postupak pripreme:

Pripremane su dvije vrste otopina biofilma – prva se sastojala od kitozana, gume arabike i glicerola, a druga od kitozana, gume arabike, glicerola i ekstrakta sjemenki grožđa. Obje vrste



otopina su dobivene na način da se posebno pripremala otopina kitozana, odnosno otopina gume arabike koje su kasnije sjedinjene u jednu filmogenu otopinu. Otopina kitozana dobivena je otapanjem 2 g kitozana u 1 % (m/v) vodenoj otopini octene kiseline kako bi se pripremila 2 % (m/v) filmogena otopina. S obzirom da je kitozan netopljiv u vodi, koristila se 1% (v/v) vodena otopina octene kiseline sa što nižom koncentracijom octene kiseline kako ne bi utjecala na senzorska svojstva otopine odnosno filma. Otopina gume arabike dobivena otapanjem 5 g gume arabike u destiliranoj vodi kako bi se pripremila 5 % (m/v) filmogena otopina. Otopine se pripremaju na način da se polovica potrebnog volumena (50 mL) vodene otopine octene kiseline odnosno destilirane vode ulije u čašu s magnetom te se postavi na magnetsku miješalicu i broj okretaja podesi se na 425 rmp za otopinu gume arabike, odnosno 545 rmp za otopinu kitozana. Zatim se postepeno u vodenu otopinu octene kiseline dodaje odvagana količina kitozana (1 g) odnosno gume arabike (2,5 g) u destiliranu vodu kako ne bi došlo do prezasićenja odnosno kako bi se omogućilo bolje otapanje polimera. Čaše se zaštite parafinskim filmom i ostave 24 h pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici kako bi se polimeri potpuno dispergirali. Izvagana količina ekstrakta sjemenki grožđa (0,05 g) se polagano dodaje u jednu čašu s otopinom kitozana i ista količina (0,05 g) u jednu čašu s otopinom gume arabike te se promiješa na magnetskoj miješalici 40 minuta. Ekstrakt se također dodaje polagano kako bi se potpuno dispergirao u otopinama. Kada se ekstrakt otopio, otopina gume arabike i otopina kitozana se sjedine u jednu filmogenu otopinu (KGAE). Na isti način se otopina kitozana i otopina gume arabike bez ekstrakta sjedine u drugu filmogenu otopinu (KGA). Kako bi se polimeri odnosno ekstrakt i polimeri bolje sjedinili, otopine se dodatno miješaju miješalicom Ultra-turrax 3 minute pri 3 x 1000 rmp. U obje vrste filmogenih otopina dodaje se biljni glicerol (20 % od suhe mase polimera) koji je homogeniziran uz konstantno miješanje kroz 10 minuta. Filmovi su formirani izlijevanjem na Petrijeve zdjelice promjera 11,8 cm te sušenjem u ventiliranoj klima komori 46 h pri kontroliranim uvjetima temperature (25 C) i relativne vlažnosti (50 % RH). Nakon sušenja, filmovi se pomoću pincete pažljivo uklanjaju s površine Petrijevih zdjelica te se do provedbi analiza čuvaju na filter papirima u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (50 % RH). Radi boljeg razumijevanja, postupak pripreme shematski je prikazan na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz postupka pripreme filmogenih otopina

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Debljina filmova

Debljina filmova izmjerena je kontaktnom metodom pomoću digitalnog mikrometra (Helios Preisser DIGI-MET, Njemačka, prikazan na slici 6) s preciznošću 0,001 mm. Za svaki film debljina je određena na 5 različita mjesta, a srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti je prikazana kao rezultat debljine svakog filma. Rezultati su izraženi u mikrometrima ( $\mu\text{m}$ ) kao srednja vrijednost mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 6. Digitalni mikrometar Helios Preisser DIGI-MET, Njemačka (Anonymous 1)

### 3.2.2. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz biopolimerni film

Propusnost vodene pare kroz biopolimerni film mjerena je gravimetrijski koristeći modificiranu ASTM E96-80 standardnu metodu.

#### Aparatura i pribor:

1. Čašice s teflonskim prstenom
2. Klima komora (Mettler HPP110, Mettler Njemačka)
3. Analitička vaga (ABS320-4N, Kern, Njemačka)
4. Menzura volumena 20 mL

#### Postupak:

U čašice se ulije 20 mL destilirane vode, potom se gornji rub čašice namaže vakuuskom kremom te se na njega postavi film, učvrsti teflonskim prstenom i zatvori. Pri tome treba paziti da ne dođe do oštećenja filma ili da se vakuumska krema ne razmaže po uzorku jer to smanjuje površinu za mjerenje i utječe na rezultate. Prije stavljanja uzoraka u ventiliranu klima komoru, izmjeri se početna masa na analitičkoj vagi. Uvjeti u klima komori su 25 °C i 30 % RH, a masa

svakog uzorka se mjeri svakih 24 h narednih 5 dana. Propusnost na vodenu paru (WVP), možemo izračunati pomoću formule [5]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [5]$$

gdje je:

$WVP$  – propusnost na vodenu paru ( $\text{g}^{-1} \text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

$\Delta m/\Delta t$  – maseni gubitak vlage po jedinici vremena ( $\text{g s}^{-1}$ )

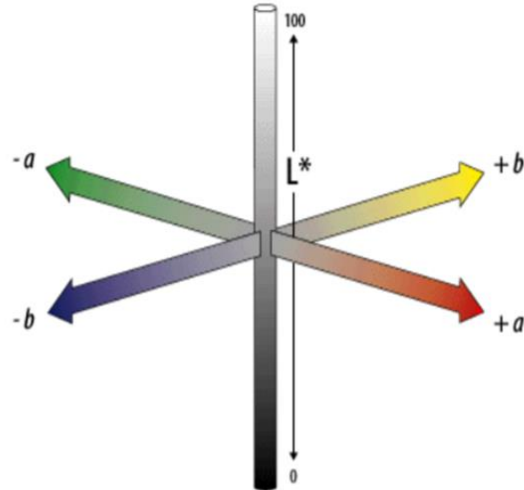
$A$  – površina filma izložena prijenosu vlage ( $9,08 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ )

$x$  – debljina filma (m)

$\Delta p$  – razlika tlaka vodene pare između dvije strana filma (Pa)

### 3.2.3. Određivanje boje biopolimernog filma

CIE  $L^*a^*b^*$  prostorni model boja je trodimenzionalni sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja u kojima su sudjelovali ljudi dobrog vida bez deformacija viđenja boja. Koordinate CIELAB sustava boja se temelje na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Raspon boja crveno-zeleno za os  $a$ , raspon boja žuto-plavo za os  $b$ , te kao treća akromatska os  $L$  sa vrijednosti u rasponu od 0 do 100, pri čemu je 0 crna, a 100 bijela (slika 7). Brojčane vrijednosti u CIE  $L^*a^*b^*$  kolornom sustavu prikazuju sve boje koje može ljudsko oko percipirati (Petrović i sur., 2013).



Slika 7. CIE  $L^*a^*b^*$  prostor boja (Petrović i sur., 2013)

Postupak:

Boja pripremljenih filmova određena je pomoću kolorimetra (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d). Za svaki pojedinačni film mjerenje je provedeno na nekoliko različitih mjesta pri čemu su dobivene  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Mjerenje se provodi tako da se uzorak filma namjesti na površinu otvora kolorimetra te se mjeri reflektiranje u vidljivom području. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Kolorimetrijska razlika ( $\Delta E^*$ ) prikazuje odstupanje reflektirane boje od kontrole, a računa se prema izrazu [6]:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}, \quad [6]$$

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

gdje su:

$L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$ - vrijednosti referentne boje prema kojoj se mjeri odstupanje

$L_1$ ,  $a_1$ ,  $b_1$ - vrijednosti ispitivanoga uzorka boje (Petrović i sur., 2013)

### 3.2.4. Mjerenje transparentnosti biopolimernog filma

Mjerenje transparentnosti se provelo na UV/VIS spektrometru (Perkin Elmer Lambda 25, SAD), mjerenjem apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 600 nm i 650 nm, prema Peng i sur. (2013). Iz podatka o apsorbanciji se izračuna transparentnost filma prema slijedećoj jednadžbi [7]:

$$T = Abs_{(nm)} / l \quad [7]$$

gdje su:

$T$  – transparentnost

$Abs$  – apsorbancija (vrijednost kod 600 nm i 650 nm)

$l$  - debljina (mm)

### 3.2.5. Određivanje topljivosti biopolimernog filma u vodi

#### Aparatura i pribor:

- 1.) Aluminijske posudice
- 2.) Analitička vaga
- 3.) Sušionik
- 4.) Eksikator
- 5.) Pinceta
- 6.) Plastične posudice

#### Postupak:

Uzorci se izrežu na podjednake komadiće u obliku kvadrata (cca 1 cm x 2 cm) te se urone u 30 mL destilirane vode, posudice se prekriju parafilmom i ostave 24 h na sobnoj temperaturi. Valja napomenuti da su uzorci prije određivanja bili čuvani u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima (50 % RH). Aluminijske se posudice označe i stave u sušionik na 105 °C do postizanja konstantne mase. Nakon 24 h, ukoliko se uzorci nisu otopili u destiliranoj vodi, pincetom se izvade iz vode i stavljaju u ohlađene aluminijske posudice te se zajedno važu. Potom se stave sušiti u sušionik na 105 °C do postizanja konstante mase, pri tome treba obratiti pažnju da aluminijske posudice budu malo otklopljene.

