

Mogućnost pripreme i karakterizacija biopolimera za pakiranje ribe na bazi karagenana i jestive smeđe alge *Ascophyllum nodosum*

Lalić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:805340>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Helena Lalić

**MOGUĆNOST PRIPREME I
KARAKTERIZACIJA BIOPOLIMERA ZA
PAKIRANJE RIBE NA BAZI KARAGENANA
I JESTIVE SMEĐE ALGE *Ascophyllum
nodosum***

Rad je izrađen u Laboratoriju za pakiranje hrane na Zavodu za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mije Kurek.



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Održivi pristup u razvoju jestivih prevlaka u povećanju trajnosti svježe jadranske ribe" (HRZZ ActCoFISH, IP-2022-10-1837) čija je voditeljica izv. prof. dr. sc. Mia Kurek.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Miji Kurek, na stručnom vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji, dragim prijateljima i kolegama koji su me svojom potporom, podrškom i razumijevanjem konstantno motivirali za nadilaženje svih izazova na ovom putu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

MOGUĆNOST PRIPREME I KARAKTERIZACIJA BIOPOLIMERA ZA PAKIRANJE RIBE NA BAZI
KARAGENANA I JESTIVE SMEĐE ALGE *Ascophyllum nodosum*

Helena Lalić, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058216069

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je razviti biorazgradive, jestive filmove na bazi karagenana i jestive smeđe alge (*Ascophyllum nodosum*) te ispitati utjecaj dodatka alge na fizikalno-kemijska, barijerna i mehanička svojstva novorazvijenih formulacija. Pripremljene su jednostavne i višekomponentne otopine i filmovi. Filomgenim otopinama su određene pH vrijednosti i viskoznost, dok su filmovima određeni debljina, optička svojstva, topljivost, propusnost na plinove i vodenu paru te ukupna količina polifenola i antioksidacijski kapacitet. Alga *Ascophyllum nodosum* dodana je kao prirodni izvor antioksidansa, a njena inkorporacija u filmove povećala je udio polifenola i značajno poboljšala antioksidacijska svojstva filmova. Optička svojstva svih uzoraka bila su zadovoljavajuća za daljnju primjenu na hrani no ipak je prisutnost alge smanjila svjetlinu filmova. Dodatak glicerola i alge imao je pozitivan utjecaj na barijerna svojstva filmova. Izrađeni filmovi predstavljaju potencijal za održivu alternativu plastičnim materijalima za pakiranje hrane, a posebno za namirnice osjetljive na oksidacijske procese, poput ribe.

Ključne riječi: karagenan, *Ascophyllum nodosum*, biopolimeri, aktivna ambalaža, održivost, riba

Rad sadrži: 51 stranicu, 15 slika, 7 tablica, 73 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mia Kurek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Mia Kurek (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tibor Janči (zamjenski član)

Datum obrane: 19. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

PREPARATION POSSIBILITY AND CHARACTERISATION OF CARRAGEENAN AND BROWN ALGAE *Ascophyllum nodosum* BASED BIOPOLIMERS FOR FISH PACKAGING APPLICATION

Helena Lalić, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058216069

Abstract:

The objective of this study was to develop biodegradable and edible films using carrageenan and brown algae (*Ascophyllum nodosum*), and to evaluate the impact of algae incorporation on the physicochemical, barrier, and mechanical properties of the resulting formulations. Both single-component and multi-component film-forming solutions and films were prepared. The film-forming solutions were analyzed for their pH values and viscosity, while the films were assessed for thickness, optical properties, solubility, gas and water vapor permeability, total polyphenol content, and antioxidant capacity. The inclusion of *Ascophyllum nodosum* as a natural antioxidant source increased the polyphenol content and significantly enhanced the antioxidant properties of the films. Optical analyses indicated that all samples exhibited satisfactory characteristics; however, the incorporation of algae slightly reduced the films' brightness due to the algae's dark pigmentation. Additionally, the incorporation of glycerol and algae positively influenced the barrier properties, improving the films' resistance to gas and water vapor transmission. These films represent a promising, sustainable alternative to conventional plastic packaging materials, particularly for food products prone to oxidative degradation, such as fish. The innovative use of algae not only adds functionality to the films but also aligns with eco-friendly and sustainable packaging trends.

Keywords: carrageenan, *Ascophyllum nodosum*, biopolymers, active packaging, sustainability, fish

Thesis contains: 51 pages, 15 figures, 7 tables, 73 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Mia Kurek, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Mario Ščetar, PhD, Associate professor (president)
2. Mia Kurek, PhD, Associate professor (mentor)
3. Nives Marušić Radovčić, PhD, Associate professor (member)
4. Tibor Janči, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 19th, 2024

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. BIOPOLIMERI | 2 |
| 2.2. JESTIVE PREVLAKE | 2 |
| 2.3. KARAGENAN | 4 |
| 2.4. JESTIVE PREVLAKE I FILMOVI OD KARAGENANA | 5 |
| 2.4.1. Plastifikatori | 9 |
| 2.5. SMEĐA ALGA <i>Ascophyllum nodosum</i> | 10 |
| 2.6. ZAKONSKA REGULATIVA | 13 |
| 2.7. BUDUĆE PERSPEKTIVE | 16 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. MATERIJALI | 18 |
| 3.2. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA | 18 |
| 3.3. METODE KARAKTERIZACIJE | 19 |
| 3.3.1. Karakterizacija filmogenih otopina..... | 19 |
| 3.3.1.1. Određivanje pH vrijednosti | 19 |
| 3.3.1.2. Određivanje viskoznosti | 19 |
| 3.3.2. Karakterizacija filmova | 20 |
| 3.3.2.1. Određivanje debljine filma | 20 |
| 3.3.2.2. Određivanje boje | 20 |
| 3.3.2.3. Određivanje topljivosti i udjela vode u filmovima | 21 |
| 3.3.2.4. Mjerenje propusnosti plinova kroz biopolimerni film..... | 21 |
| 3.3.2.5. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz biopolimerni film | 22 |
| 3.3.2.6. Određivanje ukupnih fenola..... | 22 |
| 3.3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta..... | 23 |
| 3.4. OBRADA PODATAKA | 24 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 4.1. pH I VISKOZNOST OTOPINA BIOPOLIMERA | 25 |
| 4.2. BOJA FILMOVA | 30 |
| 4.3. DEBLJINA FILMOVA I PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU | 32 |
| 4.4. UDIO VODE, SUHE TVARI I TOPLJIVOST FILMOVA U VODI | 34 |
| 4.5. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O₂ i CO₂) | 36 |
| 4.6. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA U FILMOVIMA | 39 |

| | |
|--|----|
| 4.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST (DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET FILMOVA (FRAP, eng. <i>Ferric-reducing antioxidant power</i>) | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI | 44 |
| 6. LITERATURA | 45 |

1. UVOD

Široka upotreba plastičnih materijala donijela je brojne prednosti za pakiranje i skladištenje prehrambenih proizvoda, pogotovo kada je riječ o lako kvarljivim namirnicama (James i sur., 2024). Jedna trećina ukupne plastike proizvedene u svijetu namijenjena je za upotrebu kao materijal za pakiranje, od koje je većina namijenjena za jednokratno korištenje /primjenu, kao što je fleksibilna i kruta ambalaža za hranu te plastične vrećice, folije i filmovi (Sedayu i sur., 2019). Oko 36 % materijala za pakiranje hrane proizvodi se na bazi petroleja, poput polietilena, polipropena i polistirena, zbog njihove cjenovne pristupačnosti, jednostavne proizvodnje te dobrih mehaničkih svojstava (Cheng i sur., 2022). Međutim, dugoročna upotreba ovih materijala može izazvati ozbiljne ekološke probleme zbog štetnog učinka mikroplastike na okoliš i ljudsko zdravlje (Sedayu i sur., 2019).

Posljednjih godina raste interes za zamjenu plastike biorazgradivim alternativama kako bi se smanjila akumulacija plastičnog otpada. Posebno je naglašen interes za poboljšanje bioaktivnosti ambalaže kroz istraživanje biopolimernih materijala, koji nalaze sve veću primjenu u prehrambenoj industriji (James i sur., 2024). Ova istraživanja usmjerena su na korištenje prirodnih izvora, poput biljaka, mikroorganizama i životinja, za proizvodnju bioplastike.

Alge se ističu kao perspektivan izvor sirovine zbog niskih troškova, obilja u prirodi i činjenice da ne zahtijevaju poljoprivredno zemljište, čime ne konkuriraju proizvodnji hrane. Također, alge nisu izložene kemikalijama ili gnojivima, što ih čini sigurnijim izborom za ambalažne materijale. Među polisaharidima iz algi, karagenan je posebno zanimljiv zbog svoje izvrsne sposobnosti formiranja filmova (Sedayu i sur., 2019).

Općenito, biopolimeri su pokazali potencijal za produživanje svježine i roka trajanja kvarljivih prehrambenih proizvoda, poput ribe i mesa, te inhibiciju oksidacije lipida (James i sur., 2024). Razvoj bioaktivnih filmova i prevlaka iz obnovljivih izvora nudi značajne prednosti za smanjenje ovisnosti o plastici i produženje trajnosti prehrambenih proizvoda, čime se doprinosi održivosti u prehrambenoj industriji (James i sur., 2024; Kurek i sur., 2022).

Glavni ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Priprema jestivih filmova na bazi karagenana i jestive smeđe alge *Ascophyllum nodosum*;
- Utjecaj dodatka smeđe alge *Ascophyllum nodosum* na svojstva filmogenih otopina i filmova;
- Karakterizacija i usporedba fizikalno-kemijskih, barijernih i mehaničkih svojstava pripremljenih filmova.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOPOLIMERI

Jedna od alternativa plastikama su jestivi biopolimeri na bazi proteina, polisaharida i lipida. Biopolimeri su biorazgradivi i ekološki prihvatljivi spojevi te mogu smanjiti količinu kemijskih opasnosti i kućnog otpada. Različiti polisaharidi korišteni su za izradu jestivih filmova i prevlaka, uključujući škrob, tapioku, kukuruz, celulozu i njezine derivate kao što su HPMC (hidroksipropil metilceluloza), CMC (karboksimetilceluloza) i MC (metilceluloza), sluz od sjemenki dunje, pululan, alginat, karagenan i gumu policaju (Salehi, 2020).

Posljednjih godina upotreba jestivih premaza i filmova u prehrambenoj industriji značajno se povećala (Abdullah i sur, 2022). Upotreba jestivih i biorazgradivih prevlaka potiče se kako bi se produljio rok trajanja, poboljšala kvaliteta hrane i smanjio otpad od ambalaže, a korištenje ovih biorazgradivih materijala moglo bi do određene mjere pomoći u rješavanju problema otpada (Dwivany i sur., 2020).

Koncept jestivih filmova razvio se iz ekoloških briga, rastućeg problema odlaganja plastičnog otpada te mogućnosti iskorištenja industrijskog otpada iz prehrambene industrije (Umaraw i sur., 2020). Povećan interes za jestive prevlake potaknut je rastućom potražnjom potrošača za sigurnom, praktičnom i stabilnom hranom, kao i sviješću o negativnim učincima ne-biorazgradive ambalaže na okoliš.

2.2. JESTIVE PREVLAKE

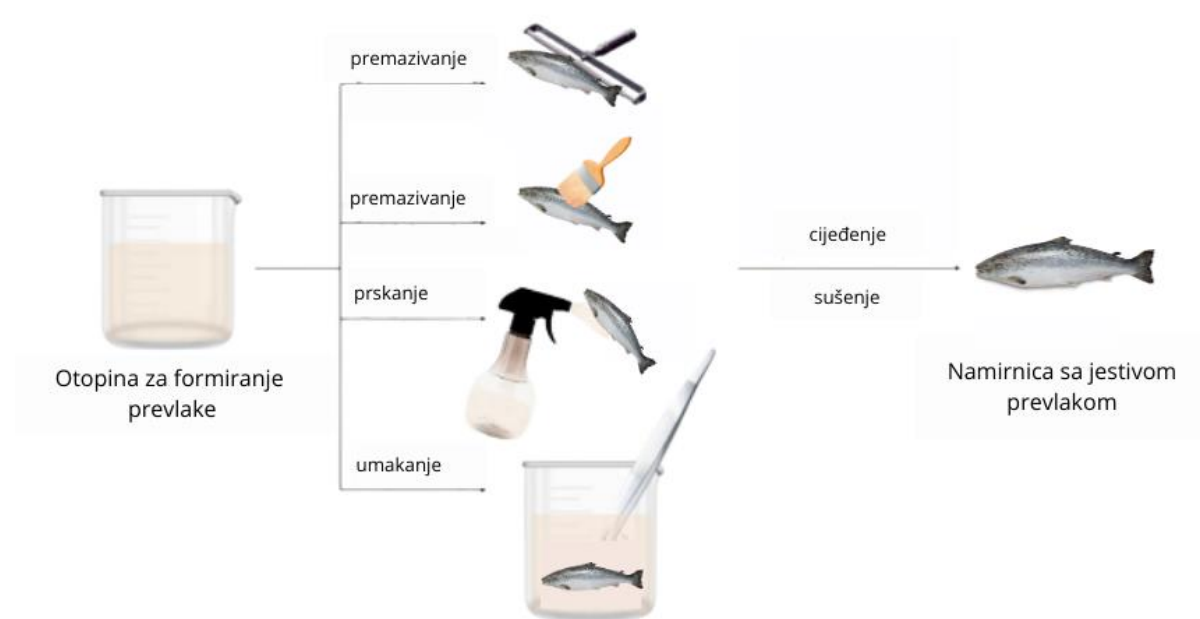
Posljednjih godina, jestivi filmovi i prevlake postaju sve važnija strategija u optimizaciji očuvanja hrane na globalnoj razini. Prema načinu nanošenja i debljini, razlikujemo jestive filmove i jestive prevlake. Jestivi filmovi su tanki slojevi jestivih biopolimernih materijala, koji se formiraju iz filmogenih otopina i koriste za omatanje prehrambenog proizvoda, dok se prevlake izravno nanose na namirnicu, postajući njezin integralni dio. Glavna razlika između filmova i prevlaka je njihova debljina, a filmovi se mogu koristiti za izradu vrećica, folija i kapsula (Kurek i sur., 2022).

Jestive prevlake su ambalažni materijali izrađeni od prirodnih polimera koji se nanose na proizvod u tekućem obliku te su sigurni za konzumaciju zajedno sa proizvodom. Oni mogu služiti kao nositelji prehrambenih aditiva, poput sredstava protiv posmeđivanja, antimikrobnih

sredstava, boja, aroma, nutrijenata i začina (Bizymis i Tzia, 2021). Idealne prevlake su bez boje i okusa, a koje pružaju mogućnost ugradnje aktivnih tvari (Božanić i sur, 2022).

Funkcionalne tvari dodaju se u matricu filma ili prevlaka, kako bi se poboljšala njihova učinkovitost. Dodavanjem antimikrobnih ili antioksidativnih sastojaka, prevlake osiguravaju zaštitu hrane od kvarenja i bolju kontrolu mikrobioloških i kemijskih procesa na površini namirnice, dok istovremeno mogu nositi arome ili hranjive tvari koje dodatno poboljšavaju kvalitetu proizvoda te djeluju kao konzervansi hrane, štiteći je od mikrobioloških kontaminacija, oksidacijskih oštećenja i okolišnih čimbenika poput topline, vlage i kisika. Takvi materijali poznati su kao aktivna ambalaža. Takav tip ambalaže naziva se aktivni ambalažni materijal (Kurek i sur., 2022; Dehghan i sur., 2021; Umaraw i sur., 2020).

Aplikacija jestivih prevlaka na prehrambeni proizvod vrši se u tekućem stanju, a moguće ga je aplicirati nanošenjem u tankom sloju prevlačenjem, raspršivanjem ili umakanjem u prevlake, nakon čega se proizvod cijedi i suši. Prikaz nanošenja jestivih prevlaka dan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz nanosa jestive prevlake na proizvod (prema Zhao i sur, 2021)

Posljedično, učinkovitost jestivih filmova ili prevlaka ovisi o tri kriterija:

- odabranim materijalima za njihovu pripremu,
- tehničkim i operativnim parametrima njihove primjene na prehrambeni proizvod,
- specifičnim zahtjevima samog prehrambenog proizvoda (Bizymis i Tzia, 2021).

Glavna prednost biopolimera od polisaharida, jest njihova dobra mehanička čvrstoća i struktura, no imaju slaba barijerna svojstva zbog svoje topljivosti u vodi (Božanić i sur., 2022). Unatoč izazovima, jestive prevlake i filmovi sve se više istražuju. One pružaju brojne prednosti, uključujući poboljšanje kvalitete proizvoda zaštitom od fizičkog, kemijskog i biološkog propadanja (Hauzoukim i Mohanty, 2020).

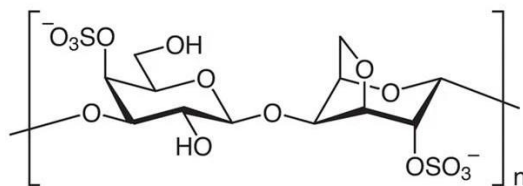
Jestivi filmovi i prevlake poboljšavaju kvalitetu morskih proizvoda sprječavanjem mikrobnog rasta, smanjenjem oksidacije lipida i unapređenjem senzorskih karakteristika. Kvaliteta morskih plodova ubrzano se smanjuje tijekom skladištenja, pri čemu kemijske i enzimске reakcije dovode do početnog gubitka svježine, dok mikrobiološke promjene označavaju kraj njihova roka trajanja (Bizymis i Tzia, 2021).

Riba je jedna od najkvarljivijih prehrambenih namirnica čija kvaliteta opada zbog složenog spoja same namirnice. Procjenjuje se da se približno 10 % proizvoda ribarstva i akvakulture gubi uslijed degradacije (Volpe i sur., 2019). Prevencijom mikrobnog rasta i oksidacije te kontrolom patogena putem jestivih prevlaka, moguće je produljiti rok trajanja svježih ribe, što je ključno za sigurnost potrošača i zdravstvenu ispravnost hrane (Kurek i sur., 2022). U formulacije jestivih filmova i prevlaka mogu se dodavati različiti sastojci i aditivi, poput antioksidansa i antimikrobnih agenasa, kako bi se dodatno produljio rok trajanja. Prema istraživanju Zhao i sur. (2021), dokazano je da upotreba jestivih prevlaka sa dodatkom antimikrobnih ekstrakata na ribljim filetima produžuje rok trajnosti namirnice, inhibira oksidaciju masti i rast broja bakterija, snižava pH vrijednost, odgađa promjene u teksturi i boji te doprinosi očuvanju organoleptičkih svojstava namirnica.