Topljivost filma (FS) se može izračunati pomoću formule [8]:

$$FS(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \cdot 100 \quad [8]$$

gdje je:

$FS$  – topljivost filma (%)

$W_i$  – početni sadržaj suhe tvari (g)

$W_f$  – masa suhe tvari neotopljene u vodi (g)

### 3.2.6. Mjerenje pH vrijednosti otopina biopolimera

pH vrijednost je negativni dekadski logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini. To je broj koji govori o kiselosti (aciditetu) odnosno lužnatosti (alkalitetu) otopine. pH vrijednost pripremljenih otopina izmjerena je pH metrom uranjanjem kombinirane elektrode u homogeniziranu otopinu te se pH vrijednost očita na ekranu uređaja. Nakon svakog uzorka, elektroda se ispire destiliranom vodom i mjeri se pH vrijednost destilirane vode. Za svaki uzorak provedene su 3 paralele mjerenja, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost i standardna devijacija.

### 3.2.7. Mjerenje viskoznosti otopine biopolimera

Viskoznost biopolimernih otopina određena je na viskozimetru (Lamy Rheology RM 100 Plus, Francuska, slika 8). Viskoznost otopine se izračunava iz izmjerene brzine vrtnje i izmjerene viskoznosti. Za svako mjerenje su pripremljene svježije otopine biopolimera. Dobivene su vrijednosti viskoznosti (Pa s) i obrtne sile (m Nm).

#### Postupak:

20 mL uzorka ulije se u posudu za uzorak te se uroni mjerno tijelo. Na ekranu uređaja odabere se program mjerenja MS-C19-C i podesi se brzina smicanja na  $1280 \text{ s}^{-1}$ . Mjerenje je provedeno na  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ , a za svaki uzorak su provedena 3 paralele mjerenja. Kao rezultat uzima se srednja vrijednost mjerenja i standardna devijacija.



Slika 8. Viskozimetar (Anonymous 2, Lamy Rheology RM 100 Plus, Francuska)

### 3.2.8. Određivanje ukupnih fenola u otopini biopolimera

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri 765nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. Pri oksidaciji fenolnih tvari iz uzoraka, u blago alkalnim uvjetima, kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibden oksid te nastaje plavo obojenje. Kao standard koristi se galna kiselina.

#### Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600 PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga
4. Analitička vaga (Kern KB 2000-2N,  $\pm 0,01g$ )
5. Pipete volumena 1 mL i 5 mL
6. Mikropipete volumena 100  $\mu L$  i 200  $\mu L$
7. Odmjerne tikvice volumena 25 mL i 1 L



8. Menzura volumena 100 mL i 1 L
9. Staklene epruvete
10. Stalak za epruvete
11. Lađice za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 %-tna otopina)

Postupak:

Za mjerenje ukupnih fenola potrebno je razrijediti uzorke. Uzorke smo razrijedili do 3 puta, ovisno o sadržaju ekstrakta sjemenki grožđa u njima. Nakon pripreme uzorka, u staklenu se epruvetu otpipetira redom 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta odnosno uzorka, 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Pričeka se 3 minute te doda 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Potom se sve dobro izmiješa (pomoću Vortexa), i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C u kupelji. Odmah nakon termostatiranja, uzorci se kvantitativno preliju u staklene kivete i mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm. Na isti se način priprema i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta koristi 100  $\mu\text{L}$  otapala za ekstrakciju. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost i standardna devijacija.

Rezultati:

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline/g čestica. Jednadžba pravca glasi [9]:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad [9]$$

gdje je:

$Y$  – apsorbancija pri 765 nm

$X$  – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je analizom varijance (ANOVA) pomoću Xlstat-Pro (win) 7.5.3. (Addinsoft, New York). Podaci su rangirani prema uzorcima i metodama mjerenja te su statističke razlike ocijenjene u redovima s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyovim višestrukim usporednim testovima. Vrijednost  $p < 0,05$  smatra se statistički značajnom. Dobiveni različiti eksponenti (a-d) unutar stupaca za istu vrstu mjerenja, ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom su radu proizvedeni funkcionalni kompozitni jestivi filmovi sačinjeni od prirodnih biopolimera kitozana i gume arabike te dodatka ekstrakta sjemenki grožđa kao izvora funkcionalnih, bioaktivnih sastojaka (KGAE). Kako bi usporedili utjecaj ekstrakta sjemenki grožđa na svojstva filma, proizvedeni su i kompozitni jestivi filmovi sačinjeni od kitozana i gume arabike bez ekstrakta sjemenki grožđa (KGA). Cilj rada je karakterizirati i ispitati osnovna fizikalno-kemijska svojstva filma (debljinu filma, boju filma, pH vrijednost i viskoznost te transparentnost filma), utvrditi bioaktivni sastav filma (izmjeriti sadržaj ukupnih fenola) te odrediti barijerna svojstva filma odnosno propusnost filma na vodenu paru. Mjerenja za određivanje viskoznosti, pH vrijednosti i udjela ukupnih fenola su provedena na pripremljenim filmogenim otopinama dok su ostala mjerenja provedena na jestivim filmovima. Dobiveni rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

Izmjerene vrijednosti za debljinu filmova prikazane su u tablici 3. Boja jestivih biofilmova određena je CIE  $L^*a^*b^*$  prostornim modelom, a rezultati mjerenja prikazani su u tablici 4. Tablica 5 prikazuje rezultate topljivosti filmova u vodi. Propusnost filma na vodenu paru određena je gravimetrijski koristeći modificiranu ASTM E96-80 standardnu metodu, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 9. Kako bi se utvrdio bioaktivni sastav formuliranih filmogenih otopina odnosno udio ukupnih fenola, provedena je spektrofotometrijska metoda, a izmjereni rezultati prikazani su grafički na slici 11. pH vrijednost pripremljenih otopina prikazane su u tablici 6, a tablica 7 prikazuje izmjerene vrijednosti za viskoznost ispitanih filmogenih otopina. Izmjerene vrijednosti za transparentnost jestivih filmova pri 600 nm i 650 nm prikazane su grafički na slici 10.

#### 4.1. DEBLJINA FILMOVA

Debljina filmova je važna karakteristika koje utječe na barijerna i mehanička svojstva filma. Debljine napravljenih filmova prikazane su u tablici 3. Iako su filmovi nastali izlivanjem jednake količine filmogenih otopina u Petrijeve zdjelice istog promjera (11,8 cm), debljina filma s uklopljenim ekstraktom je dvostruko veća (104,4  $\mu\text{m}$ ) u odnosu na debljinu filma bez ekstrakta (61,9  $\mu\text{m}$ ). Sivarooban i suradnici (2008) su ispitivali utjecaj ugradnje ekstrakta sjemenki grožđa, nisina i EDTA-e na fizikalna i antimikrobna svojstva proteinskih jestivih filmova te su također izvijestili o značajnom povećanju debljine jestivih filmova u koje je ugrađen ekstrakt sjemenki grožđa u odnosu na kontrolni uzorak bez ekstrakta. Debljina filma s ekstraktom je iznosila 77,9  $\mu\text{m}$  dok je debljina kontrolnog uzorka bila 33,0  $\mu\text{m}$  što je slično omjerima rezultata dobivenih u ovom radu. Znanstvenici pretpostavljaju da je to posljedica križnih veza nastalih u proteinskom filmu zbog velikih molekula fenolnih spojeva iz ekstrakta sjemenki grožđa. Protein-fenolne interakcije ovise o vrsti polifenola i koncentraciji pojedinačnih fenolnih spojeva (Kroll i Rawel, 2001), strukturi proteina (Nice i sur., 1995) i temperaturi (Sastry i Rao, 1990). Drugo istraživanje koje je imalo cilj ispitati utjecaj dodatka različitih koncentracija ekstrakta sjemenki grožđa (5, 10 i 15 %) na fizikalno-mehanička, antimikrobna te antioksidativna svojstva jestivog filma sačinjenog od kitozana i njegov utjecaj na vakumski pakirane filete pilećih prsa. Dobiveni rezultati također ukazuju na povećanje debljine filma s povećanjem koncentracije ekstrakta sjemenki grožđa u filmu. Film s najvišom koncentracijom ekstrakta sjemenki grožđa (15 %) je imao najveću debljinu ( $p < 0,05$ ) (Sogut i Seydin, 2018).

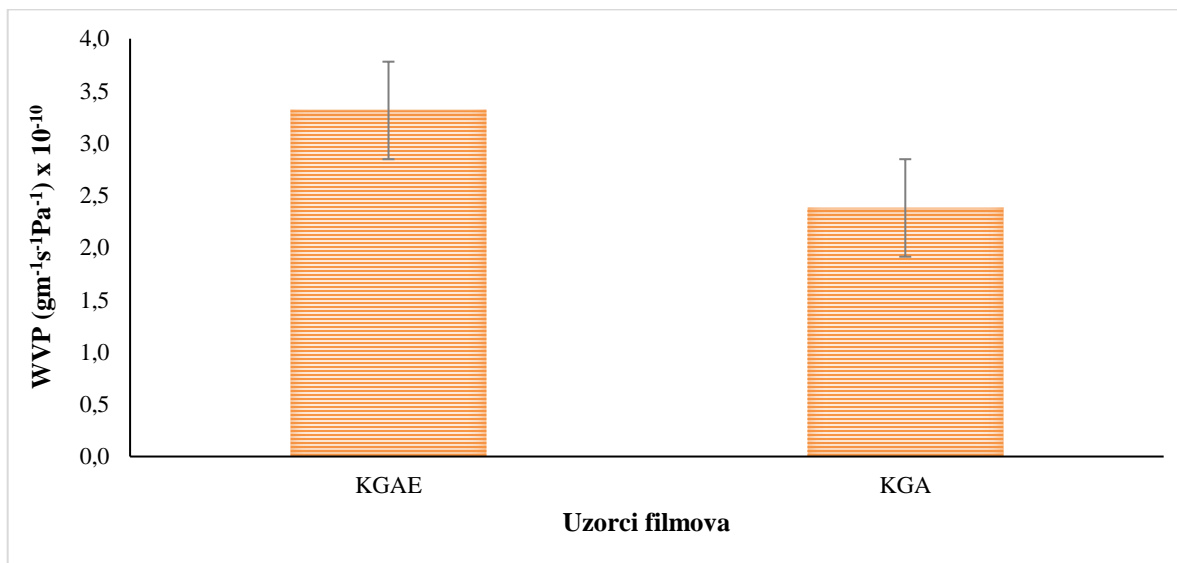
Tablica 3. Debljina pripremljenih jestivih filmova

Uzorak	Debljina filma ( $\mu\text{m}$ )
<b>KGA</b>	61,9 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>
<b>KGAE</b>	104,4 $\pm$ 7,84 <sup>a</sup>

Različiti eksponenti (a-c) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU

Poželjno svojstvo svakog ambalažnog materijala je niska propusnost na vodenu paru. Velika količina vodene pare dovodi do mikrobiološkog kvarenja proizvoda. Pod pojmom propusnost vodene pare obično se podrazumijeva sorpcija, difuzija i adsorpcija (Bourbon i sur., 2011). Niža vrijednost WVP (eng. *water vapor permeability*) znači bolja barijera filma na vodenu paru (Atef i sur., 2015). Rezultati mjerenja prikazani su grafički na slici 9. Propusnost filma bez ekstrakta sjemenki grožđa na vodenu paru je niže vrijednosti u odnosu na propusnost filma s ekstraktom (KGAE), odnosno takav film pruža bolju barijeru prema vodenoj pari. Propusnost kompozitnog filma na vodenu paru predstavlja izmjenu vlage s okolišem (Xu i sur., 2019). Ona ovisi o udjelu hidrofilnog odnosno hidrofobnog dijela polimera. Interakcije između polimera i molekula vode su temeljne za procjenu propusnosti vodene pare kroz film, koja obično prolazi kroz hidrofilni dio filma (Sangaj i Malshe, 2004). Vodena para ne može lako prolaziti kroz film kompaktne strukture kao što je kompozitni film sačinjen od kitozana i gume arabike (Xu i sur., 2019). Dok s druge strane, ekstrakt sjemenki grožđa je hidrofilnog karaktera te dodatak istog utječe na veću propusnost što nam potvrđuju i dobiveni rezultati mjerenja. Ekstrakt sjemenki grožđa narušava strukturu polielektrolitnog kompleksa na način da slabi kohezijske sile među polimernim lancima, a jačaju adhezijske sile te se propusnost povećava. Jouki i suradnici (2014) su također izvijestili o povećanju propusnosti vodene pare kroz film od sluzi sjemenki dunje s povećanjem udjela eteričnog ulja origana u filmu.



Slika 9. Propusnost vodene pare filma s i bez ekstrakta sjemenki grožđa

### 4.3. BOJA JESTIVIH FILMOVA

Boja jestivih filmova određena je CIE  $L^*a^*b^*$  prostornim modelom boja. Rezultati ispitivanja kolorimetrijskih parametara na formuliranim uzorcima prikazani su u tablici 4. Dobivene vrijednosti kolorimetrijskih parametara se značajno razlikuju ovisno o vrsti filma, odnosno prisutnosti ekstrakta sjemenki grožđa. Vrijednost za parametar  $L^*$  ukazuje na svjetlinu filma, pri čemu je vrijednost 0 tamno (crno), a 100 svjetlo (bijelo). U usporedbi s uzorkom filma koji ne sadrži ekstrakt sjemenki grožđa (KGA), uzorak filma s ekstraktom (KGAE) je očekivano tamniji jer je ekstrakt sjemenki grožđa obojio film. Stoga je vrijednost za parametar  $L^*$  filma s ekstraktom (KGAE) niža (49,32) u odnosu na vrijednost za film bez ekstrakta (KGA) koja iznosi 91,05. Na raspon boja crveno-zelenu ukazuje parametar  $a^*$ . Vrijednost parametra  $a^*$  za film s ekstraktom (KGAE) je 14,58 što ukazuje na crvenkastu boju filma što je posljedica prisutnosti antocijana iz ekstrakta sjemenki grožđa, ali i kiselog pH otopine (tablica 6) koji utječe na crveno obojenje antocijana. Parametar  $b^*$  ukazuje na raspon boja žuto-plavo. Film bez ekstrakta (KGA) ima negativnu vrijednost za parametar  $b^*$  što ukazuje na prisutnost plavih tonova u filmu dok je vrijednost za parametar  $b^*$  u filmu s ekstraktom (KGAE) pozitivna i ukazuje na prisutnost žutih nijansi u filmu. Ukupna razlika boje za KGAE filmove računata je u odnosu na kontrolni uzorak KGA te ona iznosi 45,65.

Tablica 4. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ ) jestivog filma sačinjenog od gume arabike i kitozana (KGA) te filma sačinjenog od kitozana, gume arabika i ekstrakta sjemenki grožđa (KGAE)

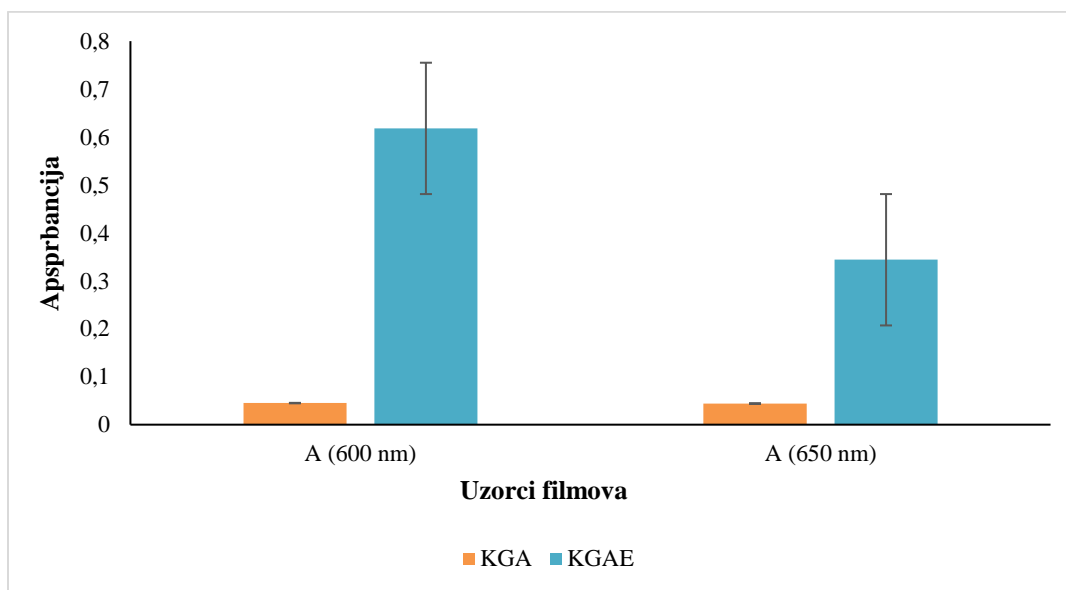
UZORAK	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
KGA	91,05 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,11 <sup>b</sup>	-5,24 ± 0,47 <sup>b</sup>	0
KGAE	49,32 ± 0,38 <sup>b</sup>	14,58 ± 1,14 <sup>a</sup>	8,25 ± 1,04 <sup>a</sup>	45,65 ± 0,56 <sup>a</sup>

Različiti eksponenti (a-c) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ ).