2.3. KARAGENAN

Karagenan je linearni sulfatni polisaharid dobiven ekstrakcijom iz staničnih stijenki crvenih morskih algi vrste *Rhodophyceae*. Nalazi se u staničnoj stijenci smeđih algi (Moares i Hilliou, 2024), a primarno se ekstrahira iz rodova *Chondrus*, *Euचेuma*, *Gigartina* i *Iridaea*. Njegovi polimerni lanci sastavljeni su od naizmjeničnih jedinica D-galaktoze i 3,6-anhidrogalaktoze povezanih α -1,3- i β -1,4-glikozidnim vezama. Zbog svojih svojstava formiranja gela, biokompatibilnosti i biorazgradivosti, karagenan se široko koristi u prehrambenoj, mliječnoj i farmaceutskoj industriji. Ovisno o broju i poziciji ester sulfatnih skupina te sadržaju 3,6-anhidro-galaktoze, karagenan se može podijeliti u šest osnovnih oblika, i to kappa (κ)-, lambda (λ)-, iota (ι)-, mu (μ)-, theta (θ)-, nu (ν)- i xi (ξ)-karagenan. Među njima, κ -karageenan se odlikuje najpogodnijim svojstvima formiranja filmova jer sadrži otprilike

25–30 % sulfatnih skupina i 28–35 % 3,6-anhidrogalaktoze i široko se razvija kao biopolimerni materijal za pakiranje hrane (Cheng i sur., 2022; Liu i sur., 2019.; Sedayu i sur., 2019).



Slika 2. Kemijska struktura κ -karagenana (izvor: Annonymous)

Svi tipovi karagenana netopljivi su u organskim otapalima, uljima i mastima, dok su topljivi u vodi (Cheng i sur., 2022). Mnogi čimbenici, poput prisutnosti sulfatne skupine i vezivanja za 3,6- i anhidrogalaktozne dijelove, potiču topljivost karagenana u vodi. Iota-karagenan je homopolimer disaharidnih jedinica 4-sulfatirane galakopiranoze i 3,6-anhidrogalaktoze sa sulfatnom skupinom na drugom ugljiku. Kemijska struktura iota-karagenana prikazana je na slici 2. Jedinstvena svojstva iota-karagenana uključuju njegova gelirajuća svojstva, visoko zadržavanje vode, biorazgradivost i biokompatibilnost (Bhatt, 2023).

Karagenan se isprva koristio kao sredstvo za zgušnjavanje u prehrambenoj industriji (Pacheco-Quito i sur., 2020), no komercijalni karagenani danas imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Primjenjuju se i prilikom proizvodnje različitih boja, vodenih gelova i farmaceutskih proizvoda zbog njihovih dobrih gelirajućih, koagulantskih i stabilizirajućih svojstava. U posljednjih nekoliko desetljeća, biološki potencijal karagenana ispitan je u polju medicine, a istraživanja su pokazala vrlo pozitivne ishode. Otkriveno je da karagenan posjeduje antikoagulantnu, antitrombotsku, antivirusnu i antitumorsku aktivnost te da ima antioksidativna svojstva (Lomartire i sur., 2022).

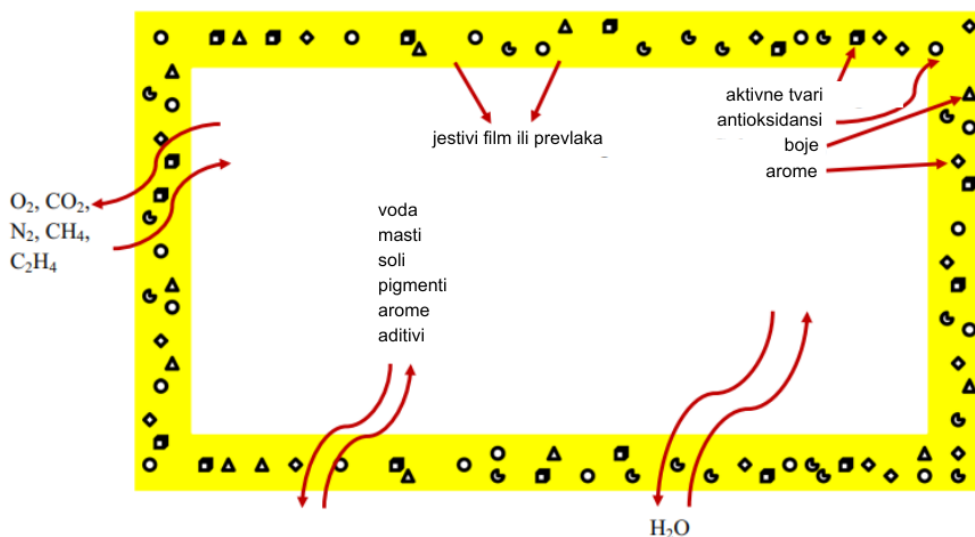
Karagenan od 1973. godine ima GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*) koji izdaje Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA). Europska unija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA) odobrila je karagenan (E-407) i polupročišćeni karagenan (E407a) kao prehrambene aditive. Toksikološka svojstva karagenana temeljito su istražena, a utvrđeno je da ovi spojevi imaju minimalne ili nikakve štetne fiziološke učinke (Pacheco-Quito i sur., 2020).

2.4. JESTIVE PREVLAKE I FILMOVI OD KARAGENANA

Kvalitetan materijal za pakiranje trebao bi:

- pružati zaštitu pakiranom proizvodu od fizičkih i mehaničkih utjecaja;
- spriječiti oštećenje proizvoda uzrokovano djelovanjem vanjskih okolišnih čimbenika poput svjetlosti, zračenja, topline i vlage;
- inhibirati prisutnost i proliferaciju mikroorganizama;
- osigurati otpornost na oksidacijske procese;
- spriječiti razvoj neugodnih mirisa te očuvati okus i boju proizvoda; (vi) omogućiti prijenos hranjivih sastojaka;
- djelovati kao nosač senzorskih elemenata (Puscaselu i sur., 2021).

Učinkovitu alternativu ovim zahtjevima mogli bi predstavljati materijali za pakiranje na bazi biopolimera. Jedan od prirodnih izvora biopolimera koji mogu biti korišteni kao baza za jestive filmove i prevlake je karagenan (Rahmawati i sur., 2019). Posljednjih godina velika pažnja posvećena je karagenanu kao materijalu za formulaciju jestivih filmova i prevlaka. Karagenan je izvrstan biopolimer koji primjenu nalazi i u aktivnim sustavima pakiranja hrane s obzirom na svoju visoku sposobnost geliranja i biokompatibilnost (He i Wang, 2022). Također, može služiti kao izvrstan nositelj aktivnih sastojaka, poput biljnih prahova, ekstrakata eteričnih ulja i nanočestica, što je još jedan od razloga od kojih ovaj biopolimer uživa visoku zastupljenost u proizvodnji jestivih filmova i prevlaka (Ramadas i sur., 2024). Na slici 3. prikazan je shematski prikaz strukture jestive prevlake.



Slika 3. Shema strukture jestive prevlake/filma (prema Hammam, 2019)

Korištenje karagenana za jestive filmove i prevlake obuhvaća širok spektar primjena u prehrambenoj industriji, kao što su svježa i smrznuta riba, meso, perad, razni sušeni prehrambeni proizvodi, prevlake za voće i mikroenkapsulacija. Glavni cilj u tim primjenama je

sprječavanje dehidracije, nepoželjnih kemijskih reakcija, kao i inhibicija kvarenja i pogoršanja uslijed mikrobiološke kontaminacije (Sedayu i sur., 2019).

U početnoj fazi karagenan u tekućem stanju uglavnom postoji u obliku nepravilnih zavojnica. Zatim proces hlađenja na niskim temperaturama inducira stvaranje vodikovih veza između galaktozilnih jedinica, što potiče uvijanje sekvence anhidrogalaktoze u obliku heliksa (Cheng i sur., 2022). Općenito prihvaćeni model procesa geliranja otopina karagenana uključuje prijelaz s konformacije zavojnice na heliks, nakon čega, u prisutnosti određenih kationa, dolazi do agregacije dvostrukih heliksa u svrhu formiranja prostorno povezane mreže. Gelovi iota-karagenana su mekani i ne pokazuju toplinsku histerezu. U gelovima kappa-karagenana formiraju se grube mrežne strukture s debelim agregatima, dok se u gelovima iota-karagenana formiraju fine mrežne strukture (Geonzon i sur., 2019).

Razna istraživanja pokazala su mogućnost primjene karagenana kao sirovine u proizvodnji ambalažnih folija i filmova za različite primjene (Sedayu i sur., 2019). Iako imaju mnoge prednosti, jestivi materijali pružaju slabiju zaštitu u usporedbi s konvencionalnim plastičnim ambalažama, što ograničava njihovu širu primjenu (Galić, 2009). Prevlake proizvedene isključivo od kappa-karagenana općenito imaju slaba mehanička i barijerna svojstva zbog visoke hidrofilnosti karagenana (Liu i sur., 2019). S druge strane, Cheng i sur. (2022) navode kako su takva barijerna svojstva vitalna za primjenu materijala za pakiranje hrane. Na primjer, najbolja primjena za ovu vrstu bioplastike je u jednokratnoj ambalaži za prahove, brzu hranu, slatkiše ili za pakiranje farmaceutskih proizvoda za svakodnevnu upotrebu, poput dodataka prehrani ili tableta, koji ne zahtijevaju izvrsna mehanička svojstva i lako se otvaraju (Lomartire i sur., 2022).

Kako bi se poboljšale fizičke i funkcionalne karakteristike filma, u otopinu za formiranje filma dodaju se određene tvari poput plastifikatora, drugih polimera, umreživača i bioaktivnih funkcionalnih sastojaka (nanopunila, biljni ekstrakti, bioaktivni spojevi, prirodna bojila, eterična ulja) radi postizanja povoljnih rezultata. Kombinacija s drugim tvarima, poput umreživača i plastifikatora, može sinergistički djelovati na poboljšanje fizičkih svojstava prevlaka, dok uključivanje funkcionalnih sastojaka pridonosi njihovoj antioksidativnoj i antibakterijskoj aktivnosti (Ramadas i sur., 2024). S obzirom na gore navedena ograničenja, materijali na bazi polisaharida trebali bi se prilagoditi stvarnim zahtjevima primjene kako bi se optimizirala njihova funkcionalna svojstva i potaknula njihova primjena u jestivoj ambalaži. Prisutnost funkcionalnih skupina, poput hidroksilne, amino, acetilamino i karboksilne skupine u polisaharidima, omogućava dodatne mogućnosti za njihovu modifikaciju (Zhao i sur., 2021).

Do danas se oko 90 % svjetskog karagenana dobiva iz ovih dviju vrsta, a njihov se uzgoj sada širi diljem svijeta, uključujući regije jugoistočne Azije, Pacifičkih otoka, kopnene

djelove istočne Afrike, Južne Amerike i Srednje Amerike. Uspjeh uzgoja karagenanske morske alge širom svijeta također može označavati održiv izvor sirovinskih zaliha za buduću industrijsku proizvodnju plastike na bazi karagenana (Sedayu i sur., 2019).

Pokušaji poboljšanja ili manipulacije svojstvima filmskih materijala na bazi karagenana istraženi su kroz fizičke i/ili kemijske procese. Za potrebe pakiranja hrane, poboljšanje barijernih svojstava filmskih materijala od karagenana predstavlja glavni motiv, uz poboljšanje drugih funkcionalnih svojstava kao što su mehanička, optička i antimikrobna svojstva (Ramadas i sur., 2024).

Glavne karakteristike jestivih filmova i prevlaka:

- zaštita od UV zračenja;
- prijenos otopljenih tvari (npr. soli, aditiva i pigmenta), vodene pare, organskih; para (npr. aroma i otapala) te plinova (npr. kisika, ugljikovog dioksida, dušika i etilena) između hrane i atmosfere;
- barijera protiv mehaničkih oštećenja (npr. udarci ili rezovi);
- povećanje roka trajanja proizvoda;
- nosioci bioaktivnih komponenata (npr. antioksidansi);
- antimikrobni učinak protiv razmnožavanja bakterija i kontaminacije gljivicama (npr. nanočestice srebra) ;
- nosioci zdravih mikroorganizama (npr. probiotici) koji donose korist potrošaču;
- biorazgradivi prirodni materijali (Díaz-Montes i Castro-Muñoz, 2020).

Različiti tehnički pristupi korišteni su za postizanje poželjnih svojstava filmskih materijala na bazi karagenana, uključujući miješanje, plastificiranje i uključivanje nanodijelova, kako je opisano u i sažeto u tablici 1.

Tablica 1. Primjena karagenana kao filma za pakiranje morskih proizvoda (*prema* Ramadas i sur., 2024).

| Dodatak | Ključne karakteristike prevlake/filma | Primjena |
|---|--|------------------|
| Antocijanin i ugljikovodične čestice obogaćene cinkovim oksidom | Smanjena transparentnosti (blokiranje UV-A spektra od 85,2 % i UV-B od 99,4 %). Povećana AO aktivnost (99 % mjereno ABTS , dok je 58 % AO aktivnosti potvrđeno DPPH analizom). 100 % inhibicija <i>L. monocytogenes</i> , s 8,1 log CFU/mL nakon 12 h inkubacije. | Pakiranje škampa |
| Antocijanin i ugljikovodične | 100 % antimikrobnu aktivnost protiv <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i> unutar 3 h inkubacije. Visoka AO aktivnost | Pakiranje škampa |

| | | |
|---|---|----------------------------|
| čestice obogaćene titanijevim dioksidom | mjereno ABTS i DPPH (obje aktivnosti od približno 100%). | |
| Kurkuminoid, zein, epigalokatehin galat | AO aktivnost filma praćena je DPPH i ABTS analizom. Aktivnost DPPH-a iznosila je 79 % AO, dok je aktivnost ABTS-a iznosila 73,34 %. | Pakiranje ribe |
| Antocijanin i cinamaldehyd dodani u nanočestice zeina | Smanjene vrijednosti TVB-N kod ribe (lat. <i>Synchiropus splendidus</i>) za 13,3%, što ukazuje na produženi rok trajnosti. Povišena AO aktivnost (92,77% prema ABTS testu i 48% prema DPPH testu). | Pakiranje mandarinske ribe |
| Lignin | Lignin inkorporiran u karagenan film poboljšao je mehanička i funkcionalna svojstva filma. Lignin povećava AO karagenana : dodatkom 15 % lignina AO aktivnost od 43 % (DPPH metoda), dok povećanjem na 30 % lignina smanjuje se AO aktivnost, vjerojatno zbog aglomeracije neumreženog lignina. Inhibicija <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> . | Nedefiniran proizvod |

AO – antioksidacijska aktivnost; **ABTS** (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin-6-sulfonska kiselina) i **DPPH** (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) - spektrofotometrijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti; **TVB – N** – ukupni hlapljivi bazični dušik

2.4.1. Plastifikatori

Iako je karagenan dobro poznat po svojoj sposobnosti formiranja filma s izvrsnim optičkim svojstvima, filmovi od čistog karagenana pokazuju krhkost koja ograničava njihovu funkcionalnost u primjenama pakiranja hrane. Stoga je dodavanje plastifikatora osnovni zahtjev u formulaciji za poboljšanje fleksibilnosti i obradivosti filma (Sedayu i sur., 2019), kao i za poboljšanje njegovih strukturnih i mehaničkih svojstava te za mogućnost pružanja aktivnih funkcija (Božanić i sur., 2022).

Općenito, plastifikatori su hidrofilne molekule i dodaju se materijalima koji tvore filmove i prevlake. Plastifikatori povećavaju otpornost filmova na propusnost vodene pare i plinova te poboljšavaju njihovu fleksibilnost. Međutim, dodavanje plastifikatora u visokim koncentracijama može povećati razmak među molekulama i smanjiti mehaničku čvrstoću filma (Cheng i sur., 2022). Ovisno o željenim svojstvima filma dodaje se odgovarajući plastifikator, a najčešće se koristi glicerol (Božanić i sur., 2022).

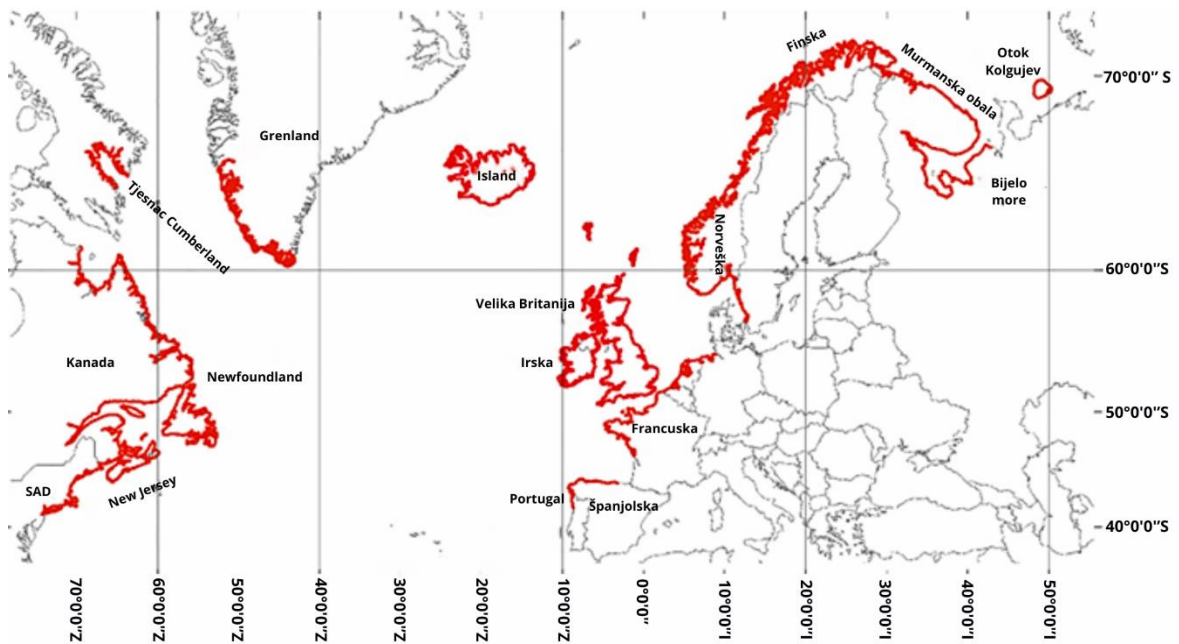
Prema jednom istraživanju, dodatak glicerola kao plastifikatora u jestive prevlake smanjio je gubitak vlage kod voća i povrća (Salehi, 2020). Dodatkom 20 % glicerola (m/m) u

otopine jestivih prevlaka koje sadrže 1 % prirodne gume (kitozan, alginat, ksantan, gelan, mesquite, psyllium, sjemenke bosiljka, guar, tragakant i arapska guma) značajno se smanjio gubitak mase proizvoda koji se pripisuje udjelu vode u uzorku, odnosno nije došlo do dehidracije.