Slične rezultate dobili su Sogut i Seydim (2018) te Sivarooban i suradnici (2008) koji su izvijestili o promjeni  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  parametara u uzorcima filma s ugrađenim ekstraktom sjemenki grožđa u odnosu na kontrolni uzorak bez ekstrakta. Uzorci su bili značajno tamniji (niža vrijednost parametara  $L^*$ ) dok su ostali parametri bili viših vrijednosti u odnosu na kontrolne. Povećanjem koncentracije ekstrakta sjemenki grožđa dolazi do povećanja  $b^*$  vrijednosti ( $p < 0,05$ ) (Sogut i Seydim, 2018) što je posljedica većeg sadržaja antocijana.

#### 4.4. TRANSPARENTNOST BIOPOLIMERNOG FILMA

Poželjno je da jestivi film kao ambalažni materijal ima nisku transparentnost. Transparentnost odnosno propusnost filma na svjetlost (T) je važno fizikalno-kemijsko svojstvo jer ono utječe na zaštitu proizvoda od svjetlosti sprečavajući tako neželjene reakcije fotooksidacije. Što je vrijednost T veća, to je manja transparentnost filma odnosno film odbija više svjetlosti nego što je apsorbira. Iz dobivenih rezultata koji su prikazani grafički na slici 10, može se iščitati da uzorak filma bez ekstrakta (KGA) ima vrlo visoku i podjednaku transparentnost pri 600 nm (0,045) i 650 nm (0,044). Film s kapsuliranim ekstraktom sjemenki grožđa (KGAE) ima gotovo dvostruko veću transparentnost pri 600 nm u odnosu na transparentnost pri 650 nm. Transparentnost KGAE filma pri 600 nm je 0,618, a pri 650 nm je 0,344. Iz navedenog možemo zaključiti da film s ekstraktom pruža dobru zaštitu od svjetla pri 600 nm, ali povećanjem valne duljine transparentnost filma raste.



Slika 10. Transparentnost KGA i KGAE filmova pri 600 nm i 650 nm

Kada usporedimo transparentnost filma bez ekstrakta (KGA) u odnosu na transparentnost filma s ekstraktom (KGAE), vidi se da je transparentnost filma s ekstraktom i do trinaest puta manja u odnosu KGA uzorak (ovisno o valnoj duljini). Razlog manje transparentnosti filma s ekstraktom je posljedica prisutnosti fenolnih spojeva iz ekstrakta sjemenki grožđa. Slične rezultate su dobili Sogut i Seydim (2018) u svom istraživanju gdje su zamijećene veće vrijednosti transparentnosti u filmovima s ekstraktom sjemenki grožđa. Znanstvenici to pripisuju nastanku neprobojnog filma uslijed prisutnosti polifenolnih interakcija koje uzrokuju raspršenje svjetlosti kroz film. Primjena

neprozirnih filmova, poput jestivih filmova s inkapsuliranim ekstraktom sjemenki grožđa, može spriječiti oksidacijske promjene u pakiranoj hrani uzrokovane utjecaju vidljive i ultraljubičaste svjetlosti (Sogut i Seydim, 2018). Friesen i suradnici (2015) su zaključili da dodatak aktivnih sastojaka dovodi do smanjenja transparentnosti filma. U istraživanju provedenom u 2019. godini, Xu i suradnici su ispitivali utjecaj dodatka esencijalnog ulja cimeta u kitozan-guma arabika kompozitne jestive filmove te također zabilježili nižu transparentnost filma nakon dodatka ulja cimeta zbog nastanka polielektrolitnog kompleksa. Također, zabilježili su smanjenje transparentnosti filma uslijed dodatka veće količine gume arabike u kompozitni film. Znanstvenici snižavanje transparentnosti filma pripisuju elektrostatskim interakcijama između gume arabike i kitozana.

#### 4.5. TOPLJIVOST BIOPOLIMERNIH FILMOVA U VODI

Odabir i svojstva jestivog biofilma ovisit će o svojstvima namirnice koju želimo zaštititi. Različite vrste namirnica zahtijevaju različita svojstva zaštitnih materijala. Jedno od svojstava na koje je potrebno obratiti pažnju je topljivost filmova u vodi. Ono je važno jer pakiranje namirnice s visokim sadržajem vode može uzrokovati otapanje filma (ukoliko je topljiv u vodi) i tako smanjiti njegovo zaštitno djelovanje. Veća topljivost u vodi uzrokuje slabiju otpornost na vodu (Atef i sur., 2014). U tablici 5 prikazani su dobiveni rezultati topljivosti kompozitnih filmova kitozana i gume arabike s i bez ekstrakta sjemenki grožđa u vodi. Iz rezultata je vidljivo kako uzorak filma s ekstraktom ima manju topljivost u vodi (12,44 %) u odnosu na uzorak filma bez ekstrakta (18,67 %). Mogući razlog manje topljivosti filma s ekstraktom sjemenki grožđa je neravnomjerna i nepotpuna inkapsulacija ekstrakta u film te stoga nije u potpunosti doprinio hidrofilnosti filma i tako povećao topljivost u vodi. Rezultati su oprečni rezultatima dobivenim u znanstvenom radu Wanga i suradnika (2013) gdje se topljivost filma povećala s dodatkom ekstrakta. O smanjenju topljivosti filma u vodi izvijestili su Atef i suradnici (2014) dodatkom eteričnog ulja u film, ali smanjenje topljivosti pripisuju ili hidrofobnom karakteru ulja ili interakcijama između ulja i hidroksilnih grupa polimernog matriksa.

Tablica 5. Rezultati topljivosti (FS, %) KGA i KGAE filmova u vodi

UZORAK	FS (%)
<b>KGA</b>	18,67 ± 3,28 <sup>b</sup>
<b>KGAE</b>	12,44 ± 0,56 <sup>b</sup>



Različiti eksponenti (a-c) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI FILMOGENIH OTOPINA

pH vrijednost otopine ukazuje na kiselost odnosno lužnatost. pH vrijednosti svih ispitanih filmogenih otopina su manje od 7, odnosno sve su otopine alkalne. Optimalni pH za nastanak polielektrolitnog kompleksa između gume arabike i kitozana je između 3,5 - 5 (Huang i sur., 2015; Espinosa-Andrews i sur., 2007). Pri pH ispod 3,5 karboksilne skupine gume arabike su protonizirane i kontrakcija molekulske okosnice može spriječiti nastanak kompleksa (Espinosa-Andrews i sur., 2007). Kada je pH vrijednost iznad 6, blizu pKa vrijednosti kitozana, dolazi do smanjenja stupnja ionizacije i topljivosti kitozana (Sonia i Sharma, 2012; Espinosa-Andrews i sur., 2007). Izmjerene pH vrijednosti filmogenih otopina KGA i KGAE, koje su prikazane u tablici 6, se neznatno se razlikuju i nalaze se u poželjnom intervalu za nastanak polielektrolitnog kompleksa. Možemo zaključiti da dodatak ekstrakta sjemenki grožđa gotovo i ne utječe na vrijednost pH. Najniži pH ima otopina kitozana (4,7) dok otopina gume arabike i ekstrakta sjemenki grožđa pokazuje najvišu pH vrijednost (4,96). Mogući razlog zašto otopina kitozana ima nižu vrijednost pH je to što za razliku od gume arabike, kitozan nije topljiv u destiliranoj vodi već se otapa u 1 % vodenoj otopini octene kiseline. Miješanjem otopina kitozana i gume arabike nastala je otopina čiji je pH bio između vrijednosti pojedinačnih otopina.