Plastifikatori povećavaju rastezljivost i smanjuju krhkost filma, što je važna karakteristika za primjenu u pakiranju (Hauzoukim i Mohanty, 2020). Hidroksilne skupine plastifikatora tvore vodikove veze s biopolimerima te utječu na slobodni volumen i fleksibilnost polimernog matriks (Božanić i sur., 2022). Plastifikatori trebaju biti kompatibilni s polimerom i imati sličnu topljivost u korištenom otapalu kako bi se osiguralo optimalno vezivanje (umrežavanje) polimernih lanaca. Uočeno je da se mehanička čvrstoća filma postiže kod onih formulacija kod kojih su prisutne vodikove međumolekulske veze (Sedayu i sur., 2019).

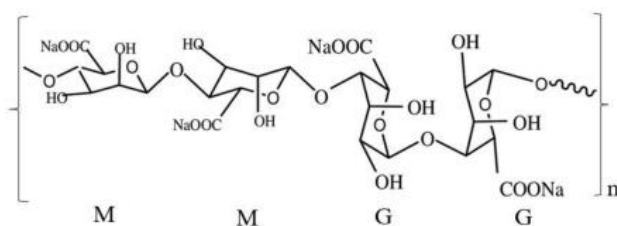
2.5. SMEĐA ALGA *Ascophyllum nodosum*

Ekološka važnost makroalgi odavno je prepoznata, jer one pružaju mnoge ključne uloge u ekosustavu (Lauzon-Guay i sur., 2021). *Ascophyllum nodosum* (L.) *Le Jolis* je najviše istražena smeđa morska alga (Kumari i sur., 2023). Ova makroalga uobičajenog je izgleda sa maslinasto smeđim listovima koji mogu izgledati žućkasto kada su pod stresom (Pereira i sur., 2020). Višestanični je, makroskopski organizam koji se nalazi u obalnim morskim ekosustavima te je bogat izvor polisaharida, polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), enzima i bioaktivnih peptida (Shukla i sur., 2019). Nekoliko važnijih polisaharida koji se u najvećoj koncentraciji nalaze u sastavu smeđih morskih algi su fukoidani, alginat i laminarin. Ovi polisaharidi su bitne komponente staničnih stijenki smeđih algi i imaju različite biološke aktivnosti i potencijalne primjene. Procijenjeno je da makroalge zauzimaju preko 6 milijuna km² morskog dna, od čega se 13.000 km² nalazi u obalnom pojasu (Lauzon-Guay i sur., 2021). *Ascophyllum nodosum* česta je vrsta makroalge u obalnom pojasu oko periferije sjevernog Atlantskog oceana. Osobito je rasprostranjena na sjeverozapadnoj obali Europe od Svalbarda do Portugala, uključujući istočni Grenland, Island i sjeveroistočnu obalu Sjedinjenih Američkih Država, od New Yorka do Newfoundlanda. (Pereira i sur., 2020). Rasprostranjenost alge *Ascophyllum nodosum* prikazana je na slici 4.



Slika 4. Rasprostranjenost alge *Ascophyllum nodosum* (prema Pereira i sur., 2020)

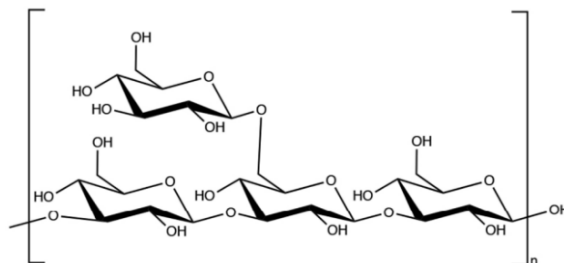
Alginati su polisaharidi dobiveni iz alginske kiseline te njenih derivata i soli, a u sastavu smeđih morskih algi nalaze se u količini do 40 % suhe tvari. Osnovna su tvar koja tvori staničnu strukturu smeđih algi, a sastoje se od izmjeničnih blokova β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline, zbog čega pokazuju sposobnost formiranja jestivih filmova (Ali i sur., 2024; Lomartire i sur., 2022). Kemijska struktura alginata prikazana je na slici 5. Pregledom znanstvene literature uočeno je da su do sada objavljena mnoga istraživanja o kombinaciji alginata i drugih polisaharida. Upravo alginat posjeduje potrebna svojstva za inkorporaciju aktivnih sastojaka i kombinaciju s κ -karagenanom u svrhu poboljšanja njegovih karakteristika (Prasetyaningrum i sur., 2021).



Slika 5. Kemijska struktura alginata: rezidue β -D-manuronska kiseline (M) i α -L-guluronske kiseline (G) (prema Prasetyaningrum i sur., 2021)

Jedan od glavnih sastojaka *A. nodosum*, laminarin, pokazuje snažnu antimikrobnu u protiv *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus* (Kumari, 2023). Prema dosadašnjim istraživanjima, laminarin se također koristio zbog dokazanih terapijskih svojstava kao što su protuupalne, antitumorske, antioksidativne i

antikoagulativne aktivnosti. Nadalje, različite studije opisale su potencijal laminarina kao izvora dijetalnih vlakana i modulatora gastrointestinalnog metabolizma. Laminarin se sastoji od β -glukana povezanih (1,3) i (1,6) glikozidnim vezama (Zargarzadeh i sur., 2020). Kemijska struktura laminarina prikazana je na slici 6.



Slika 6. Kemijska struktura laminarina (prema Zargarzadeh i sur., 2020)

Morske alge imaju čestu primjenu u pakiranju hrane, kulinarstvu i biomedicinskim primjenama zbog svoje biokompatibilnosti, apsorpcijskih svojstava i biorazgradivosti te pokazivanja antimikrobnog potencijala (Ali i sur., 2024). Detaljan prosječni sastav *Ascophyllum nodosum* prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Prosječni sastav *Ascophyllum nodosum* (prema Pereira i sur., 2020)

| Sastav | Sadržaj | Sastav | Sadržaj |
|-------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Voda | 12–15 % | Celuloza | 8 % |
| Pepeo | 17–20 % | Proteini | 5–10 % |
| Alginska kiselina | 20–29 % | Fukoidan | 19 % |
| Manitol | 5–8 % | Karoten | 30–60 mg kg ⁻¹ |
| Laminarin | 2–36 % | Vitamin C | 500–200 mg kg ⁻¹ |
| S | 2,5–3,5 % | Vitamin A | 30–60 mg kg ⁻¹ |
| K | 2–3 % | Tokoferol | 150–300 % |
| Cl | 3.1–4.4 % | Folična kiselina | 0,1–0,5 mg kg ⁻¹ |
| Na | 3–4 % | Folinična kiselina | 0,1–0,5 mg kg ⁻¹ |
| Mg | 0,5–0,9 % | Vitamin B1 | 15 mg kg ⁻¹ |
| Ca | 1–3 % | Vitamin B2 | 5–10 % |
| P | 0,1–1,15 % | Vitamin B3 | 10–30 %; 19 mg kg ⁻¹ |
| B | 40–100 mg kg ⁻¹ | Vitamin B6 | <1 mg kg ⁻¹ |
| Co | 1–10 mg kg ⁻¹ | Vitamin B7 | 0,1–0,4 mg kg ⁻¹ |
| Fe | 150–1000 mg kg ⁻¹ | Vitamin B12 | 0,004 % |
| Mn | 10–50 mg kg ⁻¹ | Vitamin K | 10 mg kg ⁻¹ |
| I | 700–1200 mg kg ⁻¹ | Ni | 2–5 mg kg ⁻¹ |

| | | | |
|----|----------------------------|----|---------------------------|
| Zn | 50–200 mg kg ⁻¹ | Ba | 15–50 mg kg ⁻¹ |
| Mo | 0,3–1 mg kg ⁻¹ | | |

Osim polisaharida, u sastavu *Ascophyllum nodosum* nalazi se i skupina jedinstvenih fenolnih spojeva, florotanina. Florotanini su jedinstveni fenolni spojevi koje proizvode smeđe alge te predstavljaju jedne od najzanimljivijih bioaktivnih metabolita algi. Ove molekule su oligomeri i polimeri floroglucinola (1,3,5-trihidroksibenzena), s velikim varijacijama u strukturi i stupnju polimerizacije. Najviše vrijednosti pronađene su kod algi iz reda *Fucales*, kod rodova *Fucus*, *Ascophyllum* i *Carpophyllum*. Florotanini pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost, keliraju teške metale i sudjeluju u procesima zacjeljivanja rana kod smeđih algi. Njihova najistaknutija i najistraženija funkcija je doprinos kemijskoj obrani smeđih algi od štetnih mikroorganizama. Florotanini imaju antibiotske učinke protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, patogenog kvasca, drugih mikroskopskih gljiva i mikroalgi (Lemesheva i sur., 2023).

Dodatak algi u polimere rezultira promjenom mehaničkih, termalnih, optičkih i kemijskih svojstava materijala, dodatnu zaštitu proizvoda od mikrobiološke kontaminacije, s posebnim naglaskom na potencijalni razvoj aktivne ambalaže (Lomartire i sur., 2022).

2.6. ZAKONSKA REGULATIVA

Sigurnost hrane ključan je cilj u zakonskoj regulativi prehrambenih proizvoda. Potrošači teže konzumaciji prirodnih, minimalno prerađenih i praktičnih prehrambenih proizvoda (Bizymis i Tzia, 2021). Zakoni koji reguliraju kontrolu kvalitete ambalaže u odnosu na interakciju s prehrambenim proizvodima kompleksni su zbog raznolikosti ambalaže, materijala, oblika, dodataka te karakteristika hrane. Prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*), kontaminacija proizvoda može nastati reciklažom ambalaže, izlaganjem štetnim tvarima iz ambalažnih materijala ili tijekom tretmana (npr. toplinskog ili kemijskog) (Lähteenmäki-Uutela i sur., 2021).

Zabrinutost za sigurnost hrane dovela je do razvoja sustava upravljanja sigurnošću hrane, koji obuhvaća regulatorno zakonodavstvo s javnim standardima i dobrovoljne mjere privatnog sektora. U Europskoj uniji subjekti u poslovanju s hranom i hranom za životinje zakonski su odgovorni za usklađenost sa zahtjevima sigurnosti hrane u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije (Banach i sur., 2020).

Hrvatsko zakonodavstvo usklađeno je s europskim direktivama, a ključni pravni akti koji reguliraju ambalažu i materijale za pakiranje hrane uključuju sljedeće propise:

- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN 125/2009);
- Pravilnika o ambalaži i otpadnoj ambalaži, plastičnim proizvodima za jednokratnu upotrebu i ribolovnom alatu koji sadržava plastiku (NN 137/2023);
- Zakon o prehranbenim aditivima, aromama i prehranbenim enzimima (NN 39/2013 i 114/18);
- Uredba (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehranbenim aditivima;
- Pozitivna lista aditiva unutar Uredbe (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehranbenim aditivima;
- Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane;
- Uredba (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.

Svi navedeni dokumenti moraju biti usklađeni s europskim standardima i zahtjevima za sigurnost i kvalitetu prehranbenih proizvoda. Ipak, zakonodavni okviri i primjena pravila za ambalažu i materijale za pakiranje hrane nisu jednaki u svim zemljama. Iako EU postavlja opće smjernice i minimalne standarde kroz direktive i uredbe, svaka država članica može uvesti dodatne nacionalne zahtjeve ili prilagoditi implementaciju pravila prema svojim specifičnim potrebama i prioritetima. Ova varijabilnost dovodi do toga da se pravila i standardi za ambalažu razlikuju između zemalja, posebno u pogledu materijala, označavanja i recikliranja ambalaže.

Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. postavlja temeljne principe i uvjete zakonodavstva o hrani unutar Europske unije, s ciljem osiguravanja visokih standarda sigurnosti hrane, zaštite zdravlja ljudi i potrošača te omogućavanja slobode kretanja hrane unutar unutarnjeg tržišta EU. Uredba također teži povećanju povjerenja potrošača u sigurnost i kvalitetu hrane te jačanju sustava za upravljanje sigurnošću hrane među državama članicama. Glavne odredbe Uredbe uključuju propisivanje općih načela sigurnosti hrane, koja nalažu obavezu proizvođača da osiguraju da je hrana sigurna za potrošnju. Uredba uvodi sustav za identifikaciju, procjenu i upravljanje rizicima povezanim s hranom, uz znanstvenu podršku Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA). Također se propisuje obaveza operatera u prehranbenom lancu da osiguraju praćenje hrane i mogućnost

povlačenja proizvoda s tržišta u slučaju da se utvrdi da su nesigurni. Uredba naglašava važnost pravilnog označavanja hrane, uključujući informacije o sastavu, alergijama i podrijetlu. Osniva se Europska agencija za sigurnost hrane, koja je zadužena za pružanje neovisnih znanstvenih procjena i komunikaciju rizika vezanih uz sigurnost hrane. Osim toga, predviđa se uspostavljanje sustava za informiranje i obavješćavanje potrošača i državnih vlasti o rizicima vezanim uz sigurnost hrane. Ova uredba igra ključnu ulogu u oblikovanju zakonodavstva o hrani u EU i postavlja temelje za daljnje regulative koje se odnose na sigurnost hrane.

Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN 125/2009), ambalaža za pakiranje hrane mora zadovoljiti stroge kriterije kako bi se spriječio prijenos štetnih tvari na hranu i očuvala organoleptička svojstva poput okusa, mirisa i boje. Polimerni materijali koji su u dodiru s hranom moraju biti stabilni i zdravstveno ispravni, dok polietilenske folije niske gustoće, ako se koriste za aromatičnu hranu, trebaju biti laminirane kako bi osigurale nepropusnost za kisik i svjetlost te tako očuvale rok trajanja proizvoda. Regenerirana celulozna folija i papirna ambalaža moraju zadovoljavati standarde migracije i biti proizvedene prema pravilima dobre proizvođačke prakse kako bi se spriječio prijenos antimikrobnih tvari na hranu. Metalna ambalaža, poput limenki i cisterni, mora sadržavati zaštitne prevlake koje neće povećati sadržaj teških metala niti negativno utjecati na hranu. Dodatno, inteligentna i aktivna ambalaža omogućuju produženje svježine proizvoda kroz apsorpciju ili otpuštanje određenih tvari, dok inteligentni materijali prikazuju stvarno stanje hrane. Ovi aktivni i inteligentni dijelovi moraju biti jasno označeni kao nejestivi, a ljepljiva korištena u višeslojnim folijama moraju zadovoljiti zahtjeve u vezi s migracijom tvari, čime se dodatno osigurava čistoća hrane.

Glavni ciljevi Pravilnika o ambalaži i otpadnoj ambalaži, plastičnim proizvodima za jednokratnu upotrebu i ribolovnom alatu koji sadržava plastiku (NN 137/2023) su sprječavanje nastanka ambalažnog otpada, poticanje ponovne uporabe, recikliranja i drugih oblika uporabe ambalažnog otpada, te smanjenje konačnog odlaganja otpada. Pravilnik također teži prijelazu na kružno gospodarstvo, smanjujući negativan utjecaj ambalaže na okoliš, osobito vodenih ekosustava, kao i na zdravlje ljudi. Na taj način promiče usklađivanje poslovnih praksi s načelima održivosti i osigurava usklađenost s propisima EU, čime se omogućava funkcioniranje jedinstvenog tržišta bez prepreka u trgovini i konkurenciji.

Zakon o prehranbenim aditivima, aromama i prehranbenim enzimima (NN 39/2013 i 114/18) usklađuje nacionalno zakonodavstvo s pravilima Europske unije, osiguravajući sigurnost i kvalitetu prehranbenih proizvoda kroz regulaciju korištenja aditiva, aromatskih tvari i enzima. Uredba (EZ) br. 1333/2008 detaljno propisuje uvjete pod kojima se prehranbeni aditivi mogu koristiti, kao i zahtjeve za označavanje i praćenje njihovih učinaka na zdravlje

potrošača. U skladu s tim, pozitivna lista aditiva sadrži tvari koje su odobrene za upotrebu, nakon što su prošle znanstvenu procjenu i potvrđene kao sigurne, čime se dodatno osigurava transparentnost i povjerenje potrošača. Ova usklađenost i regulacija osiguravaju da su prehrambeni aditivi korišteni u skladu s visokim standardima sigurnosti, čime se štiti zdravlje potrošača i poboljšava kvaliteta hrane.

Navedene uredbe i pravilnici zajednički osiguravaju visoke standarde sigurnosti hrane, reguliraju korištenje aditiva, jamče zdravstvenu ispravnost materijala u kontaktu s hranom i potiču održivo upravljanje otpadom, čime se štiti zdravlje potrošača i okoliš. Ova kompleksna mreža zakonskih okvira stvara temelj za sigurnu prehrambenu industriju u Hrvatskoj i Europskoj uniji.

2.7. BUDUĆE PERSPEKTIVE

Upotreba biomaterijala za pakiranje hrane mogla bi dovesti do smanjenja globalnog plastičnog zagađenja, koje godišnje stvara 300 milijuna tona plastičnog otpada (Lomartire i sur., 2022). S druge strane biorazgradivost vodi ka kraćem roku trajanja zaštitne funkcije filma i/ili prevlaka u usporedbi sa konvencionalnim pakiranjima. Zbog toga predstavljaju izazov za proizvođače koji žele da njihovi proizvodi imaju mogućnost duljeg opstanka na tržištu (Božanić i sur., 2022). Ranija istraživanja (Sedayu i sur., 2019) razmatrala su načine poboljšanja svojstava filmova i prevlaka na bazi karagenana, uključujući njihov razvoj kao održivog pakiranja za hranu. Od tada, sve su učestalija istraživanja karagenanskih filmova u pakiranju hrane te razvoj nanokompozitnih filmova na bazi karagenana s aktivnim i inteligentnim funkcijama za realnu primjenu. Jestivi filmovi i prevlake odlikuju se visokom biokompatibilnošću, netoksičnošću te su povoljni za okoliš (Božanić i sur., 2022). Takvi materijali imaju potencijal za širenje uporabe u pakiranju hrane, a zaključci ovih studija mogli bi pomoći daljnjem razvoju ekološki prihvatljivog pakiranja na bazi algi (Ramadas i sur., 2024).

Uzgoj morskih algi koje se koriste za dobivanje karagenana, suočava se s izazovima poput predacije biljojeda, oluja, parazitskih epifita i izbijanja bolesti. Izbijanja bolesti ozbiljan su problem jer dovode do pada prinosa i smanjenja kvalitete karagenana. Potrebno je razviti otpornije sojeve morske alge, koji će pružiti veću otpornost na promjene u okolišu i bolje prinose. Premda filmovi na bazi algi obećavaju daljnji razvoj u proizvode visoke dodane vrijednosti, još uvijek su u ranoj fazi razvoja za komercijalnu primjenu. Glavne prepreke prihvaćanju uključuju kvalitetu i ekonomsku isplativost, jer se moraju natjecati s konvencionalnim ambalažnim materijalima (Sedayu i sur., 2019).