Tablica 6. Prikaz izmjerenih pH vrijednosti filmogenih otopina

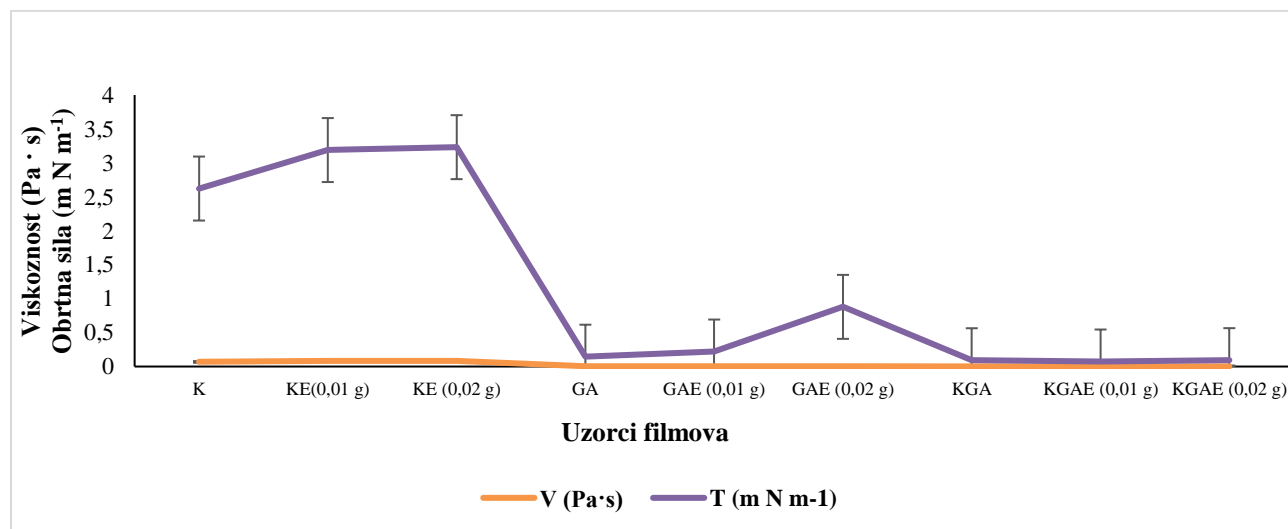
UZORAK	pH
<b>K</b>	$4,7 \pm 0,04^d$
<b>KE</b>	$4,7 \pm 0,04^{cd}$
<b>GA</b>	$4,93 \pm 0,09^{ab}$
<b>GAE</b>	$4,96 \pm 0,05^a$
<b>KGA</b>	$4,86 \pm 0,01^{ab}$
<b>KGAE</b>	$4,83 \pm 0,02^{bc}$

Različiti eksponenti (a-d) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7. VISKOZNOST BIOPOLIMERNIH FILMOVA

Viskoznost je fizikalna veličina koja nam govori o unutarnjem trenju koje se javlja uslijed strujanja fluida zbog različite brzine gibanja njegovih slojeva. Posljedica je djelovanja međumolekulskih sila kohezije u fluidu i sila adhezije između fluida i krutog tijela kroz koje se strujanje odvija. Na slici 11 grafički su prikazane vrijednosti izmjerenih viskoznosti i obrtne sile ispitanih otopina iz kojeg se može iščitati da ispitane otopine kitozana s različitim udjelima ekstrakta sjemenki grožđa (0,01 g i 0,02 g) te otopina kitozana bez ekstrakta sjemenki grožđa posjeduju najveće vrijednosti za viskoznost, ali i obrtnu silu. Najniže vrijednosti obrtne sile pokazuju otopine gume arabike, a najnižu viskoznost imale su kompozitne otopine s i bez ekstrakta sjemenki grožđa.

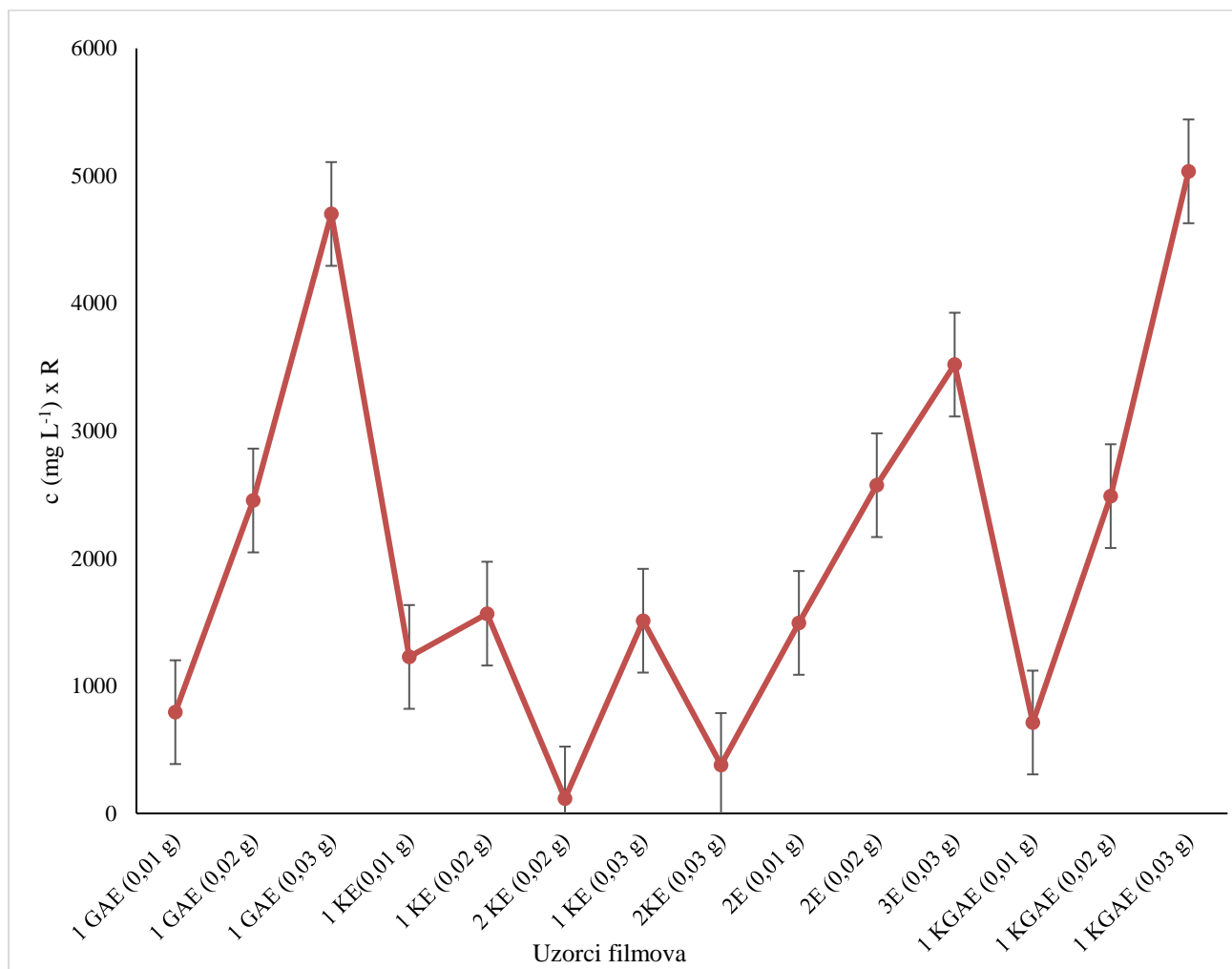
Kitozan je pozitivno nabijen ( $-\text{NH}_3$ ) polisaharid, a guma arabika negativno nabijena ( $-\text{COOH}$ ) i zajedno čine polisaharid-protein kompleks. Suprotni naboji kitozana i gume arabike se privlače i dolazi do formiranja zbijene strukture. Povećanjem koncentracije gume arabike, povećana je vjerojatnost povezivanja kitozana i gume arabike elektrostatskim silama, što dovodi do povećanja viskoznosti (Xu i sur, 2019). Kada usporedimo filmogenu otopinu bez ekstrakta sjemenki grožđa (KGA) s otopinom s ekstraktom (KGAE), vrijednosti izmjerene za viskoznost su jednake dok je vrijednost za obrtnu silu niže vrijednosti kod otopine koja sadrži ekstrakt. Moguće da je to posljedica ugradnje ekstrakta u polisaharid-protein kompleks te dolazi do promjene u strukturi koja dovodi do smanjenja obrtne sile.