Istraživanja tržišta jestivih filmova i prevlaka ukazuju na potrebu stalnog prilagođavanja i brze primjene inovacija kako bi se zadržala konkurentnost na tržištu (Kurek i sur., 2022). Potrebna su kontinuirana istraživanja kako bi se smanjili troškovi implementacije prirodnih materijala te potaknule industrijska ulaganja i daljnje studije za razvoj ovih održivih tehnologija. Unatoč tome, cijena bioplastike stabilnija je od cijene plastičnih materijala na bazi fosilnih goriva, budući da cijene biomase manje fluktuiraju od cijena nafte (Sedayu i sur., 2019). Potencijal bioaktivnih spojeva dobivenih iz algi izaziva veliko zanimanje za razvoj održive i ekološki prihvatljive bioplastike, koja se smatra rješenjem za zamjenu plastike na bazi nafte i smanjenje velike proizvodnje plastičnog otpada (Lomartire i sur., 2022).

Iako je u posljednjih 10 godina provedeno mnogo istraživanja na ovu temu, primjena ovih materijala uglavnom je ostala na laboratorijskoj razini, s ograničenom industrijalizacijom. Prema istraživanju Zhao i sur. (2021), budući trendovi istraživanja i primjene usmjereni su na nekoliko glavnih područja:

- Istraživanje novih izvora polisaharida pogodnih za korištenje u prehrambene svrhe, poput bakterija i gljiva, s posebnim naglaskom na morske mikroorganizme,
- višenamjenska modifikacija materijala na bazi polisaharida koja će poboljšati trenutne karakteristike, uz održavanje stabilnosti, sigurnosti, i niske cijene,
- proširenje primjene polisaharidnih materijala i sveobuhvatna evaluacija dosadašnjih istraživanja u svrhu smanjenja troškova i povećanja proizvodnje te procjena ekonomske, ekološke i društvene koristi ovih materijala koristeći teorijski model procjene održivosti životnog ciklusa,
- sigurnosna procjena rizika upotrebe polisaharidnih materijala zbog potrebe za boljim razumijevanjem migracije polisaharida u hranu, njihove interakcije s prehrambenim komponentama i učinke nakon konzumacije, čime će se potvrditi sigurnost ovih materijala za komercijalne svrhe te dati smjernice za unos u prehrani.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za izradu jestivih filmova kao osnovni materijali korišteni su iota – karagenan (i-karagenan , Alfa Aesar, Biovit, Zagreb, Hrvatska) i prah jestive smeđe alge *Ascophyllum nodosum* (kelp alga *Ascophyllum nodosum*, Galeria internazionale d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Kao plastifikator korišten je glicerol (biljni glicerol Raws, 99,5 %, E422, Dekorativna točka d.o.o., Poznanovec, Hrvatska). Korišteno otpalo je destilirana voda. Za mjerenje udjela ukupnih fenola korišten je Folin – Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) te zasićena otopina Na₂CO₃ (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska). Za potrebe provođenja metoda mjerenja udjela antioksidacijske aktivnosti korištena je otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka). Prilikom pripreme FRAP reagensa korišteni su sljedeći reagensi: klorovodična kiselina, 40 mM (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka), TPTZ, 10 mM (2,4,6-tripiridil-s-triazin, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka), otopina željezovog (III) klorida heksahidrata (FeCl₃ x 6 H₂O, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i acetatni pufer 0,3 M, pH 3,6 (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Republika Češka).

3.2. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA

Otopina karagenana (CAR, A) dobivena je otapanjem 1,5 g praha karagenana u 100 mL demineralizirane vode kako bi se dobila 1,5 % (*m/V*) otopina za formiranje filma. Otopina karagenana (CAR, B) dobivena je otapanjem 3,0 g praha karagenana u 100 mL demineralizirane vode kako bi se dobila 3,0 % (*m/V*) otopina za formiranje filma. Sve filmogene otopine zagrijavane su uz miješanje do postizanja konstantne temperature od 70 °C na kojoj su miješane 10 minuta. Filmogene otopine karagenana s dodatkom alge (*A. nodosum*) dobivene su dodatkom praha alge u količini od 0,05 % (A0,5G, A0,5, B0,5G, B0,5), 0,5 % (A5G, A5, B5G, B5) i 1 % (A1, A1G, B1, B1G) mase alge u odnosu na suhu tvar polimera. Prah alge dodaje se u prethodno pripremljenu otopinu karagenana. Otopina karagenana sa dodatkom alge se homogenizira tijekom 10 min pri 10000 rpm i sobnoj temperaturi (23±2 °C) na homogenizatoru (IKA Ultra turax T18), te nastavlja miješati tijekom 30 min na magnetskoj miješalici kako bi se osiguralo što uniformiranije dispergiranje alge u filmogenoj otopini. Optimalno dispergiranje/miješanje je važno kako bi moglo doći do uniformiranog umrežavanja aktivnog dodataka (alga) i polimera, te utječe na mješivost i stabilnost otopine biopolimera.

Nadalje, ovisno o kvaliteti filmogene otopine, ovisiti će i karakteristike osušenog filma ili kvaliteta prevlake nanešene na proizvod (npr. ribu).

U idućem koraku dodaje se plastifikator, glicerol, u koncentraciji od 20 % (m/m suha tvar polimera), te se filmogena otopina miješa tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C) na magnetskoj miješalici. Svježe pripravljene filmogene otopine koriste se za njihovu karakterizaciju (pH i viskoznost, opis metode dalje u radu).

Točno određena količina pripravljene otopine (prema preliminarnim istraživanjima u laboratoriju za pakiranje hrane postoji interni protokol za izlivanje filmogenih otopina) se izlije u plastične Petrijeve zdjelice određenih dimenzija. Sušenje se provodi u ventiliranoj klima komori (HPP110, Memmert, Njemačka; i BinderKBF240, Binder, Njemačka) pri kontroliranim uvjetima temperature od 30 °C i relativne vlažnosti 40 % tijekom 24 sata. Nakon sušenja filmovi se odvajaju s Petrijevih zdjelica i čuvaju u eksikatoru do provođenja mjerenja.

3.3. METODE KARAKTERIZACIJE

3.3.1. Karakterizacija filmogenih otopina

3.3.1.1. *Određivanje pH vrijednosti*

pH vrijednost određuje se uz pomoć pH metra FiveGO (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Mjerenje se vrši uranjanjem sonde pH metra u svježe pripravljenu otopinu filma. Po svakom uzorku provedena su 3 mjerenja, te se srednja vrijednost s standardnom devijacijom.

3.3.1.2. *Određivanje viskoznosti*

Za mjerenje viskoznosti biopolimernih otopina, pripravljene su svježe otopine čija je viskoznost potom mjerena na viskozimetru (Lamy Rheology RM 100 Plus, Champagne au Mont d'Or, Francuska). U mjerni cilindar viskozimetra ulije se 20 mL uzorka te se u cilindar uroni mjerno tijelo. Na ekranu uređaja odabere se program mjerenja MS-C-19-C i podesi se brzina smicanja. Mjerenje je provedeno pri brzinama smicanja od 250 do 1290 s⁻¹, na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C) i pri 70 °C (temperatura pripreme CAR) te su 3 paralele mjerenja provedene za svaki uzorak, a njihova srednja vrijednost je uzeta kao rezultat. Dobivene su vrijednosti viskoznosti (Pa s) i obrtne sile (mN m⁻¹).

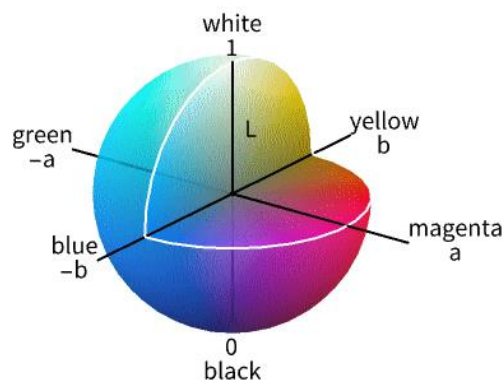
3.3.2. Karakterizacija filmova

3.3.2.1. Određivanje debljine filma

Za mjerenje debljine filmova korišten je digitalni mikrometar (Digimet, HP, Helios Preisser, Njemačka) preciznosti do 0,001 mm. Od svakog pripremljenog filma uzet je jedan uzorak kojem je izmjerena debljina na osam različita mjesta, a rezultat je prikazan kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom (μm).

3.3.2.2. Određivanje boje

Parametri boje filmova od karegenana mjere se kolorimetrom (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d, Langenhagen, Njemačka), koji radi na sistemu CIE $L^*a^*b^*$ prostornog modela. Takav sistem definira boju kroz tri parametra: L^* , a^* i b^* , koji se mogu prikazati u trodimenzionalnom prostoru. Parametar L^* označava svjetlinu, od prozirne ili bijele do crne boje, i prikazuje se kao vertikalna ili y-os s rasponom od 0 (crna) do 100 (bijela). Parametar a^* prikazuje raspon od zelene do crvene boje kao x-os, dok parametar b^* obuhvaća raspon od žute do plave boje i prikazuje se kao z-os (Brühl i Unbehend, 2021).



Slika 7. CIELAB dijagram (*prema Anonymous*)

Uređaj se kalibrira dodatkom za kalibraciju te se uzorak filma stavlja ispod otvora za mjerenje. Mjerenje se provodi na 10 različitih mjesta na svakom filmu, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

Mjerenjem L , a i b vrijednosti omogućeno je određivanje kolorimetrijske razlike (ΔE), kako je prikazano u jednadžbi [1], što odgovara ukupnoj razlici u boji. Ako je $\Delta E > 3$, promjena boje vidljiva je ljudskim okom.

$$\Delta E = \sqrt{(L1 - L0)^2 + (a1 - a0)^2 + (b1 - b0)^2} \quad [1]$$

gdje su:

L_0, a_0, b_0 - vrijednosti boje kontrolnog (referentnog) uzoraka u odnosu na kojeg se mjeri odstupanje;

L_1, a_1, b_1 - vrijednosti boje ispitivanoga uzorka (Kurek i sur., 2021).

3.3.2.3. Određivanje topljivosti i udjela vode u filmovima

Određivanje početnog udjela suhe tvari vrši se na način da se filmovi određenih dimenzija (2 x 2 cm) i mase (m_1) suše na 105 °C, do ustaljenja mase (m_2). Gubitak mase uzorka pripisuje se gubitku vode, te se kao takav prikazuje. Topljivost filmova definira se sadržajem suhe tvari otopljene u destiliranoj vodi, nakon uranjanja uzorka tijekom 24 h. Uzorci filma točno određene mase i udjela vode, urone se u 30 mL destilirane vode pri 23 ± 1 °C, tijekom 24 h. Ostaci neotopljenog uzorka se suše u sušioniku (pri 105 °C do ustaljenja mase), te se iz razlike u gubitku mase u odnosu na početnu suhu tvar izračuna udio otopljenog filma. Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost mjerenja s standardnom devijacijom.

3.3.2.4. Mjerenje propusnosti plinova kroz biopolimerni film

Mjerenje propusnosti filmova na plinove provedeno je manometrijskom metodom na uređaju za mjerenje propusnosti Brugger, GDP - C (Brugger Feinmechanik GmbH, Munich, Njemačka). Metoda nalaže da se plin propušta kroz uzorak koji je postavljen kao barijera između dva dijela permeacijske ćelije, do kad se tlak ne izjednači s gornje i s donje strane. Prije mjerenja provodi se evakuacija zraka iz mjernog volumena vakuum pumpom, a vrijeme trajanja ovisi o tipu mjerenog materijala. Nakon što je zrak evakuiran, pod atmosferskim tlakom propušta se ispitivani plin (O_2 ili CO_2) kroz jednu stranu uzorka. Plin difundira kroz uzorak filma, što se registrira kao postepeni porast tlaka. Rezultati su zabilježeni na računalu i prikazani kao vrijednost permeacije (izražena u $cm^3 m^{-2} d^{-1} bar^{-1}$). Koeficijent propusnosti kisika (PO_2) i ugljikovog dioksida (PCO_2) (izražen u $cm^3 m^{-1} d^{-1} Pa^{-1}$) izračunata je kao aritmetički produkt dobivene permeacije i srednje vrijednosti debljine filma [2] i [3]:

$$PO_2 = q \cdot d \quad [2]$$

odnosno

$$PCO_2 = q \cdot d \quad [3]$$

gdje je:

q = permeanca ($cm^3 m^{-2} d^{-1} bar^{-1}$),

d = debljina filma (μm).

3.3.2.5. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz biopolimerni film

Propusnost filmova na vodenu paru (WVP) mjeri se gravimetrijski, prema ASTM (eng. *American Society for Testing and Materials*) E96 - 80 standardnoj metodi (ASTM, 1980), koja je prilagođena za jestive materijale (Debeaufort i sur., 1993). Uzorci filmova izrežu se u obliku kruga (promjera 41 mm) te se postavljaju na vrh mjernih staklenih čašica napunjenih 20 mL destilirane vode (kako bi se postigla RH od 100 %). Na rub otvora mjerne čašice nanosi se vakuumska mast na koju se postavlja teflonski prsten, a nakon njega pripremljeni uzorak filma koji potom učvrsti drugim teflonskim prstenom i poklopcem čašice. Tijekom rukovanja uzorcima potrebno je koristiti zaštitne rukavice. Uzorci se čuvaju u ventiliranoj klima komori (BinderKBF240, Binder, Njemačka) pri RH 30 % i temperaturi od 23 °C. S obzirom da je s unutarnje strane mjerne čašice destilirana voda (100 % RH) a s vanjske strane u klima komori RH 30 %, mjerni gradijent RH je 70 %. Uzorci se važu jednom na dan, kroz 8 dana na analitičkoj vagi (KERN ABS320-4N, KERN&SOHN GmbH, Balingen, Njemačka) s preciznošću od 0,0001 g.

Propusnost na vodenu paru WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) izračunata je iz promjene mase mjerne čašice u odnosu na vrijeme u stacionarnom stanju, prema izrazu [4].

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [4]$$

gdje je:

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

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

x – debljina filma (m);

Δp – razlika tlaka vodene pare između dvije strana filma (Pa).

3.3.2.6. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti, aktivni sastojci se prvo ekstrahiraju iz filmova. Ekstrakcija se provodi u vodi, uranjanjem točno određene mase filma u destiliranu vodu, tijekom 24-48 h. Za potrebe mjerenja, uzima se supernatant.

Određivanje ukupnih fenola provodi se spektrofotometrijski, korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Ova metoda temelji se na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj fenolne tvari reducira Folin-Ciocalteu reagens, pri čemu se stvara plavo obojenje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji fenola

i mjeri se pri 765 nm. U staklene epruvete se dodaje 400 μ L FC reagensa, 2,6 mL deionizirane vode te 400 μ L otopine filmova iz kojih je ekstrahirana aktivna komponenta u vodi. Nakon 3 minute, dodaje se 800 μ L zasićene otopine Na_2CO_3 , a uzorci se promiješaju na tresilici. Zatim se uzorci termostatiraju u vodenoj kupelji pri 50 °C tijekom 40 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija na 765 nm. Slijepa proba priprema se na identičan način kao uzorci, osim što umjesto ekstrakta sadrži istu količinu otapala za ekstrakciju, odnosno destiliranu vodu, te služi kao kontrola. Korištenjem krivulje baždarnog pravca izračunava se udio ukupnih fenola (mg TCP / g filma).

3.3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijska aktivnost (kapacitet) je određena uz pomoć dvije metode:

- a) DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda koristi se za procjenu antioksidativne aktivnosti spojeva temeljem sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Pripremljene su 3 vodene otopine alge različitih koncentracija (0,0576 g/100 mL; 0,0107 g/100 mL; 0,1067 g/100 mL). Uzorci filma određenih dimenzija i mase (1 x 2 cm i približno 0,1 g) se smještaju u staklene epruvete i uranjaju u 0,15 mM otopinu DPPH na sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta, zaštićeni od svjetlosti. Reakcijom antioksidansa s DPPH radikalima formiraju se stabilne molekule, što uzrokuje promjenu boje otopine iz tamnoljubičaste u blijedožutu. Intenzitet ljubičaste boje DPPH otopine obrnuto je proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti uzoraka. Kontrolni uzorak sadržava isključivo otopinu DPPH. Nakon 90 minuta, apsorbancija se mjeri na 517 nm. Postotak inhibicije izračunava se prema sljedećem izrazu [5]:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \% \quad [5]$$

gdje su:

A_0 - apsorbancija kontrole;

A_1 – apsorbancija uzorka.

- b) FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPZP) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP reagens pripremljen je miješanjem 0,3 M acetatnog pufera (pH 3,6) sa 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (TPTZ) i 20 mM otopinom $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u omjeru 10:1:1 po volumenu. Točno 300 μ L otopine uzorka filma pomiješano je s 2225 μ L FRAP reagensa i inkubirano na 37 °C tijekom 10 minuta. Nakon toga izmjerena je apsorbancija na 593 nm. Za slijepu probu korišteno je 300 μ L otapala

korištenog za ekstrakciju umjesto ekstrakta. Uzorke je potrebno razrijediti tako da apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima budu u rasponu od 0,1 do 0,9. Za izračune je korištena krivulja standarda askorbinske kiseline, vrijednosti su izražene u mg ekvivalenata askorbinske kiseline (AAE) po masi pripremljenog uzorka filma. Askorbinska kiselina može prihvatiti 2 elektrona, a redukcija iona željeza zahtijeva 1 elektron, stoga su svi rezultati iz krivulja pomnoženi s 2. Za svaki uzorak izmjerene su 4 paralele.

3.4. OBRADA PODATAKA

Statistička analiza podataka provedena je analizom varijance (ANOVA) pomoću Xlstat - Pro 7.5.3. (Addinsoft, SAD). Podaci su rangirani i statističke razlike su ocijenjene u redovima s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukey - ovim višestrukim usporednim testovima. U svim slučajevima vrijednost $p < 0,05$ se smatra statistički značajnom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog rada pripremljeni su biorazgradivi filmovi na bazi karagenana te kompozitni filmovi koji su dobiveni miješanjem karagenana i glicerola sa i bez dodatka smeđe alge kelp (*Ascophyllum nodosum*). Određivani su fizikalno – kemijski parametri filmogenih otopina (pH, viskoznost), debljina filmova, te barijerni (propusnost plinova i vodene pare) i optički (boja) parametri. Nadalje, određen je udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost filmova kako bi se procijenila funkcionalnost filmova te mogućnost daljnje primjene za pakiranje prehrambenih proizvoda, s naglaskom na ribu. Dobiveni rezultati su prikazani tablično i grafički.

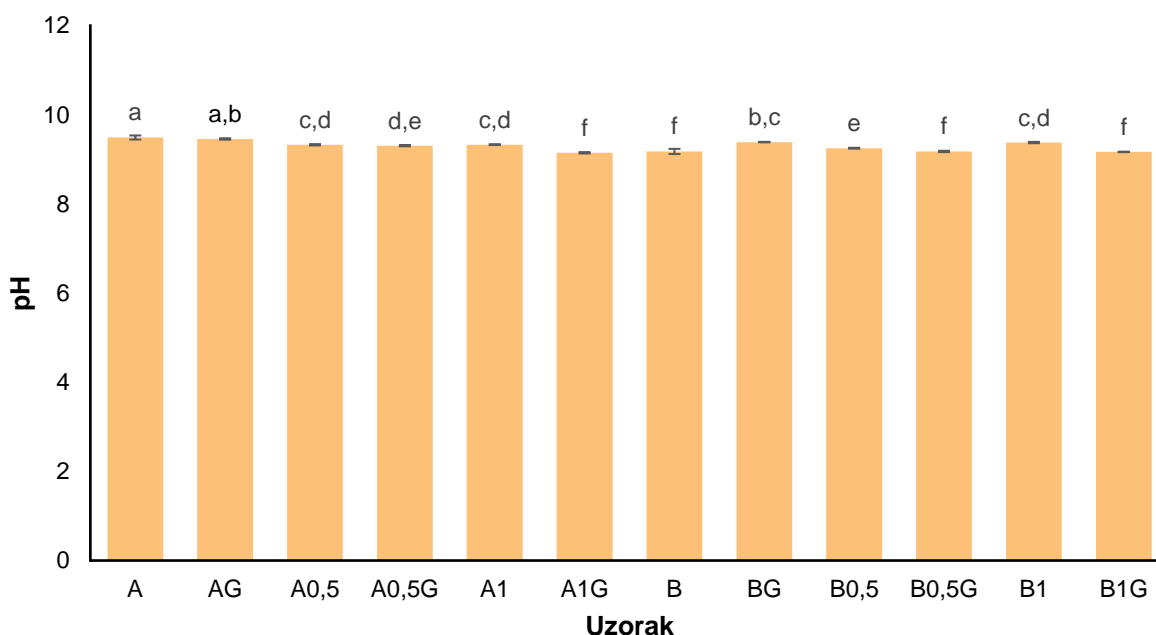
4.1. pH I VISKOZNOST OTOPINA BIOPOLIMERA

Poznavanje pH vrijednosti filmogenih otopina je važna karakteristika s obzirom da može utjecati na umrežavanja i pakiranje polimernih lanaca u kristalnoj rešetci te samim time na fizikalno-kemijska svojstva suhih filmova. Nadalje, utječe na elektrostatiku sustava odnosno stvaranje poielektrolitskih kompleksa tijekom stvaranja veza kompatibilnih polimera točno određenog elektrostatskog naboja pri određenim pH vrijednostima. Naime, gustoća površinskog naboja i jačina električnog polja biopolimera mogu biti pod utjecajem kiselosti ili lužnatosti otopine, što znači da elektrostatičke sile igraju ključnu ulogu u interakcijama između proteina i polisaharida (Lu i sur., 2020). Vrijednosti pH metra prikazuju koncentraciju vodikovih iona u korištenim uzorcima, a poznavanje pH filmogene otopine koja stvara film ključno je za predviđanje određenih svojstava filma nakon sušenja, poput boje, topljivosti i mogućnosti stvaranja blenda.

Rezultati pH vrijednosti filmogenih otopina, prikazani na slici 8., pokazuju da se pH vrijednosti svih otopina kreću između pH 9,1 i pH 9,5, što ukazuje na to da su otopine lužnate. Prema tome, karagenan ima lužnatu prirodu jer su otopine pripremljene u destiliranoj vodi, koja je neutralna. Najviša pH vrijednost izmjerena je kod uzorka A, dok je najniža pH vrijednost izmjerena kod B1. Ovaj rezultat upućuje na to da alga smanjuje pH vrijednost, što je u skladu sa svojstvima njenih polisaharidnih komponenti koji, prema istraživanju Abka-khajouei i sur. (2022), imaju sklonost stvaranju vodikovih veza sa slobodnim vodikovim ionima u otopini i na taj način smanjiti pH vrijednost.

Kada usporedimo A i B seriju uzoraka, B uzorci imaju nižu pH vrijednost. S obzirom da se otopine razlikuju u koncentraciji karagenana, može se zaključiti da razlike u koncentraciji utječu na pH vrijednost otopine, odnosno povišenjem koncentracije karagenana dolazi do smanjenja pH filmogene otopine.

Viskoznost se definira kao fizikalna veličina koja nastaje unutar tekućine uslijed trenja pri kretanju čestica, te opisuje otpor koji tekućina pruža prilikom strujanja (Moares i Hilliou, 2024). Viskoznost otopina karagenana osjetljiva je na pH zbog promjena u stabilnosti sulfatnih skupina i međulančanih interakcija. U kiselim uvjetima (nizak pH), može doći do hidrolize biopolimernih lanaca, što smanjuje viskoznost. Suprotno niskom pH, u lužnatim uvjetima (visok pH), može doći do destabilizacije polimernih lanaca ovisno o prisutnim ionima i temperaturi (Gao i sur, 2024). Viskoznost karagenana također ovisi o sadržaju sulfata. Što je sadržaj sulfata manji, to je viskoznost manja, dok konzistencija gela raste. Sposobnost geliranja kappa i iota karagenana dolazi do izražaja kada se vruća otopina ohladi, zbog prisutnosti 3,6-anhidrogalaktoze (Fransiska i sur., 2021).

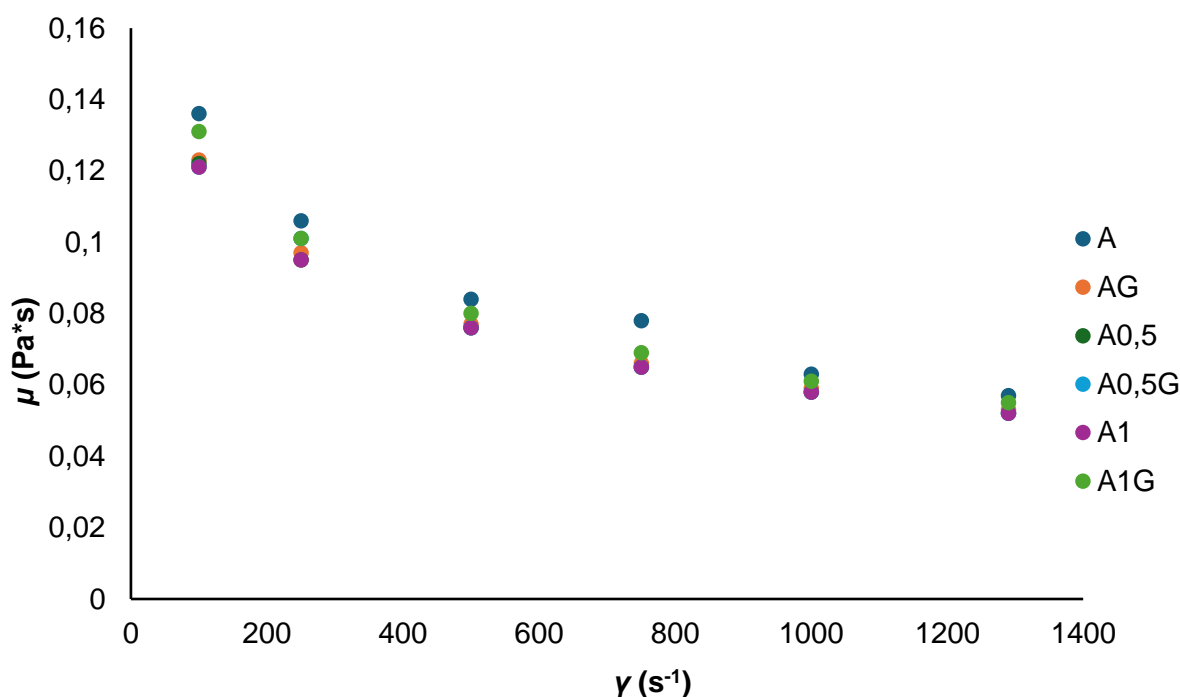


Slika 8. pH vrijednosti otopina biopolimera

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

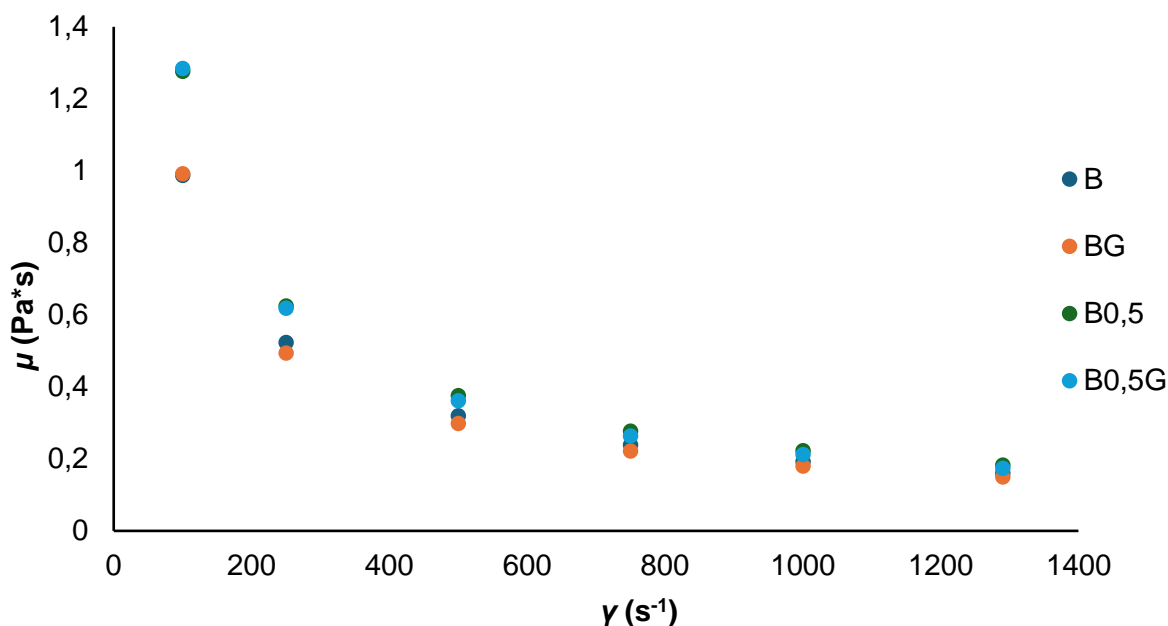
Različiti eksponenti (a-f) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

Na slikama 9. i 10. grafički je prikazana ovisnost brzine smicanja o viskozitetu uzoraka A i B serije filmova pri temperaturi od 23 °C. Viskoznost svih ispitivanih uzoraka opada s povećanjem brzine smicanja, što ukazuje na pseudoplastično ponašanje karakteristično za nenenewtonske tekućine, a koje se javlja kod otopina polimera i gelova (Kol i sur., 2021). Početne vrijednosti viskoziteta kod uzoraka B, veće u usporedbi s uzorcima iz grupe A, što može biti posljedica većih molekularnih masa, viših koncentracija, ili jačih međumolekularnih interakcija, a može ukazivati i na prisutnost gušćih ili snažnije povezanih struktura u uzorcima grupe B. Kod velikih brzina smicanja (oko 800 s⁻¹ i više), sve je manje smanjenje viskoznosti, vjerojatno do dosezanja konstantno niske vrijednosti, što može ukazivati na maksimalno prilagođavanje molekularne mreže smjeru smicanja.



Slika 9. Ovisnost brzine smicanja (γ) o viskozitetu (μ) uzoraka filma od 1,5 % (m/v) karagenana izmjerena pri 23 °C

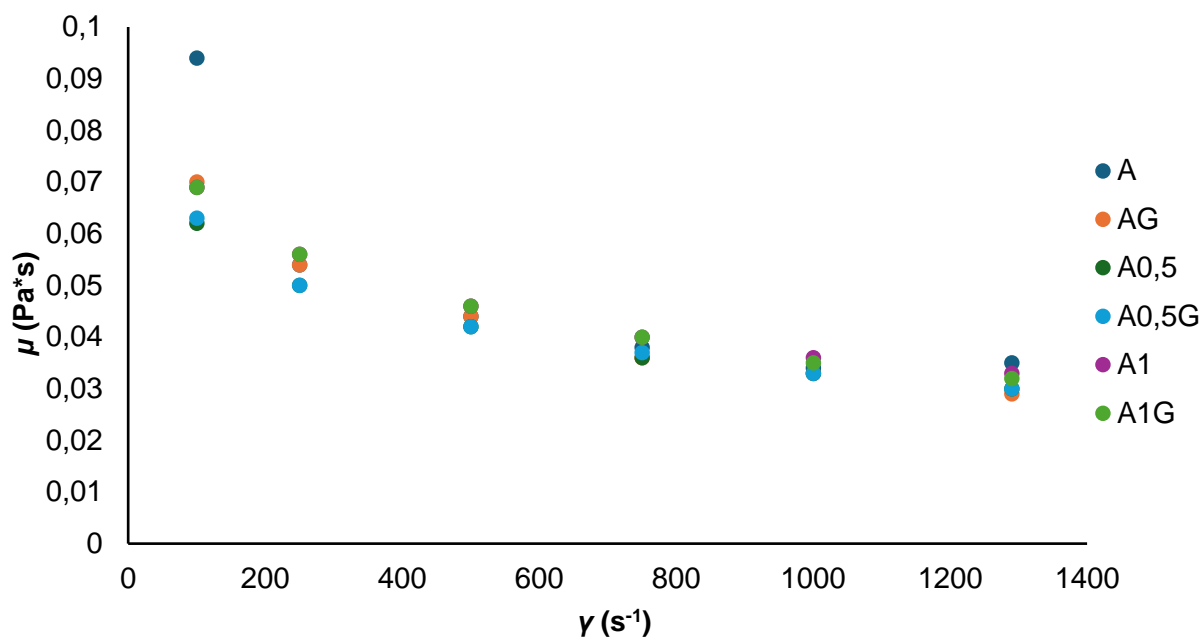
A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*



Slika 10. Ovisnost brzine smicanja (γ) o viskozitetu (μ) uzoraka filma od 3 % (m/v) karagenana izmjerena pri 23 °C

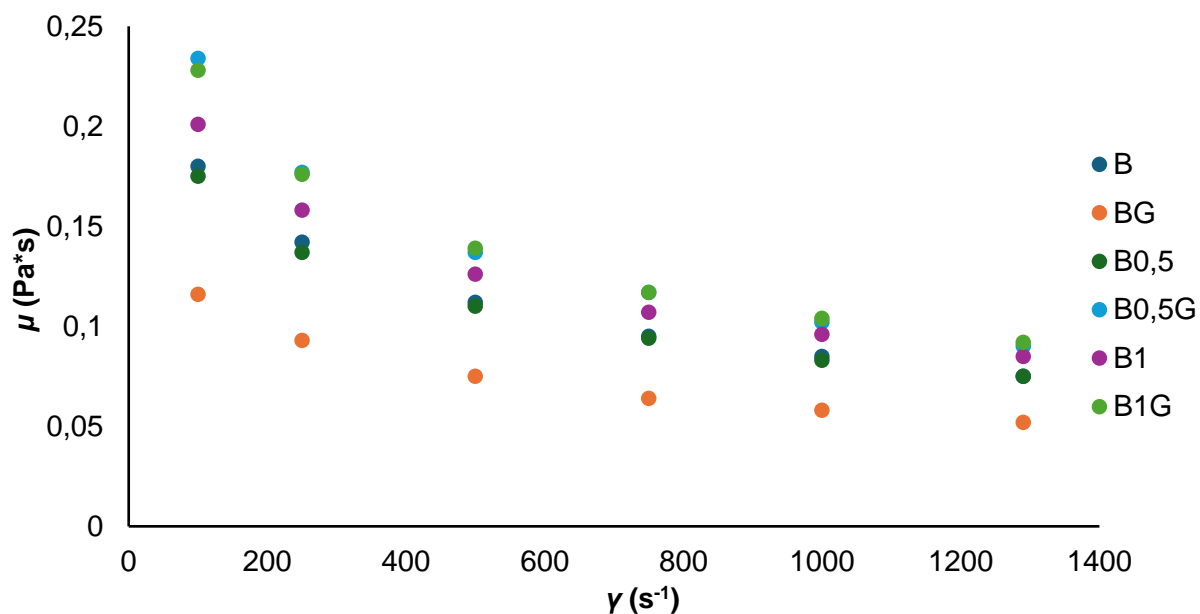
B – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

Na slikama 11. i 12. grafički je prikazana ovisnost brzine smicanja o viskozitetu uzoraka A i B serije filmova pri temperaturi od 70 °C. Svi uzorci pokazuju smanjenje viskoznosti s povećanjem brzine smicanja, što ponovo ukazuje na pseudoplastično ponašanje otopina. Vrijednosti viskoznosti kod svih uzoraka su bliske, osobito pri višim brzinama smicanja. Različite formulacije imaju slične osnovne reološke osobine, najvjerojatnije zbog dominantne prisutnosti karagenana kao osnovnog polimera. Razlike između različitih uzoraka filmova serije A su male, s blagim varijacijama u početnim vrijednostima viskoznosti. Prisustvo glicerola kod svih uzoraka filmova serije A blago je smanjilo viskozitet zbog njegovog djelovanja kao plastifikatora, koji povećava fleksibilnost filma smanjenjem intermolekularnih veza. Veća početna viskoznost kod filmova serije B sugerira snažnije međumolekularne veze ili gušću mrežu polimernih lanaca. Zasebni dodaci alge i glicerola smanjuju viskoznost, što je vidljivo iz nižih vrijednosti viskoznosti kod B0,5 i BG. Međutim, dodatak veće koncentracije alge kod uzorka B1 te dodatak alge i glicerola u isti uzorak povećali su viskoznost, što je vidljivo kod uzorka B0,5G i B1G. Dodatak alge ili glicerola ne utječe značajno na vrijednosti pri višim brzinama smicanja. Pri 70 °C viskoznost je općenito niža nego pri nižoj temperaturi, odnosno pri 23 °C (Slike 9 i 10), što je očekivano, jer više temperature olakšavaju kretanje molekula i smanjuju intermolekularne interakcije.