Slika 11. Prikaz dobivenih vrijednosti za V (Pa·s) i T (mN m<sup>-1</sup>) pripremljenih filmogenih otopina

#### 4.8. UDIO UKUPNIH FENOLA U BIOPOLIMERNIM FILMOVIMA

Rezultati mjerenja ukupnih fenola su prikazani grafički na slici 12. Dobivene vrijednosti za biofilme bez sadržaja ekstrakta sjemenki grožđa su bile negativne te stoga nisu uzete u daljnju obradu jer ne sadrže fenole. Fenoli su prisutni u uzorcima biofilmova koji sadrže ekstrakt sjemenki grožđa. Udio fenola ovisi o dodanoj koncentraciji ekstrakta. U uzorke je dodana količina ekstrakta sjemenki grožđa od 0,01 g, 0,02 g ili 0,03 g. Iz grafičkog prikaza rezultata (slika 12) je vidljivo da krivulja raste uzlazno dodatkom veće količine ekstrakta, odnosno dodatkom veće količine ekstrakta raste udio ukupnih fenola u filmu. Udio fenola u jestivom filmu je značajan s aspekta zaštitne uloge jer fenoli djeluju baktericidno i antioksidativno. Osim toga, fenoli imaju antiupalno i antikancerogeno djelovanje te stoga povoljno utječu na zdravlje ljudi.



Slika 12. Grafički prikaz ukupnih fenola u ispitanim filmogenim otopinama

Zanimljivo je za primijetiti da filmogena otopina KGAE s 0,03 g ekstrakta sjemenki grožđa ima najveću vrijednost ukupnih fenola ( $5035,715 \text{ mg L}^{-1}$ ). Nešto manje ukupnih fenola, točnije  $4701,405 \text{ mg L}^{-1}$ , ima otopina gume arabike s 0,03 g ekstrakta sjemenki grožđa dok otopina kitozana s istom količinom ekstrakta u usporedbi s prethodno dvije navedene otopine, ima najmanji sadržaj ukupnih fenola od  $1511,45 \text{ mg L}^{-1}$ . U jednom novijem istraživanju (Rodrigues i sur., 2020) znanstvenici su ispitali ima li redosljed dodatka ekstrakta sjemenki grožđa i ekstrakta kore *Jabuticabe* („stablo brazilskoga grožđa“) utjecaj na konačni udio fenola u filmu. Rezultati pokazuju manji udio ukupnih fenola u gotovo svim uzorcima kada se ekstrakt dodaje prvo u otopinu kitozana u odnosu na izmjerene rezultate kada je ekstrakt dodan u već formirani polimerni matriks nastalog od kitozana i želatine. Takve rezultate objašnjavaju kao posljedicu prisutnosti slobodnih hidroksilnih skupina fenola ekstrakta. Kada se ekstrakt dodaje u polimerni matriks (kitozan : želatina), inkapsulacija ekstrakta je otežana zbog već formiranih veza te tako ostaje više slobodnih fenolnih hidroksila. Preostali slobodni fenolni hidroksili uzrokuju veće vrijednosti ukupnih fenola u uzorku (Rodrigues i sur., 2020). U slučaju kada se ekstrakt dodaje prvo u otopinu kitozana, sve vezujuće skupine kitozana su slobodne te dolazi do interakcije između kitozana i fenolnih hidroksila iz ekstrakta. Reakcijom se hidroksili vežu te ostaje manji udio slobodnih hidroksila što u konačnici dovodi do manjeg udjela ukupnih fenola u uzorku. Možemo povući paralelu s ispitanim uzorcima iz ovog istraživanja jer osim istih sastojaka, i želatina i guma arabika imaju svojstva stabiliziranja i zgušnjavanja. Osim redosljeda dodatka ekstrakta u uzorak, razlike u sadržaju ukupnih fenola različitih ekstrakta ne ovise samo o vrsti voća, njihovoj raznolikosti i sezoni sazrijevanja, već i o načinu ekstrakcije, vrsti otapala, temperaturi, itd. (Lenquiste i sur., 2015). Iako je u ovome istraživanju mjereno samo udio ukupnih fenola, oni su direktno vezani uz antioksidativnu aktivnost filma. Xu i suradnici (2019) su proveli istraživanje o svojstvima filma kitozan-guma arabika s inkorporiranim eteričnim uljem cimeta te su promatrali antioksidativno djelovanje različitih filmova. Došli su do zaključka da antioksidativna aktivnost filma značajno ovisi o sadržaju gume arabike. Antioksidativnu aktivnost filma ispitali su DPPH metodom i prema  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalima u filmovima s različitim omjerima kitozana i gume arabike. Kada su povisili omjere kitozan:guma arabika s 1:0 na 1:2, rezultati su pokazali značajno bolje hvatanje radikala i njihovo reduciranje. S obzirom na ove spoznaje, možemo zaključiti da iako kitozan i ekstrakt sjemenki grožđa posjeduju antioksidanse, njihova će aktivnost ovisiti i o prisutnosti drugih

spojeva, kao u ovom slučaju o udjelu gume arabike. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se pronašao najbolji omjer sastojaka filma koji će imati najveću antioksidativnu aktivnost.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Prisutnost ekstrakta sjemenki grožđa povećava debljinu filmova. Kompozitni film s ekstraktom sjemenki grožđa ima veću debljinu (104,4  $\mu\text{m}$ ) u odnosu na film bez ekstrakta sjemenki grožđa (61,9  $\mu\text{m}$ ).
2. Dodatak ekstrakta sjemenki grožđa utječe na barijerna svojstva. Film s ekstraktom pokazao je veću propusnost na vodenu paru u odnosu na film bez sadržaja ekstrakta.
3. Filmovi s ekstraktom sjemenki grožđa su tamniji (niža vrijednost parametra  $L^*$ ) i crvenkaste boje (viša vrijednost parametra  $a^*$ ) u odnosu na filmove bez ekstrakta koji su svjetliji (viša vrijednost parametra  $L^*$ ) i negativna vrijednost parametara  $b^*$  ukazuje na prisutnost plavih nijansi u filmu.
4. Transparentnost filma ovisi o prisutnosti aktivnih sastojaka. Dodatak ekstrakta sjemenki grožđa smanjuje transparentnost filma.
5. Topljivost filma s ekstraktom je neočekivano manja u odnosu na film bez sadržaja ekstrakta. Pretpostavka je da je to posljedica prisutnosti koaguliranih čestica ekstrakta koje se nisu u potpunosti inkapsulirale u film te tako doprinijele hidrofilitnosti filma i povećale topljivost.
6. Polielektrolitni kompleks između kitozana i gume arabike nastaje kad je pH vrijednost između 3,5 – 5. Dodatak ekstrakta sjemenki grožđa gotovo ne utječe na pH vrijednost.
7. Crvenkasto obojenje filmova s ekstraktom sjemenki grožđa je posljedica niže pH vrijednosti.
8. Izmjerene vrijednosti za viskoznost filmogenih otopina KGA i KGAE se ne razlikuju, ali dodatak ekstrakta sjemenki grožđa uzrokuje smanjenje obrtne sile.
9. Udio ukupnih fenola u filmogenim otopinama je viši što je viši sadržaj dodanog ekstrakta. Najveći udio ukupnih fenola je određen u filmogenoj otopini KGAE s 0,03 g ekstrakta sjemenki grožđa dok najmanje fenola sadrži filmogena otopina kitozana s 0,02 g ekstrakta sjemenki grožđa.

## 6. LITERATURA

Alves, V.L.C.D., Rico, B.P.M., Cruz, R.M.S., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C. (2018) Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft-Technol.), **89**, 525–534.

Ângelo, M., Nuno, R., Pereira, C., Leandro, Ó., Ramos, D.S., António, J., Teixeira, C., & Augusto Vicente, A. (Eds.) (2016). Edible Food Packaging: Materials and Processing Technologies (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19468>.

Anonymous 2 <<https://www.lamyrrheology.com/EN/produits/rm-100-plus/>> Pristupljeno 28.7.2021.

Anonymous 1 <<https://www.conrad.hr/p/helios-preisser-digi-met-1865-510-mikrometar-kalibriran-po-iso-s-digitalnim-zaslonom-0-25-mm-ocitavanje-0001-mm-d-1241078>> Pristupljeno 30.6.2021.

Atef, M., Rezaei, M., Behrooz, R. (2014) Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. Food Hydrocolloids, **45**, 150-157. doi: [10.1016/j.foodhyd.2014.09.037](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.037).

Ayala-Zavala J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Avina, J. E., González-Aguilar, G. A. (2011) Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. Food Research International, **44(7)**, 1866–1874.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., Pruess, H.G. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology, **148**, 187-197.

Baldwin, E. A., Nisperos, M., Baker, R. (1995a) Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35(1)**, 509–524.

Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., Baker, R. A. (1995b) Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *Horticultural Science*, **30(1)**, 35–38.