Slika 11. Ovisnost brzine smicanja (γ) o viskozitetu (μ) uzoraka filma od 1,5 % (m/v) karagenana izmjerena pri 70 °C

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*



Slika 12. Ovisnost brzine smicanja (γ) o viskozitetu (μ) uzoraka filma od 3 % (m/v) karagenana izmjerena pri 70 °C

B – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

4.2. BOJA FILMOVA

Boja je temeljno optičko svojstvo prehrambenih proizvoda jer pruža ključne informacije o kvaliteti, poput stupnja zrelosti, svježine ili ispravnosti proizvoda (Salueña i sur., 2019). Osim toga, boja ima iznimno važnu ulogu u percepciji potrošača, koja direktno utječe na prihvaćenost proizvoda (Pereira i sur., 2019). Kod jestivih prevlaka, boja predstavlja kritičan parametar, osobito kod proizvoda osjetljivih na svjetlost, gdje pakiranje mora osigurati zaštitu i vizualnu privlačnost. U tablici 3. prikazani su izmjereni parametri boje (L^* , a^* , b^*) i ukupna razlika u obojenosti (ΔE).

Tablica 3. Parametri boje (L^* , a^* , b^* , ΔE) u različitim uzorcima filma

| Uzorak | L^* | a^* | b^* | ΔE |
|--------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| A | 91,47 ± 0,11 ^a | 1,80 ± 0,01 ^a | -6,34 ± 0,04 ^g | 0,00 ± 0,00 ^f |
| AG | 91,44 ± 0,14 ^a | 1,71 ± 0,01 ^{a, b} | -6,17 ± 0,10 ^g | 0,19 ± 0,11 ^f |
| A0,5 | 87,04 ± 0,89 ^b | 0,82 ± 0,13 ^f | 3,86 ± 0,33 ^c | 11,16 ± 0,57 ^c |
| A0,5G | 88,15 ± 0,24 ^b | 1,08 ± 0,02 ^e | 0,81 ± 0,14 ^d | 7,91 ± 0,18 ^d |
| B | 90,71 ± 0,23 ^a | 1,48 ± 0,03 ^{b, c} | -4,52 ± 0,19 ^f | 0,00 ± 0,00 ^e |
| BG | 90,49 ± 0,19 ^a | 1,39 ± 0,03 ^{c, d} | -3,95 ± 0,17 ^e | 0,62 ± 0,21 ^f |
| B0,5 | 81,40 ± 1,56 ^c | 1,00 ± 0,32 ^{e, f} | 17,58 ± 0,38 ^b | 23,99 ± 0,66 ^b |
| B0,5G | 79,89 ± 0,99 ^d | 1,17 ± 0,29 ^{d, e} | 19,69 ± 0,68 ^a | 26,52 ± 0,97 ^a |

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

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

Svaki uzorak filma promatran je golim okom te su uočene razlike između uzoraka sa i bez dodatka alge. Uzorci bez dodatka alge bili su prozirni i bez vidljivih nepravilnosti na površini. Dodavanjem alge (0,5 %) primijećena je blaga hrapavost i male tamne točke te tamne, nepravilnom raspoređene mrlje koje se pripisuju neravnomjerno dispergiranom/otopljenom prahu. Filmovi su također poprimili blago zelenu boju. Filmovi s glicerolom, bez obzira na dodatak alge, bili su glađi i sjajniji. Vrijednost L^* označava svjetlinu uzorka, s višim vrijednostima koji označavaju svjetliju boju, a njegovo smanjenje označava tamnjenje uzorka. Iz instrumentalnih mjerenja (tablica 3.), vidljivo je da se vrijednosti parametra L^* kreću između 78 i 92, što ukazuje da su svi uzorci svijetli, pri čemu su uzorci A, AG, B i BG

najsvjetliji i među njima nema statistički značajne razlike. Dodavanje alge *Ascophyllum nodosum* smanjilo je svjetlinu zbog tamnije boje alge, što je u skladu s očekivanjima.

Vrijednosti parametra a^* za sve analizirane uzorke filma pokazuju pozitivne vrijednosti, što ukazuje na prisutnost crvenog spektra. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Blanco-Pascuala i suradnika iz 2014., koji su zabilježili izraženiju sklonost crvenom spektru kod filmova obogaćenih algama. S druge strane, parametar b^* pokazuje različite vrijednosti. Kod uzoraka bez dodatka alge vrijednosti su negativne, što upućuje na prisutnost plavkastog tona, dok su kod uzoraka s dodatkom alge vrijednosti pozitivne, što odražava dominaciju žutog spektra. Sklonost žutoj boji može se pripisati prisutnosti alginata (Biao i sur., 2019), koji je poznat po svom utjecaju na optička svojstva biopolimernih materijala. Nedavna istraživanja potvrđuju značajan utjecaj alginata na optička svojstva filmova, zahvaljujući njegovoj biokompatibilnosti i fleksibilnosti u formiranju kompozita. Takva svojstva omogućuju prilagodbu vizualnih i fizikalnih karakteristika materijala za pakiranje hrane (Metha i sur., 2024).

Vrijednosti parametra b^* kod uzoraka serije B (veća koncentracija karagenana) s dodatkom alge značajno su veće u usporedbi s vrijednostima uzoraka serije A (manja koncentracija karagenana) s dodatkom alge. Statistički značajna razlika između ovih serija ukazuje na izraženiji žuto-smeđi ton boje kod filmova serije B. Pretpostavlja se da je povećanja b^* vrijednosti rezultat veće koncentracije karagenana prisutnog u filmovima serije B, što utječe na spektralne karakteristike i boju materijala, gustoću pakiranja polimernih lanaca i debljinu filma. Proizlazi da koncentracija karagenana može igrati ključnu ulogu u prilagodbi vizualnih svojstava biopolimernih filmova.

Parametar ΔE predstavlja ukupnu razliku u obojanosti i izmjeren je u odnosu na referentne uzorke serija filma A i B. Za ocjenu vizualnih razlika u boji prema percepciji promatrača, vrijednosti ΔE klasificiraju se prema kategorijama (Hawthorne i sur., 2020):

- $0 < \Delta E < 1$ neprimjetno;
- $1 < \Delta E < 2$ primjetno za iskusnog promatrača;
- $2 < \Delta E < 3,5$ primjetno i za neiskusnog promatrača;
- $3,5 < \Delta E < 5$ značajno primjetno;
- $\Delta E > 5$ sugerira da se radi o dvije potpuno različite boje.

U ovom istraživanju izračunate vrijednosti ΔE za seriju filmova A kreću se od 0 do 12, dok se za seriju filmova B kreću od 0 do 27. Ove vrijednosti pokazuju da uzorci AG i BG nemaju primjetnu razliku u boji u odnosu na referentni uzorak te se statistički značajno ne razlikuju. Suprotno uzorcima s dodatkom samo glicerola, ukupna razlika u obojanosti kod svih uzoraka

s algama (A0,5, A0,5G, B0,5 i B0,5G) bila je statistički značajno različita u odnosu na kontrolni uzorak. Razlike su bile vidljive i golim okom (izrazito visoke vrijednosti ΔE).

4.3. DEBLJINA FILMOVA I PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU

Debljina filma je jedan od ključnih parametara koji značajno utječe na propusnost plinova na vodenu paru i ostale plinove (Fahrullah i sur., 2020), kao i na mehanička svojstva filmova čime doprinosi poboljšanju mehaničke cjelovitosti prehrambenih proizvoda (Pereira i sur., 2019). Debljina filma osigurat će isto tako bolju zaštitu proizvoda, a propusnost na vodenu paru bit će veća (Setijawati i sur., 2020). U ovom istraživanju, najmanja debljina zabilježena je kod uzoraka filma A i A0,5, između kojih nema statistički značajne razlike. Međutim, ovi uzorci se statistički značajno razlikuju od ostalih analiziranih uzoraka.

Najveću debljinu pokazali su uzorci filmova B5, B5G i B1, između kojih također nema statistički značajne razlike. Ovi filmovi imaju dvostruko višu koncentraciju karagenana nego kod filmova serije A, odnosno udio suhe tvari polimera po površini značajno je veći. Također, s obzirom da su alge dodane u određenim količinama, mjereno po masi polimera, kod uzoraka B serije više su i količine dodanih algi. Sukladno tome, do povećanja debljine filmova dolazi s povećanjem koncentracije karagenana i dodatkom algi. Dodatak glicerola ne utječe značajno na debljinu filma, zbog njegove male molekulske mase.

Propusnost filmova na vodenu paru (WVP) ključan je parametar koji određuje sposobnost materijala za pakiranje hrane da smanji prijenos vlage između prehrambenog proizvoda i okoline (Liu i sur., 2019). Jedna od osnovnih funkcija jestivih prevlaka je sprječavanje ovog prijenosa, čime se produžuje rok trajanja proizvoda. Niska propusnost vodene pare je poželjna jer prekomjerna vlaga može ubrzati mikrobiološko kvarenje i degradaciju hrane. WVP ovisi o različitim faktorima, uključujući vrstu polimera, prirodu permeata, koncentraciju, razliku tlaka između unutrašnjosti i okoline te debljinu prevlake.

U tablici 4. prikazani su rezultati mjerenja debljine, propusnost na vodenu paru (WVP) i brzina prijenosa vodene pare (WVTR).

Tablica 4. Debljina filmova, propusnost na vodenu paru (*WVP*) i brzina prijenosa vodene pare (*WVTR*).

| Uzorak | Debljina filma (μm) | <i>WVP</i> ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{-10}$ | <i>WVTR</i> ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1}$) $\times 10^{-3}$ |
|--------------|----------------------------------|--|---|
| A | 17,7 \pm 4,27 ^f | 1,29 \pm 0,0 ^b | 14,30 \pm 0,03 ^a |
| AG | 35,1 \pm 10,16 ^{e,f} | 2,45 \pm 0,17 ^a | 13,62 \pm 0,93 ^a |
| A0,5 | 25,2 \pm 2,35 ^f | 1,98 \pm 0,00 ^b | 15,38 \pm 0,04 ^a |
| A0,5G | 43,9 \pm 6,69 ^{e,f} | 3,01 \pm 0,10 ^b | 13,41 \pm 0,46 ^a |
| A5 | 100,1 \pm 29,80 ^b | 7,58 \pm 7,58 ^b | 14,81 \pm 0,25 ^a |
| A5G | 94,5 \pm 32,50 ^{b,c} | 7,29 \pm 0,15 ^b | 15,08 \pm 0,30 ^a |
| A1 | 40,8 \pm 6,32 ^{e,f} | nm | nm |
| B | 36,7 \pm 3,89 ^{e,f} | 3,19 \pm 0,91 ^b | 16,98 \pm 4,87 ^a |
| BG | 40,4 \pm 10,87 ^{e,f} | 2,33 \pm 0,21 ^b | 11,29 \pm 1,02 ^a |
| B0,5 | 87,3 \pm 13,64 ^{b,c} | nm | nm |
| B0,5G | 71,6 \pm 13,51 ^{c,d} | 4,47 \pm 0,62 ^b | 12,21 \pm 1,68 ^a |
| B5 | 135,8 \pm 32,19 ^a | 9,83 \pm 0,67 ^b | 14,14 \pm 0,96 ^a |
| B5G | 147 \pm 16,58 ^a | 9,15 \pm 0,28 ^b | 12,17 \pm 0,37 ^a |
| B1 | 147 \pm 16,58 ^{d,e} | 3,94 \pm 0,00 ^b | 14,39 \pm 0,00 ^a |

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha tvar polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **nm** – nije mjerljivo

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

Jestive prevlake i filmovi na bazi polimera formiraju filmove križnim povezivanjem polimernih lanaca (eng. *cross-linking*) putem vodikovih veza. Ovaj način povezivanja smanjuje *WVP* zahvaljujući hidrofilnim svojstvima polisaharida (Hammam, 2019). Niže vrijednosti *WVP* ukazuju na bolju barijeru filma. Dodavanje plastifikatora ubrzava prienos vodene pare povećavajući razmak između lanaca polimera uslijed smanjenja jačine vodikovih veza, čime se povećava difuzija vodene pare kroz polimernu strukturu (Abdullah i sur., 2022).

Najbolja barijera svojstva, odnosno najmanju propusnost na vodenu paru pokazuje uzorak A, dok najveću propusnost na vodenu paru pokazuje uzorak B5. Najveća propusnost uzorka B5 može se pripisati najvećoj koncentraciji karagenana koji je sam po sebi hidrofilne

prirode te najvećoj koncentraciji alge, koja u svojoj strukturi sadrži alginat i laminarin koji također imaju velik broj dostupnih -OH skupina za vezanje vode. Prema Henrique i sur., 2007., WVP može biti direktno povezan sa količinom -OH skupina u molekulama, što je u skladu sa rezultatima ovog rada. Kod uzoraka AG i A0,5G vrijednost WVP se povećala u odnosu na uzorke A i A0,5, što je u skladu sa istraživanjem Fahrullah i sur. (2020), koje govori da se dodatkom glicerola u jestive filmove smanjuju međumolekulske sile između polimernih lanaca i povećava se propusnost na vodenu paru. Međutim, kod svih ostalih uzoraka, dodatkom glicerola vrijednost WVP se smanjila. Povećanje propusnosti moglo je biti i rezultat mikro-oštećenja koja su nastala prilikom odljepljivanja filma s podloge ili tijekom rukovanja filmovima. Vrijednosti propusnosti na vodenu paru (WVP) izmjerene u ovom istraživanju bile su u rasponu od $10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, što je u skladu s dostupnom znanstvenom literaturom za slične vrste biopolimernih materijala (Cakmak i sur., 2020).

Brzina prijenosa vodene pare (WVTR) opisuje količinu vodene pare koja prolazi kroz materijal u određenom vremenskom periodu. Izmjerene vrijednosti WVTR bile su najniže za uzorke filma BG, B0,5G i B5G, dok su najviše vrijednosti zabilježene za uzorke B i A0,5G. Nema statistički značajnih razlika između vrijednosti ovih uzoraka. Slična zapažanja o svojstvima barijere na vlagu prisutna su u literaturi koja istražuje filmove na bazi polisaharida i proteina. Istraživanje Hammama (2019) navodi da većina filmova izrađenih od polisaharida i proteina pokazuje nisku sposobnost zadržavanja vlage, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u ovom istraživanju.

4.4. UDIO VODE, SUHE TVARI I TOPLJIVOST FILMOVA U VODI

Topljivost filma je važan parametar koji odražava način na koji će film reagirati u doticaju s hranom. Općenito, kod materijala za prehrambenu primjenu niska topljivost u vodi obično je poželjna jer poboljšava cjelovitost proizvoda i povećava njegovu otpornost na vlagu (Pereira i sur, 2019).

U ovom istraživanju, udio vode u ispitivanim uzorcima filma kreće se između 1% i 5%, dok se udio suhe tvari kreće od 95% do 99%. Statistička obrada pokazuje da između uzoraka nema značajnih razlika u udjelu vode ni udjelu suhe tvari. Iako literatura sugerira da dodavanje glicerola povećava udio vode u filmovima (Basiak i sur., 2018), ovo se zapažanje potvrđuje jedino kod uzorka BG, što ukazuje na specifičan utjecaj glicerola na svojstva filma u ovom istraživanju.

Filmovi na bazi karagenana, zbog njegove topljivosti u vodi, također su topljivi. Kako bi se smanjila ta topljivost, često se u takve filmove dodaju aktivne tvari. U ovom istraživanju utvrđeno je da su svi filmovi 100% topljivi, što pokazuje da dodatak alge nije smanjio topljivost. Iako dolazi do interakcije između karagenana i komponenata alge (alginata, fukoidana i laminarina), i dalje postoji velik broj slobodnih hidroksilnih (-OH), sulfatnih (-SO₃⁻) i karboksilnih (-COOH) skupina, koje omogućuju vezivanje molekula vode. Prema Hammam (2019), alginati i karagenani su hidrofilni polisaharidi, a njihova sposobnost privlačenja i zadržavanja vode dolazi iz strukture bogate hidroksilnim i karboksilnim skupinama. Fukoidan i laminarin također su hidrofilni polisaharidi smeđih algi. Fukoidan, zbog sulfata, i laminarin, zbog hidroksilnih skupina, lako vežu vodu i otapaju se u polarnim otapalima. Dodatak plastifikatora također utječe na povećanje topljivosti zbog njegove hidrofilne prirode, koja smanjuje interakcije između molekula biopolimera, što omogućuje veću količinu vode da prodre u polimernu matricu (Singh Sandhu i sur., 2019).

U tablici 5. prikazan je udio vode, udio suhe tvari, postotak bubrenja (SW) i topljivost (FW) pripremljenih filmova.

Tablica 5. Udio vode, udio suhe tvari, i topljivost (FW) pripremljenih filmova

| Uzorak | Udio vode (%) | Udio suhe tvari (%) | FW (%) |
|------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| A | 3,97 ± 1,89 ^a | 96,03 ± 1,89 ^a | 100 |
| AG | 2,96 ± 97,04 ^a | 97,04 ± 2,31 ^a | 100 |
| A5 | 2,85 ± 97,86 ^a | 97,15 ± 2,70 ^a | 100 |
| A5G | 2,14 ± 97,86 ^a | 97,86 ± 1,85 ^a | 100 |
| B | 1,52 ± 98,48 ^a | 98,48 ± 1,07 ^a | 100 |
| BG | 4,16 ± 95,84 ^a | 95,84 ± 4,24 ^a | 100 |
| B5 | 4,71 ± 95,29 ^a | 95,29 ± 1,33 ^a | 100 |
| B5G | 2,46 ± 97,54 ^a | 97,54 ± 2,28 ^a | 100 |

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

EkspONENTI (^a) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05).

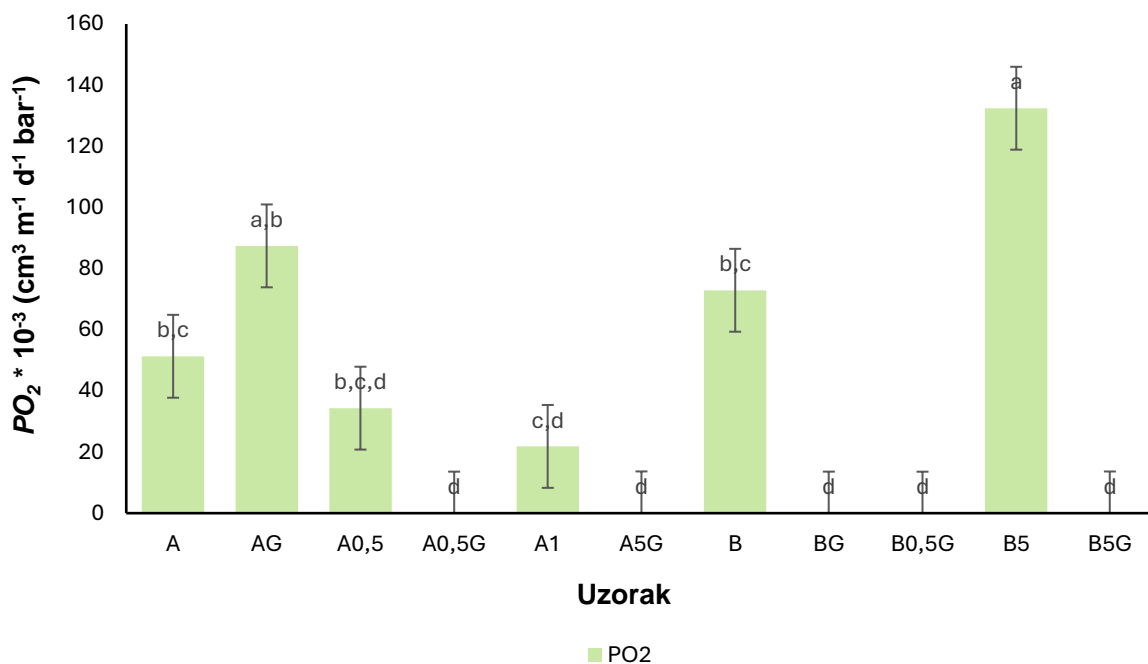
Ovi rezultati ukazuju da je film, unatoč svom niskom udjelu vode, vrlo osjetljiv na vodu i brzo se otopi ili raspadne kada dođe u kontakt s vlagom, što je vjerojatno ponovo rezultat hidrofilnih svojstava korištenih polimera. Ovakvi filmovi mogli bi pronaći primjenu u slučaju gdje

je potrebno da se film brzo aktivira i otopi kada dođe u kontakt s hranom ili vodom, dok nizak udio vode pomaže održavanju stabilnosti filma tijekom transporta ili skladištenja.