Baydar, N.G., Akkur, M. (2001) Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **25**, 163-168.

Blažanin, A. (2015) Inkapsulacija biljnih ekstrakata ionskim geliranjem emulzija, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M.C., Quintas, M. A. C., Vicente, A. A. (2011) Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, **106**, 111-118.

Bourtoom, T. (2009) Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, **16**, 1-9.

Bule K., Zadro K., Tolić A., Radin E., Miloloža M. (2020) Mikroplastika u morskom okolišu Jadrana. *Kemija u Industriji*, **69(5-6)**, 303–310.

Buljan, J. (2020) Barijerna i mehanička svojstva jestivih filmova od kitozana s ekstraktom sjemenki grožđa, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Carvalho, S., Quintas, M.A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010) Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film, *Carbohydrate Polymers*, **82**, 153-159.

Chen, Y., Wen, J., Deng, Z., Pan, X., Xie, X., Peng, C. (2020) Effective utilization of food wastes: Bioactivity of grape seed extraction and its application in food industry, *Journal of Functional Foods*, **73**, 104-113.



- Chranioti, C., Tzia, C. (2014) Arabic gum mixtures as encapsulating agents of freeze-dried fennel oleoresin products. *Food and Bioprocess Technology*, **7(4)**, 1057–106.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., McClements, D.J. (2016) Enhancement of color stability of anthocyanins in model beverages by gum Arabic addition, *Food Chemistry*, **201**, 14-22.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Voilley, A. (1998) Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **38(4)**, 299-313.
- Desplanques, S., Renou, F., Grisel, M., Malhiac, C. (2012) Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **27(2)**, 401–410.
- Dhanapal, A., Sasikala, P., Lavanya Rajamani, Kavitha, V., Yazhini, G., Shakila Banu, M. (2012) Edible films from Polysaccharides. *Food Science and Quality Management*, **3**, 9-18.
- Elsabee, M., Abdou, E.S. (2013) Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, **33(4)**, 1819-1841.
- Espinosa-Andrews, H., Baez-Gonzalez, J. G., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum arabic-chitosan complex coacervation, *Biomacromolecules*, **8(4)**, 1313-1318.
- Friedman, M., Juneja, V.K. (2010) Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, **73(9)**, 1737-1761.
- Friesen, K., Chang, C., Nikerson, M. (2015) Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: Mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chemistry*, **172**, 18-23.
- Fuk, B. (2019) Plastična ambalaža – nužno zlo. *Sigurnost* **61(2)**, 165-170.
- Galić, K. (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. **4(1-2)**, 23-31.

Galus, S., Kadzińska, J. (2016) Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, **52**, 78–86.

Garcia, M. P. M., Gomez-Guillen, M. C., Lopez-Caballero, M., Barbosa-Canovas, G. V. (2016) *Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications*, Taylor & Francis, Boca Raton.

Gennadios A., Brandenberg A.H., Park J.W., Weller C.L., Testin R.F. (1994a) Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*, **2**, 189-195.

Gennadios A., Weller C.L., Gooding C.H. (1994b) Measurement Errors in Water Vapor Permeability of Highly Permeable, Hydrophilic Edible Films. *Journal of Food Engineering*, **21**, 395-409.

Gennadios A., Weller C.L., Testin R.F. (1993) Temperature Effect on Oxygen Permeability of Edible Protein-based Films. *Journal of Food Science*, **58(1)**, 212-214, 219.

González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M.C., Lopez, F., Femenia, A. (2010) Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: Grape pomaces and stems. *LWT - Food Science and Technology*, **43(10)**, 1580-1586.

Greener I.K., Fennema O., (1989) Barrier properties and surface characteristics of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, **54(6)**, 1393-1399.

Guillard, V., Guillaume, C., Kurek, M., Gontard, N. (2016) *Mass Transfer Measurement and Modeling for Designing Protective Edible Films u: Edible Food Packaging Materials and Processing Technologies*, Ribero Cerqueira, M.A.P., Correia Pereira, R.N., da Silva Ramos, O.L., Cuto Teixeira J.A., Vicente, A.A., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 181-214.

Guo, Y., Huang, J., Chen, Y., Hou, Q., Huang, M. (2020) Effect of grape seed extract combined with modified atmosphere packaging on the quality of roast chicken. *Poultry Science*, **99(3)**, 1598-1605.

Hernandez-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., McHugh, T. H., Berrios, J. D. J., Krochta, J. M. (2008) Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Journal of Food Science*, **73(4)**, 169–175.

- Huang, G. Q., Xiao, J. X., Wang, S. Q., Qiu, H. W. (2015) Rheological properties of O-carboxymethyl chitosan – gum Arabic coacervates as a function of coacervation pH. *Food Hydrocolloids*, **43**, 436-441.
- Hun J.H., Gennadios G. (2005) Edible films and coatings: a review, u: *Innovations in Food Packaging*, (Hun J.H. ed) Elsevier Ltd.
- Idam, Z., Muhamad, I.I., Sarmidi, M.R. (2012) Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Food Processing and Engineering*, **35**, 522-542.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhioni, A. (2000) Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, **35**, 1–10.
- Jakupić, M., Poljan, M., Hajdek, K. (2019) PAMETNA AMBALAŽA. *Polytechnic and design*, **7 (2)**, 144-153.
- Jouki, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khazaei, N. (2014) Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, **174**, 88-97.
- Kammerer, D.R., Schieber, A., Carle, R. (2005) Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace-A review. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **79**, 189-196.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of art review. *International Journal of Food Microbiology*, **144(1)**, 51-63.
- Kroll, J., Rawel, H. M. (2001). Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds. *Journal of Food Science*, **66**, 48–58.
- Laohakunjit N., Noomhorm A. (2004) Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film. *Starch/ Stärke*, **56**, 348-356.

Lenquiste, S.A., Marinelli, Moraes, R.S.É.A., Dionísio, A.P., Brito, E.S., Maróstica Jr., M.R. (2015) Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*, **77**, 162-170.

Liu, Z. (2005) Edible films and coatings from starches. U: *Innovations in Food Packaging* (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, 318-332.

Lopez-Torrez, L., Costalat, M., Williams, P., Doco, T., Sanchez, C. (2015) Acacia Senegal vs. Acacia seyal gums – Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids*, **51**, 41–53.

Mariod, A.A. (2018) 12 - Enhancement of Color Stability in Foods by Gum Arabic, Gum Arabic Structure, Properties, Application and Economics, Academic press, 143-150.

Martinec, A., Filipović-Grčić, J. (2002) Kitozan – biopolimer 21. stoljeća, *Farmaceutski glasnik*, **58**, 1-10.

Martín-Polo, M., Voilley, A., Blond, G. (1992b) Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. Influence of the physical state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40(2)**, 413–418.

Milani, J., Maleki, G. (2012) *Hydrocolloids in Food Industry*. U: *Food Industrial Processes Methods and Equipment*, (Valdez B., ur.), InTech, 17-38.

Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S.M.R., A.R. Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M. (2012) Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with zataria multiflora boiss essential oil and grape seed extract. *Lwt-Food Science and Technology*, **46**, 477-484.

Moslavac, T., Šaravanja, M., Jokić, S., Šubarić, D., Jakobović, M. (2019) Utjecaj antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ulja koštica grožđa, *Izvorni znanstveni rad, Glasnik zaštite zaštite bilja*, **6**, 48-57.

Mousavi Khaneghah, A., Hashemi, S.M.B., Limbo, S. (2018) Antimicrobial agents and packaging system in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*, **111**, 1-19.

- Munir, S., Hu, Y., Liu, Y., Xiong, S. (2019) Enhanced properties of silver carp surimi-based edible films incorporated with pomegranate peel and grape seed extracts under acidic condition. *Food Packaging and Shelf Life*, **19**, 114–120.
- Muranyi, P. (2013) Functional edible coatings for fresh food products. *Journal of Food Processing and Technology*, **4**, 114.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A. (2003) Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, **87**, 41-44.
- Ngo, D.H. & Kim, S.K. (2014) Antioxidant effects of chitin, chitosan and their derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research*, **73**, 15-31.
- Nice, D. J., Robinson, D. S., Holden, M. A. (1995). Characterisation of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chemistry*, **52**, 393–397.
- Nie, S. P., Wang, C., Cui, S. W., Wang, Q., Xie, M. Y., Phillips, G. O. (2013) The core carbohydrate structure of *Acacia seyal* var. *seyal* (Gum arabic). *Food Hydrocolloids*, **32(2)**, 221–227.
- Novak, J. (2015) Primjena prirodnih biopolimera za formiranje jestivih zaštitnih filmova, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.
- Ojagh, S.M., Rezavi, S.H., Hosseini, S.M.H. (2010) Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, **120 (1)**, 193-198.
- Otoni, C.G., Avena-Bustillos, R.J., Azeredo, H.M.C., Lorevice, M.V., Moura, M.R., Mattoso, L.H.C., McHugh, T.H. (2017) Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables- A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **16 (5)**, 1151-1169.
- Pamuković, F. (2017) Razvoj jestivih filmova s bioaktivnim sastojcima ružmarina, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Park H.J., Chinnan M.S. (1995) Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Material. *Journal of Food Engineering*, **25**, 497-507.

- Peng, Y., Wu, Y., Li, Y. (2013) Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, **59**, 282-289.
- Perumalla, A.V.S., N.S. Hettiarachchy, N.S. (2011) Green tea and grape seed extracts-potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, **44**, 827-839.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilssonk, N. H., Mortenseny, G. (1999) Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, **10**, 52-68.
- Petrović, V., Milković, M., Valdec, D. (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solventnim i UV bojilima. *Tehnički glasnik* **7**, 191-197.
- Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., González-Aguilar, G. A. (2014) Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*, **51 (9)**, 1674-1685.
- Raafat, D., Sahl, H.G. (2009) Chitosan and its antimicrobial potential -A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, **2(2)**, 186-201.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003) Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, **4**, 1457-1465.
- Racoviță Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*, **54**, 709 – 718.
- Rao, M. S., Kanatt, S. R., Chawla, S. P., Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, **82(4)**, 1243–1247.
- Rinsky, L.H., Rinsky, G. (2009) *The Pastry Chef's Companion: A Comprehensive Resource Guide for the Baking and Pastry Professional*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1-134.
- Robertson G. L. (2006) *Food Packaging Principles and Practice* (2nd edition), CRC Press.

Rodrigues, M.A.V., Vicente Bertolo, M.R., Aparecida Marangon, C., da Conceição Amaro Martins V., de Guzzi Plepis A.M. (2020) Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, **160**, 769-779.

Rodríguez-Pérez, C., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., Verardo, V. (2019) Grape seeds proanthocyanidins: An overview of in vivo bioactivity in animal models. *Nutrients*, **11(10)**, 2435.

Sakloetsakun, D., Preechagoon, D., Bernkop-Schnürch, A., Pongjanyakul, T. (2015) Chitosan-gum Arabic polyelectrolyte complex films: Physicochemical, mechanical and mucoadhesive properties. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1-10.

Salgado, P.R., Ortiz, C.M., Musso, Y.S., Di Giorgio, L., Mauri, A.N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, **5**, 86–92.

Sangaj, N.S., Malshe, V.C. (2004) Permeability of polymers in protective organic coatings. *Progress in Organic Coatings*, **50 (1)**, 28–39.

Sastry, M. C. S., Rao, M. S. N. (1990) Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 2103–2110.

Sharif, R., Mujtaba, M., Rahman, M.U., Shalmani, A., Ahmad, H., Anwar, T., Tianchan, D., Wang, X. (2018) The multifunctional role of chitosan in horticultural crops: A review. *Molecules*, **23(4)**, 1-20.

Shellhammer, T. H., Krochta, J. M. (1997) Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, **62**, 390–394.

Shi, Y., Li, C., Zhang, L., Huang, T., Ma, D., Tu, Z.-c., Wang, H., Xie, H., Zhang, N.-H., Ouyang, S. (2017). Characterization and emulsifying properties of octenyl succinate anhydride modified Acacia seyal gum (gum arabic). *Food Hydrocolloids*, **65**, 10-16.

Singh, R., Singh, N. (2005) Quality of packaged foods. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ed.), Elsevier Science & Technology Books, London, 24-40.

Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. (2008) Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, **41(8)**, 781–785.

Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J. M. (2010) *Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings*, Nova Science Publishers Inc, New York.

Sogut, E., Seydim, A. C. (2018) The effects of Chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, **18**, 13–20.

Sonia, T. A., Sharma, C. P. (2012) An overview of natural polymers for oral insulin delivery, *Drug Discovery Today*, **17(13–14)**, 784–792, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>.

Teixeira A., Baenas N., Domingez-Perles R., Barros A., Rosa E., Moreno D.A., GarciaViguera C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 15638-15678.

Unusan, N. (2020) Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods*, **67**, Article 103861. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>.

UREDBA (EZ) br. 1935/2004 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva 80/590/EEZ i 89/109/EEZ, <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32004R1935>> Pristupljeno 27.6.2021.

UREDBA KOMISIJE (EU) br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32012R0231>> Pristupljeno 27.6.2021.

Van den Broek, L.A.M., Knoop, R.J.I., Kappen, F.H.J., Boeriu, C.G. (2015) Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, **116**, str.237-242.



Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V. (2017) Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, **164**, 268-283.

Verma, C., Quarashi, M.A. (2021) Gum Arabic as an environmentally sustainable polymeric anticorrosive material: Recent progresses and future opportunities, *International Journal of Biological Macromolecules*, **184**, str. 118-134.

Vugrinec, K. (2018) Inkapsulacija polifenola maslačka (*Taraxacum officinale* L.) u pektinske sustave nosača primjenom različitih tehnika, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Vuillemin, M.E., Michaux, F., Muniglia, L., Linder, M., Jasniewski, J. (2019) Gum Arabic and chitosan self-assembly: Thermodynamic and mechanism aspects. *Food Hydrocolloids*, **96**, 463-474.

Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., Zhou, J. (2013) Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, **32** (1), 35–41.

Wang, W., Gao, H. Jin, S., Li, R., Na, G. (2019) The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. *Ecotox. Environ. Safe*, **173**, 110–117.

Xu, T., Gao, C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., Tang, X. (2019) Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zhao, X., Wu, Y., Liu, H., Hu, N., Zhang, Y., Wang, S. (2021) Grape seed extract ameliorates PhIP-induced colonic injury by modulating gut microbiota, lipid metabolism, and NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats,. *Journal of Functional Foods*, **78**, 104362.

Zhao, Y., Lou, H. X. (2001) Chemical constituents & biological activities of grape. *Drugs & Clinic*, **(05)**, 185–190.

Zhao, Y., McDaniel, M. (2005) Sensory quality of foods associated with edible film and coating systems and shelf-life extension. U: Innovations in Food Packaging, (Jung, H. H., ured.), Elsevier, Kanada, 434-453.

## 7. PRILOZI

KRATICA	KAZALO
K	Filmogena otopina sačinjena od kitozana i 1% vodene otopine octene kiseline
GA	Filmogena otopina sačinjena od gume arabike otopljene u destiliranoj vodi
KE	Filmogena otopina sačinjena od kitozana i ekstrakta sjemenki grožđa otopljenih u destiliranoj vodi
GAE	Filmogena otopina sačinjena o gume arabike i ekstrakta sjemenki grožđa otopljenih u destiliranoj vodi
KGA	Film sačinjen od kitozana i gume arabika
KGAE	Film sačinjen od kitozana, gume arabika i ekstrakta sjemenki grožđa
FS	Topljivost filmova
RH	Relativna vlažnost
T	Obrtna sila
V	Viskoznost
WVP	Propusnost na vodenu paru
UF	Sadržaj ukupnih fenola
1 GA1	Filmogena otopina gume arabike (1 g) razrijeđena 10 puta.
2 GA1	Filmogena otopina gume arabike (1 g) razrijeđena 20 puta.

3 GA1	Filmogena otopina gume arabike (1 g) razrijeđena 30 puta.
1 K1	Filmogena otopina kitozana (1 g) razrijeđena 10 puta.
2 K1	Filmogena otopina kitozana (1 g) razrijeđena 20 puta.
1 K2	Filmogena otopina kitozana (2 g) razrijeđena 10 puta.
2 K2	Filmogena otopina kitozana (2 g) razrijeđena 20 puta.
1 K3	Filmogena otopina kitozana (3 g) razrijeđena 10 puta.
2 K3	Filmogena otopina kitozana (3 g) razrijeđena 20 puta.
2 E (0,01 g)	Otopina ekstrakta (0,01 g) razrijeđena 20 puta.
2 E (0,02 g)	Otopina ekstrakta (0,02 g) razrijeđena 20 puta.
3 E (0,03 g)	Otopina ekstrakta (0,03 g) razrijeđena 30 puta.
1 KGAE1	Filmogena otopina kitozana, gume arabike i ekstrakta sjemenki grožđa (0,01 g) razrijeđena 10 puta.
1 KGAE2	Filmogena otopina kitozana, gume arabike i ekstrakta sjemenki grožđa (0,02 g) razrijeđena 10 puta.
1 KGAE3	Filmogena otopina kitozana, gume arabike i ekstrakta sjemenki grožđa (0,03 g) razrijeđena 10 puta.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Helena Bionda

---

Helena Bionda