4.5. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O₂ i CO₂)

Filmovi od polisaharida formiraju molekulske mreže koje mogu djelomično spriječiti prolazak plinova. Iako karagenan i drugi polisaharidi mogu tvoriti snažne vodikove veze koje omogućuju određenu barijeru prema plinovima, njihova otpornost na prijenos plinova je ograničena. Dodatak alge *Ascophyllum nodosum* može utjecati na propusnost plinova jer alginati, koji su prisutni u velikim količinama u ovoj algi, mogu formirati snažnu polisaharidnu mrežu koja poboljšava barijernu sposobnost filma. Međutim, iako filmovi od karagenana s dodatkom algi mogu imati poboljšana barijerna svojstva u odnosu na čisti karagenan, iako njihova ukupna propusnost plinova i dalje ovisi o koncentraciji i vrsti dodanih sastojaka, te njihovoj topljivosti koja utječe na konačnu strukturu polimera (Hammam, 2019). Slaba topivost u određenom filmogenom mediju može utjecati na neravnomjernu strukturu kod koje dolazi do pojave mikropukotina. Mikropukotine, iako nevidljive ljudskom oku zbog svoje veličine, mogu utjecati na propuštanje plinova kroz uzorak, odnosno mogu mu značajno povisiti propusnost.

Kisik je ključan faktor koji može izazvati oksidacijske promjene u hrani te može potaknuti rast mikroorganizama, zbog čega je važno da materijali za pakiranje hrane imaju dovoljno nisku propusnost na kisik (Daniloski i sur., 2019). S obzirom na to, bolje barijerno svojstvo filmova prema kisiku može značiti dulji rok trajanja i očuvanje nutritivnih vrijednosti hrane, čime se poboljšava kvaliteta proizvoda tijekom skladištenja. Slike 13. i 14. prikazuju grafičke rezultate mjerenja propusnosti filmova na O₂ i CO₂. Veće vrijednosti znače veću propusnost plinova.



Slika 13. Propusnost materijala na kisik (PO_2)

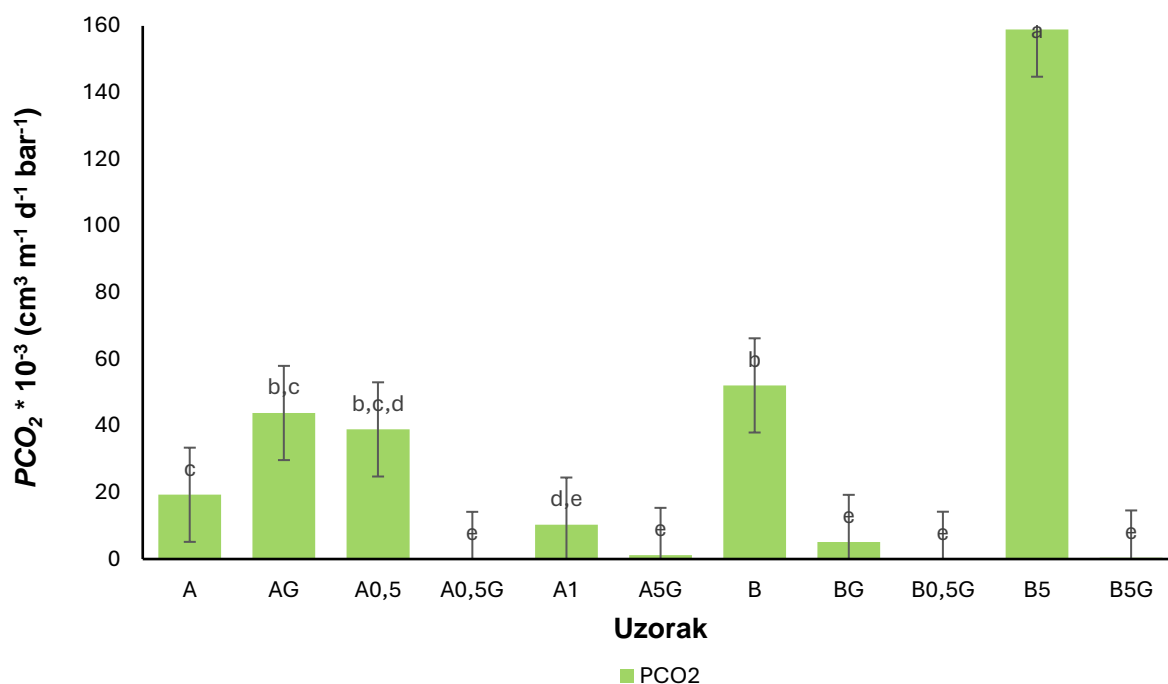
A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

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

Kod uzorka B5 zabilježena je najveća propusnosti na kisik te se uzorak B5 statistički značajno razlikuje od ostalih uzoraka. U ovom uzorku nalazi se najveća koncentracija alge. Prema Abka-khajouei i sur. (2022), poroznost filma povećava se proporcionalno s većim udjelom alginata, koji utječe na otvoreniju strukturu pora filma, što je sukladno rezultatima u kojima je vidljivo kako veći udio alge bez dodatka plastifikatora utječe na povećanje propusnosti filma na kisik. Najmanju propusnost pokazuju uzorci A0,5G, A5G, BG, B0,5G i B5G koji se statistički značajno ne razlikuju, a koji sadrže plastifikator. Dodatak plastifikatora, neovisno o koncentraciji karagenana i koncentraciji alge, značajno smanjuje propusnost uzorka na kisik. Kod uzorka AG propusnost je značajno povećana, što znači da dodatak plastifikatora, u film sa čistim karagenanom, sukladno dostupnoj literaturi povećava fleksibilnost filma i oslabljuje vodikove veze polimernih lanaca, omogućujući na taj način otvoreniju strukturu filma. S druge strane, kombinacija alge i plastifikatora pri različitim koncentracijama karagenana i alge, značajno utječe na difuziju kisika, što ukazuje na formiranje čvršće i stabilnije strukture filma. Uzorak B ima veću propusnost na kisik nego

uzorak A, što ukazuje da veći sadržaj karagenana može biti povezan sa otvorenijom strukturom filma. Ipak, uzorci se statistički značajno ne razlikuju. Filmovi koji imaju visoku propusnost na kisik nisu najprikladniji za pakiranje proizvoda koji su skloni oksidaciji, poput svježih ribe. Daniloski i sur. (2019) napominje da visoka propusnost na kisik može ubrzati oksidaciju i degradaciju hranjivih tvari, stoga za takve proizvode treba koristiti filmove s nižom propusnošću na kisik.

Propusnost na CO₂ važan je parametar u istraživanju materijala za pakiranje, jer CO₂ ima ključnu ulogu u održavanju kvalitete hrane, posebno u proizvodima poput voća, povrća i mesa, gdje se smanjenje koncentracije kisika i povećanje koncentracije CO₂ može usporiti rast mikroorganizama i produljiti rok trajanja. U pakiranju hrane, kontrola razine CO₂ pomaže u očuvanju kvalitete hrane i smanjenju oksidativnih i mikrobioloških procesa. Uzorci A0,5G, A5G, BG, B0,5G, B5G, sa dodatkom plastifikatora pokazuju najmanju propusnost na CO₂. Ipak, ta propusnost je nešto veća nego za O₂, što je vjerojatno posljedica linearne strukture i veće polarnosti molekule CO₂, što joj omogućava lakšu difuziju kroz matricu filma.



Slika 14. Propusnost materijala na ugljikov dioksid (PCO₂)

A – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

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

Uzorak B5 pokazuje najveću propusnost za O₂ i CO₂. Sniženje barijere može se pripisati promjenom strukture karagenana dodatkom aditiva, u ovom slučaju alge. Alginati, koji se nalaze u algama, imaju sposobnost da formiraju hidrogelove i mogu smanjiti gustoću polimernih mreža u strukturi filma (Nair i sur., 2020). Time se može povećati propusnost, jer je mreža manje kompaktna i lakše dopušta prolazak plinova, uključujući kisik i ugljikov dioksid. Alga, koja se inkorporira u karagenan, može djelovati na strukturu filma tako da stvara više prostora između polimernih lanaca, što također povećava propusnost, pogotovo kod iota karagenana, koji formira finiju i mekaniju polimernu mrežu od kapa karagenana te može omogućiti veći prostor za prolaz plinova.

4.6. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA U FILMOVIMA

U jestivim filmovima, udio ukupnih fenola ukazuje na njihovu zaštitnu ulogu jer fenoli djeluju baktericidno, antioksidativno, protuupalno i antikancerogeno, što pozitivno utječe na zdravlje ljudi. Kao sekundarni metaboliti, fenoli nisu izravno uključeni u osnovne metaboličke procese, već pružaju zaštitu od biotskih i abiotskih stresova poput UV zračenja i kontaminacije metalima. Fenoli iz smeđih algi mogu kelirati teške metale, apsorbirajući ih iz morske vode putem polisaharida, čime doprinose potencijalno korisnim učincima na ljudsko zdravlje (Obluchinskaya i sur., 2024).

Rezultati mjerenja ukupnih fenola izraženi su po mg TCP (eng. *Total Phenolic Content*) / g filma za svaki ispitivani uzorak, a prikazani su u tablici 6. Uzorak A0,5 ima najnižu vrijednost ukupnih polifenola, ali se statistički ne razlikuje od ostalih uzoraka. Najveći udio polifenola izmjeren je u uzorku čiste alge (AN0,0107 s koncentracijom alge od 0,0107 % (m/v)) i on se statistički značajno razlikuje od ostalih uzoraka. Od ostalih uzoraka, B5G ima najveći udio polifenola nakon kojeg slijede uzorci B5, BG i B. Najmanji udio polifenola izmjeren je u uzorku A0,5.

Iako karagenan sam po sebi nije bogat polifenolima, njegova prisutnost u većim koncentracijama utječe na teksturu i strukturu filma. Kod uzoraka s višim udjelom karagenana, moguće je da zbog boljeg umrežavanja polimernih lanaca i stvaranja gušće kristalne rešetke s manje slobodnog volumena, polifenoli iz algi vrlo vjerojatno u suvišku i nakon sušenja ostaju nevezani za polimerne lance, te se stoga pri mjerenju svježih uzoraka filma kao slobodne molekule polifenoli brže i lakše ekstrahiraju dajući konačan viši rezultat.

Suprotno tome, kod uzoraka s manjim udjelom karagenana moguće je da se aktivne komponente bolje vežu za polimerne lance, te sporije ekstrahiraju i stoga je vrijednost ukupnih

polifenola u tim uzorcima niža. U uzorcima B5G i BG, osim veće koncentracije alge i karagenana, visoke vrijednosti polifenola mogu biti rezultat veće fleksibilnosti matrice uslijed dodatka glicerola koja tad omogućuje bolje očuvanje bioaktivnih spojeva.

Tablica 6. Ukupni izmjereni sadržaj polifenola u uzorcima filmova

| Uzorak | mg TCP / g filma |
|------------------|-----------------------------|
| AN 0,0107 | 141,19 ± 73,77 ^a |
| A | 0,42 ± 0,54 ^b |
| AG | 0,23 ± 0,00 ^b |
| A0,5 | 0,10 ± 0,07 ^b |
| A0,5G | 0,20 ± 0,19 ^b |
| A5 | 0,70 ± 0,22 ^b |
| A5G | 0,70 ± 0,12 ^b |
| A1 | 0,28 ± 0,1 ^b |
| B | 1,04 ± 0,00 ^b |
| BG | 1,04 ± 0,00 ^b |
| B0,5 | 0,23 ± 0,09 ^b |
| B0,5G | 0,39 ± 0,23 ^b |
| B5 | 1,08 ± 0,42 ^b |
| B5G | 1,21 ± 0,12 ^b |
| B1 | 0,29 ± 0,13 ^b |

AN0,0107 – vodena otopina alge (0,0107 g alge otopljeno u 100 mL vode); **A** – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A1** – filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

Različiti eksponenti (^{a-b}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05).

4.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST (DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET FILMOVA (FRAP, eng. *Ferric-reducing antioxidant power*)

U tablici 7. dane su vrijednosti mjerenja antioksidacijskog kapaciteta uzoraka filma. Uzorak AN 0,0107 pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet, koji se statistički značajno razlikuje od svih drugih uzoraka. Najmanje vrijednosti ima uzorak AN 0,1067, što može ukazivati na to da koncentracija alge može utjecati na antioksidacijski kapacitet, ali ne linearnim trendom.

Tablica 7. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta filmova od karagenana

| Uzorak | FRAP (mg AAE / g filma) |
|------------------|-------------------------------|
| AN 0,0576 | 1317,83 ± 117,01 ^b |
| AN 0,0107 | 1856,03 ± 128,02 ^a |
| AN 0,1067 | 1113,15 ± 117,6 ^c |
| A0,5 | 76,17 ± 10,88 ^d |
| A0,5G | 79,46 ± 13,85 ^d |
| A5 | 101,00 ± 10,18 ^d |
| A5G | 83,91 ± 4,17 ^d |
| B0,5 | 75,10 ± 12,32 ^d |
| B0,5G | 68,43 ± 3,96 ^d |
| B1 | 76,53 ± 6,81 ^d |
| B5 | 82,69 ± 13,34 ^d |
| B5G | 82,22 ± 10,29 ^d |
| A | nm |
| AG | nm |
| B | nm |
| BG | nm |

AN 0,0576 - vodena otopina alge (0,0576 g u 100 mL vode); **AN 0,0107** – vodena otopina alge (0,0107 g u 100 mL vode); **AN 0,1067** - vodena otopina alge (0,1067 g u 100 mL vode); **A** – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **nm** – nije mjerljivo

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

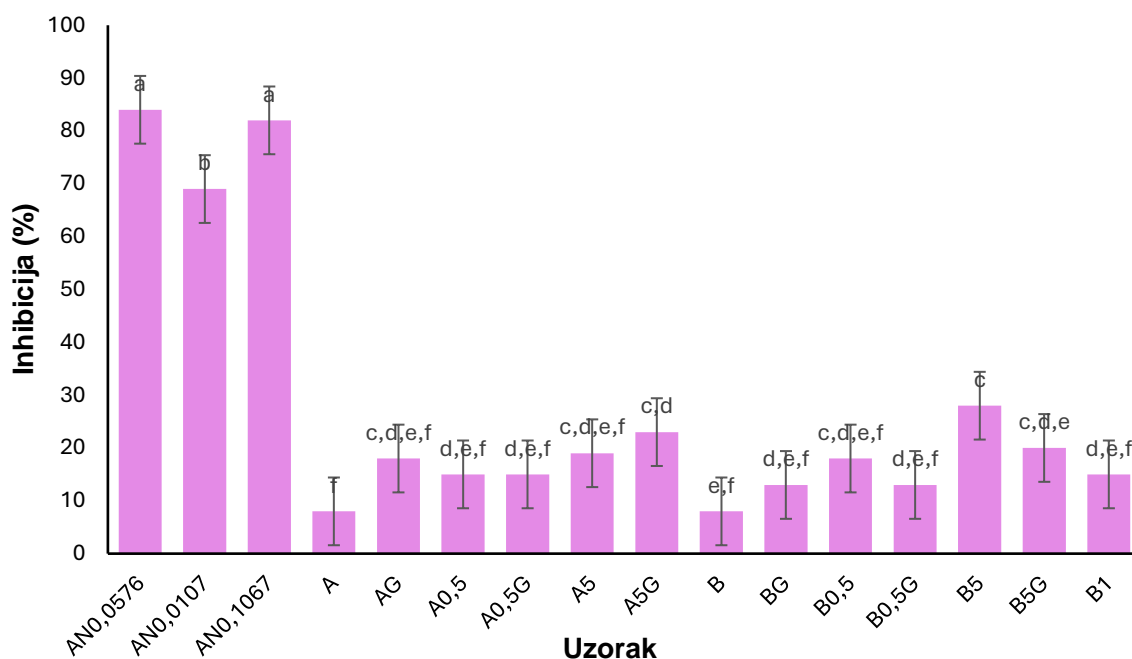
Najmanja vrijednost izmjerena je za uzorak B0,5G koji se statistički ne razlikuje od ostalih uzoraka. Povećanjem koncentracije alge kod ostalih uzoraka povećao se i antioksidacijski kapacitet. Dodatak alge imaju značajan utjecaj na povećanje antioksidacijskog potencijala, što se može povezati s prisutnošću florotanina, jedinstvenih fenolnih spojeva smeđih algi poput *Ascophyllum nodosum*. Dodatak glicerola ne pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet.

Oksidativne reakcije potiču promjenu boje, razvoj užeglosti i nepoželjnih mirisa, negativno utječući na izgled, nutritivnu vrijednost i kvalitetu prehrambenih proizvoda. Stoga je antioksidacijski kapacitet važno svojstvo aktivnog pakiranja. Danas se DPPH metoda za uklanjanje radikala široko koristi za procjenu antioksidativnog kapaciteta filmskih materijala za pakiranje (Liu, 2019).

U literaturi je poznato da akumulacija polifenola korelira s antioksidacijskom aktivnosti (mjerenom DPPH metodom). Flavonoidi također doprinose aktivnosti uklanjanja DPPH radikala (Obluchinskaya i sur., 2024).

Najbolju inhibiciju DPPH pokazala je čista otopina uzorka AN0,0576. Od filmogenih otopina, uzorci A i B pokazuju najnižu inhibiciju DPPH radikala. Ovo je u skladu s očekivanjima jer karagenan sam po sebi nema toliko izraženu antioksidacijsku aktivnost bez dodatka alge ili drugih bioaktivnih tvari. Ovi uzorci se međusobno statistički ne razlikuju, što ukazuje da povećanje koncentracije karagenana značajno ne doprinosi inhibiciji DPPH radikala, odnosno nema antioksidacijsku aktivnost.

Uzorak B5 pokazuje najveću inhibiciju DPPH radikala među filmogenim otopinama, što je očekivano jer sadrži najveće koncentracije karagenana i alge. Karagenan doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti zbog svog visokog broja sulfatnih grupa, koje djeluju kao akceptori elektrona, stabilizirajući slobodne radikale (Pacheco-Quito i sur., 2020). Karbonilne grupe prisutne u spojevima alge *Ascophyllum nodosum*, poput laminarina, pridonose antioksidativnim svojstvima jer mogu djelovati kao akceptori vodikovih iona i neutralizirati slobodne radikale (Pereira i sur., 2020). Veći broj karbonilnih grupa može povećati kapacitet vezanja i inhibicije DPPH radikala. Na slici 15. nalazi se grafički prikaz postotka inhibicije DPPH.



Slika 15. Postotak inhibicije DPPH izmjereno u uzorcima filmova od karagenana s dodatkom alge *Ascophyllum nodosum*

AN 0,0576 - vodena otopina alge (0,0576 g alge otopljeno u 100 mL vode); **AN 0,0107** – vodena otopina alge (0,0107 g alge otopljeno u 100 mL vode); **AN 0,1067** - vodena otopina alge (0,1067 g alge otopljeno u 100 mL vode); **A** – filmovi od 1,5 %-tne (m/v) otopine karagenana; **G** – filmovi s dodatkom glicerola (20 % m/suha masa polimera); **A0,5** – filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **A5** – filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B** – filmovi od 3 %-tne otopine (m/v) karagenana; **B0,5** - filmovi s dodatkom 0,5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B1** - filmovi s dodatkom 1 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*; **B5** - filmovi s dodatkom 5 % (m/suha masa polimera) alge *Ascophyllum nodosum*

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

5. ZAKLJUČCI

1. Vrijednosti kiselosti, odnosno pH filmogenih otopina varira ovisno o sastavu otopine, odnosno o koncentraciji karagenana, dodatka glicerola kao plastifikatora te aktivnih sastojaka. Dodavanjem alge *Ascophyllum nodosum* smanjuje se pH vrijednost filmogenih otopina.
2. Prema rezultatima mjerenja viskoznosti filmogenih otopina, sve filmogene otopine na bazi karagenana su nenewtonske tekućine koje pokazuju pseuoplastično ponašanje. Povećanjem brzine smicanja viskoznost otopina se smanjuje. Temperatura filmogene otopine, odnosno mjerenja ima značajan utjecaj na vrijednosti viskoznosti, zbog toga što pri sobnoj temperaturi dolazi do geliranja polimernih lanaca karagenana, dok je pri povišenoj temperaturi od 70 °C gibljivost polimernih lanaca velika.
3. Dodatkom alge *Ascophyllum nodosum* filmovi postaju tamniji (smanjena vrijednost L^*) i poprimaju golim okom primjetne zelenkaste nijanse zbog prirodne pigmentacije alge, dok dodatak glicerola poboljšava vizualnu uniformnost filmova. Dodatkom alge povećale su se vrijednosti parametara a^* (prisutnost crvene boje) i b^* (prisutnost žute boje).
4. Debljina filmova povećava se s povećanjem koncentracije karagenana i dodatka alge.
5. Filmovi s dodatkom alge pokazuju smanjenu otpornost na prijenos vodene pare, odnosno veću propusnost na vodenu paru.
6. Filmovi s dodatkom alge i glicerola pokazuju dobra barijerna svojstva na plinove i smanjenu propusnost za kisik i ugljikov dioksid, što ih čini pogodnim za primjenu na ribu odnosno hranu osjetljivu na oksidacijske promjene tijekom skladištenja
7. Filmovi s dodatkom alge i glicerola pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost, posebno kod većih koncentracija alge.

6. LITERATURA

Abdullah CJ, Hafeez MA, Wang Q, Farooq S, Huang Q, Tian W i sur. (2022) Biopolymer-based functional films for packaging applications: A review. *Front Nutr* **9**, 1000116. doi: 10.3389/fnut.2022.1000116

Abka-khajouei R, Tounsi L, Shahabi N, Patel AK, Abdelkafi S, Michaud P (2022) Structures, Properties and Applications of Alginates. *Mar Drugs* 2022 **20**, 364. <https://doi.org/10.3390/md20060364>

Ali MQ, Azhar MA, Munaim MSA, Ruslan NF, Alsubhi LM, Ahmad N, i sur. (2024) Seaweed organic compounds source of hydrocolloids and sustainable food packaging: properties, application, and future direction. *Discov Food* **4**(1), 101. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00173-w>

ASTM Standard Test Method E96 – 80, Water Vapor Transmission of Materials (1980).

Banach JL, van den Burg SWK, van der Fels-Klerx HJ (2020) Food safety during seaweed cultivation at offshore wind farms: An exploratory study in the North Sea. *Mar Policy* **120**, 104082. doi:10.1016/j.marpol.2020.104

Basiak E, Lenart A, Debeaufort F (2018) How Glycerol and Water Contents Affect the Structural and Functional Properties of Starch-Based Edible Films. *Polym* 2018 **10**(4):412. <https://doi.org/10.3390/polym10040412>

Bhatt A (2023) Iota Carrageenan Linked to Benzoyl: A More Preamble, Stable, and Safe Iota Carrageenan With Distinct Gelling Behavior. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4644772>

Biao Y, Yuxuan C, Qi T, Ziqi Y, Zhou Y, McClements DJ i sur. (2019) Enhanced performance and functionality of active edible films by incorporating tea polyphenols into thin calcium alginate hydrogels. *Food Hydrocoll* **97**, 105197. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105197

Bizymis AP, Tzia C (2021) Edible films and coatings: properties for the selection of the components, evolution through composites and nanomaterials, and safety issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* **62**(31), 8777–8792. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1934652>

Blanco-Pascual N, Montero MP, Gómez-Guillén MC (2014) Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocoll* **37**, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.021>

- Božanić R, Breški M, Barukčić I, Lisak Jakopović K (2022) Primjena jestivih filmova i prevlaka u proizvodnji sira. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **17**(1-2), 40-46. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.17.1-2.2>
- Brühl L, Unbehend G (2021) Precise color communication by determination of the color of vegetable oils and fats in the CIELAB 1976 ($L^* a^* b^*$) color space. *Eur J Lipid Sci Technol* **123**(7), 2000329. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000329>
- Cakmak H, Özselek Y, Turan OJ, Firatligil E, Karbancıoğlu -Güler F (2020) Whey protein isolate edible films incorporated with essential oils: Antimicrobial activity and barrier properties. *Polym Degrad Stab* **179**, 109285. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109285>
- Cheng C, Chen S, Su J, Zhu M, Zhou M, Chen T i sur. (2022) Recent advances in carrageenan-based films for food packaging applications. *Front Nutr* **9**, 1004588. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1004588>
- Fransiska D, Utomo BSB, Darmawan M, Gozali D, Iqbal MN (2021) Physicochemical characterization of kappa-iota carrageenan gel with papain enzyme. *J Phys Conf Ser* **1943**(1), 012175. doi:10.1088/1742-6596/1943/1/012175
- Daniloski D, Petkoska AT, Ščetar M, Kurek M, Vaskoska R, Kalevska T i sur. (2019) The effect of barrier properties of polymeric films on the shelf-life of vacuum packaged fresh pork meat. *Meat Sci* **158**, 107880. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107880>
- Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**(2), 426-429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04290.x>
- Dehghan Tanha L, Khoshkhoo Z, Azizi MH (2021) Application of edible coating made of sturgeon gelatin and Portulaca oleracea extract for improving the shelf life of fish sausages. *J Food Meas Charact* **15**(5), 4306-4313. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01013-6>
- Díaz-Montes E, Castro-Muñoz R (2021) Edible Films and Coatings as Food-Quality Preservers: An Overview. *Foods* **2021** **10**, 249. <https://dx.doi.org/10.3390/foods10020249>
- Dwivany FM, Aprilyandi AN, Suendo V, Sukriandi N (2020) Carrageenan edible coating application prolongs Cavendish banana shelf life. *Int J Food Sci* **2020**(1), 8861610. <https://doi.org/10.1155/2020/8861610>
- Fahrullah F, Radiati LE, Purwadi P, Rosyidi D (2020) The effect of different plasticizers on the characteristics of whey composite edible film. *J I Teknol Hasil Ternak* **15**(1), 31-37. doi:10.21776/ub.jitek.2020.015.01.4

Galić K (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(1-2), 23-31.

Gao Y, Liu R, Liang H (2024) Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Applications. *Foods* **2024** **13**, 1077. <https://doi.org/10.3390/foods13071077>

Geonzon LC, Bacabac, RG, Matsukawa S (2019) Network structure and gelation mechanism of kappa and iota carrageenan elucidated by multiple particle tracking. *Food Hydrocoll* **92**, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.062>

Gheorghita Puscaselu RG, Besli u, I., & Gutt, G. (2021) Edible biopolymers-based materials for food applications - The eco alternative to conventional synthetic packaging. *Polym* **13**(21), 3779. <https://doi.org/10.3390/polym13213779>

Hammam AR (2019) Technological, applications, and characteristics of edible films and coatings: A review. *SN Appl Sci* **1**, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0660-8>

Hauzoukim, SS, Mohanty B (2020) Functionality of protein-Based edible coating. *J Entomol Zool Stud* **8**(4), 1432-1440.

Hawthorne LM, Beganović A, Schwarz M, Noordanus AW, Prem M, Zapf L i sur. (2020) Suitability of biodegradable materials in comparison with conventional packaging materials for the storage of fresh pork products over extended shelf-life periods. *Foods* **9**(12), 1802. <https://doi.org/10.3390/foods9121802>

He S, Wang Y (2022) Antimicrobial and Antioxidant Effects of Kappa-Carrageenan Coatings Enriched with Cinnamon Essential Oil in Pork Meat. *Foods* **2022** **11**, 2885. <https://doi.org/10.3390/foods11182885>

Henrique CM, Teófilo RF, Sabino L, Ferreira MMC, Cereda MP (2007) Classification of cassava starch films by physicochemical properties and water vapor permeability quantification by FTIR and PLS. *J Food Sci* **72**(4), 184-189. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00342.x

James K, Long H, O'Hara I, Williams B, Moghaddam L (2024) Bio-based film development: Harnessing alginate and fucoidan extracted from *Ascophyllum nodosum* with glycerol and choline chloride-based solvent. *Food Hydrocoll* **153**, 110013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110013>

Kokkuvayil Ramadas B, Rhim JW, Roy S (2024) Recent Progress of Carrageenan-Based Composite Films in Active and Intelligent Food Packaging Applications. *Polym* **2024** **16**, 1001. <https://doi.org/10.3390/polym16071001>

- Kol R, De Somer T, D'hooge DR, Knappich F, Ragaert K, Achillas DS i sur. (2021) State-Of-The-Art Quantification of Polymer Solution Viscosity for Plastic Waste Recycling. *ChemSusChem* **14**(19), 4071-4102. <https://doi.org/10.1002/cssc.202100876>
- Kumari S, Sehwat KD, Phogat D, Sehwat AR, Chaudhary R, Sushkova SN i sur. (2023) *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, A Pivotal Biostimulant toward Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review. *J Agric* 2023, **13**, 1179. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061179>
- Kurek M, Benbettaieb N, Ščetar M, Chaudy E, Elez-Garofulić I, Repajić, M i sur. (2021) Novel functional chitosan and pectin bio-based packaging films with encapsulated *Opuntia-ficus indica* waste. *Food Biosci* **41**, 100980. doi:10.1016/j.fbio.2021.100980
- Kurek M, Gabrić D, Ščetar M (2022) Primjena jestivih filmova i prevlaka s eteričnim uljima na trajnost mesnih i ribljih proizvoda. *MESO* **24**(1), 63-73. <https://doi.org/10.31727/m.24.1.3>
- Lähteenmäki-Uutela A, Rahikainen M, Camarena-Gómez MT, Piiparinen J, Spilling K, Yang B. (2021) European Union legislation on macroalgae products. *Aquac Int* **29**, 487-509. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00633-x>
- Lauzon-Guay JS, Feibel AI, Gibson M, Mac Monagail M, Morse BL, Robertson CA i sur. (2022) A novel approach reveals underestimation of productivity in the globally important macroalga, *Ascophyllum nodosum*. *Mar Biol* **169**(11), 143. <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04133-9>
- Lemesheva V, Islamova R, Stepchenkova E, Shenfeld A, Birkemeyer C, Tarakhovskaya E (2023) Antibacterial, Antifungal and Algicidal Activity of Phlorotannins, as Principal Biologically Active Components of Ten Species of Brown Algae. *Plants* 2023 **12**, 821. <https://doi.org/10.3390/plants12040821>
- Liu Y, Qin YY, Bai R, Zhang X, Yuan L, Liu J (2019) Preparation of pH-sensitive and antioxidant packaging films based on κ -carrageenan and mulberry polyphenolic extract. *I J Biol Macromol* **134**, 193 – 1001.. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.175
- Lomartire S, Marques JCC, Gonçalves AMM (2022) An Overview of the Alternative Use of Seaweeds to Produce Safe and Sustainable Bio-Packaging. *Appl. Sci.* 2022 **12**, 3123. <https://doi.org/10.3390/app12063123>
- Lu Z, Wang L, Xie H, Lei Q, Fang W, Lu X (2020) Structural transitions of ovalbumin/ κ -carrageenan complexes under the effects of pH and composition. *Chem Phys* **533**, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2020.110733>

- Metha C, Pawar S, Suvarna V (2024) Recent advancements in alginate-based films for active food packaging applications. *Sustain Food Technol* **2**(5), 1246-1265. doi: 10.1039/D3FB00216K
- Moraes ICF, Hilliou L (2024) Viscoelastic Reversibility of Carrageenan Hydrogels under Large Amplitude Oscillatory Shear: Hybrid Carrageenans versus Blends. *Gels* **2024** **10**, 524. <https://doi.org/10.3390/gels10080524>
- Nair MS, Tomar M, Punia S, Kukula-Koch W, Kumar M (2020) Enhancing the functionality of chitosan and alginate based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Int J Biol Macromol* **164**, 304 – 320. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07
- Obluchinskaya ED, Pozharitskaya ON, Gorshenina EV, Daurtseva AV, Flisyuk EV, Generalova YE i sur. (2024) *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis from Arctic: Its Biochemical Composition, Antiradical Potential, and Human Health Risk. *Mar Drugs* **22**(1), 48. <https://doi.org/10.3390/md22010048>
- Pacheco-Quito EM, Ruiz-Caro R, Veiga MDD (2020) Carrageenan: drug delivery systems and other biomedical applications. *Mar Drugs* **18**(11), 583. <https://doi.org/10.3390/md18110583>
- Pereira L, Morrison L, Shukla PS, Critchley AT (2020) A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. *J Appl Phycol* **32**, 3561-3584. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02246-6>
- Prasetyaningrum A, Utomo DP, Raemas AFA, Kusworo TD, Jos B, Djaeni M (2021) Alginate/k-carrageenan-based edible films incorporated with clove essential oil: physico-chemical characterization and antioxidant-antimicrobial activity. *Polym* **13**(3), 354. <https://doi.org/10.3390/polym13030354>
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (2009) Narodne novine 125, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3092.html
- Pravilnika o ambalaži i otpadnoj ambalaži, plastičnim proizvodima za jednokratnu upotrebu i ribolovnom alatu koji sadržava plastiku (2023) Narodne novine 137, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_11_137_1864.html
- Rahmawati M, Arief M, Satyantini WH (2019) The effect of sorbitol addition on the characteristic of carrageenan edible film. In *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **236**(1), 012129. doi:10.1088/1755-1315/236/1/012129M
- Salehi F (2020) Edible Coating of Fruits and Vegetables Using Natural Gums: A Review. *Int J Fruit Sci* **1–20**, 570 - 589. doi:10.1080/15538362.2020.1746730

Salueña BH, Gamasa CS, Rubial JMD, Odriozola CA (2019) CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat Sci* **157**, 107889. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889>

Sedayu BB, Cran MJ, Bigger SW (2019) A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. *Carbohydr Polym* **216**, 287-302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.021>

Setijawati D, Rudianto R, Nursyam H, Nafisah N, Mile L (2020) The effect of using kappa-carrageenan: iota-carrageenan: mangrove flour (*Avicennia marina*) in ratio as edible film material toward its quality. *ICoFMR* **1**(1), 21-28.

Shortle E, O'grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**(4), 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Shukla PS, Mantin EG, Adil M, Bajpai S, Critchley AT and Prithiviraj B (2019) *Ascophyllum nodosum* Based Biostimulants: Sustainable Applications in Agriculture for the Stimulation of Plant Growth, Stress Tolerance, and Disease Management. *Front Plant Sci* **10**, 655. doi: 10.3389/fpls.2019.00655

Singh Sandhu K, Sharma L, Kaur M, Kaur R (2019) Physical, structural and thermal properties of composite edible films prepared from pearl millet starch and carrageenan gum: Process optimization using Response Surface Methodology. *Int J Biol Macromol* **146**, 704 – 713. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.111>

Umaraw P, Munekata PE, Verma AK, Barba FJ, Singh VP, Kumar P i sur. (2020) Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. *Trends Food Sci* **98**, 10 – 24. doi:10.1016/j.tifs.2020.01.032

UREDBA (EZ) br. 1333/2008 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 16. prosinca 2008. o prehrambenim aditivima

UREDBA (EZ) br. 178/2002 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane

Uredba (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

Volpe MG, Coccia E, Siano F, Di Stasio M, Paolucci M (2019) Rapid evaluation methods for quality of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fresh fillet preserved in an active edible coating *Foods* **8**(4), 113. <http://dx.doi.org/10.3390/foods8040113>

Zakon o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (2013) Narodne novine 39, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_39_725.html

Zakon o izmjenama Zakona o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (2018) Narodne novine 114, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_12_114_2209.html

Zargarzadeh M, Amaral AJ, Custódio CA, Mano JFF (2020) Biomedical applications of laminarin. *Carbohydr Polym* **232**, 115774. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115774>

Zhao Y, Li B, Li C, Xu Y, Luo Y, Liang D i sur. (2021) Comprehensive Review of Polysaccharide-Based Materials in Edible Packaging: A Sustainable Approach. *Foods* 2021 **10**, 1845. <https://doi.org/10.3390/foods1008184>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja HELENA LALIĆ 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.

Vlastoručni potpis