

Primjena prirodnih biopolimera za formiranje jestivih zaštitnih filmova

Novak, Jana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:803896>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Jana Novak

6436/N

**PRIMJENA PRIRODNIH BIOPOLIMERA ZA FORMIRANJE
JESTIVIH ZAŠTITNIH FILMOVA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

**PRIMJENA PRIRODNIH BIOPOLIMERA ZA FORMIRANJE JESTIVIH
ZAŠTITNIH FILMOVA**

Jana Novak, 6436/N

Sažetak: U ovom radu ispitana je mogućnost formiranja jestivih filmova od polimernih hidrokoloidnih materijala (alginata, pektina i kitozana) u ekstraktu kakaove ljuske kao izvoru bioaktivnih sastojaka, s ciljem proizvodnje jestivih zaštitnih filmova poboljšanih funkcionalnih svojstava. Učinak obogaćivanja jestivih filmova polifenolnim spojevima iz ekstrakta kakaove ljuske praćen je usporedbom s kontrolnim filmovima pripremanima u destiliranoj vodi. Pripremljenim filmovima određivana su fizikalna, mehanička i senzorska svojstva, sastav bioaktivnih spojeva prije i nakon sušenja na 60°C, antioksidacijski kapacitet te je provedena korelacijska analiza pojedinih svojstava (boja, senzorska i mehanička svojstva). Prema dobivenim rezultatima, proizvedeni su filmovi debljine 30-100 µm, pri čemu je debljina filma ovisila o pripremi u vodi ili ekstraktu, dok udjel vode i suhe tvari primarno ovise o vrsti korištenog hidrokoloidnog polimera. Kontrolni alginatni film pokazao je najbolja mehanička (najveća vlačna čvrstoća - 6,17 N i najmanja deformacija - 0,73 %) i senzorska svojstva, dok je kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuske imao najlošija navedena svojstva te najveću debljinu (104,67 µm). Pripremom u ekstraktu kakaove ljuske postignuto je povećanje udjela bioaktivnih spojeva (i do 3 puta više) u odnosu na kontrolne filmove, pri čemu su bioaktivna svojstva očuvana i nakon sušenja filmova na 60°C. Obogaćivanjem filmova u ekstraktu kakaove ljuske značajno je povećan udjel bioaktivnih spojeva, ali su narušena fizikalna, mehanička i senzorska svojstva koja su se pokazala boljima za kontrolne filmove (posebice alginatni).

Ključne riječi: alginat, bioaktivni spojevi, ekstrakt kakaove ljuske, jestivi film, kitozan, pektin

Rad sadrži: 43 stranice, 5 slika, 8 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

APPLICATION OF NATURAL BIOPOLYMERS FOR THE PRODUCTION OF EDIBLE PACKAGING FILMS

Jana Novak, 6436/N

Abstract: In this study, the potential of formulating edible films from polymeric hydrocolloid materials (alginate, pectin, chitosan) in cocoa husk extract as the source of bioactive compounds was investigated, in order to produce edible coating films with functional properties. The effect of enrichment with polyphenolic compounds derived from cocoa husk extract was determined by comparing the produced films with control films obtained only in distilled water. For their comparison physical, mechanical and sensory properties, bioactive compounds prior and after drying of films at 60°C and antioxidant capacity were determined, and the relation between specific properties (colour, sensory and mechanical properties) was deduced by correlation analysis. According to the obtained results, edible films were produced with thickness ranging from 30-100 µm, which was primarily in dependence of the preparation mode (in water or cocoa husk extract), while the water and dry matter content were more affected by the employed biopolymer material. Control alginate film generally exhibited the best mechanical (highest tensile strength - 6,17 N and lowest deformation - 0,73 %) and sensory properties, while the enriched chitosan film prepared in cocoa husk extract exhibited the poorest respective properties and the highest thickness (104,67 µm). By preparing the films in cocoa husk extract a significant increase of bioactive compounds content was achieved (even up to 3-fold higher) in relation to control films, while the bioactive properties remained preserved even after drying of films at 60°C. Enrichment of films in cocoa husk extract enabled to markedly enhance the bioactive content, but it negatively affected the physical, mechanical and sensory properties of produced films, which were better for control films (especially alginate one).

Keywords: alginate, bioactive compounds, cocoa husk extract, edible film, chitosan, pectin

Thesis contains: 43 pages, 5 figures, 8 tables, 45 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: PhD Ana Belščak-Cvitanović

Thesis delivered: September 2015

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Definicija i primjena jestivih filmova.....	3
2.2. Podjela jestivih filmova i materijali za izradu.....	4
2.2.1. Hidrokoloidni filmovi.....	5
2.2.1.1. Alginat.....	5
2.2.1.2. Kitozan.....	5
2.2.1.3. Pektin.....	6
2.2.2. Proteinski filmovi.....	7
2.2.3. Plastifikatori.....	7
2.3. Svojstva hidrokoloidnih jestivih filmova.....	8
2.3.1. Debljina.....	8
2.3.2. Mehanička svojstva.....	8
2.3.3. Barijerna svojstva.....	8
2.3.3.1. Propusnost plinova i vodene pare.....	9
2.3.4. Optička svojstva: sjaj, prozirnost i boja.....	10
2.4. Postupci primjene jestivih filmova.....	10
2.4.1. Uranjanje.....	10
2.4.2. Premazivanje.....	10
2.4.3. Prskanje.....	11
2.4.4. Lijevanje otopine jestivog filma.....	11
2.4.5. Ekstruzija.....	11
2.5. Proizvodnja jestivih filmova s inkorporiranim bioaktivnim spojevima.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Materijal.....	14
3.2. Metode rada.....	14
3.2.1. Priprema ekstrakta kakaove ljuske.....	14
3.2.2. Priprema jestivih filmova.....	15
3.2.3. Karakterizacija filmova.....	16
3.2.3.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari).....	16
3.2.3.2. Određivanje topljivosti filmova u vodi.....	17
3.2.3.3. Određivanje debljine filmova.....	18
3.2.3.4. Određivanje mehaničkih svojstava.....	18
3.2.3.5. Određivanje boje.....	19
3.2.4. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova.....	21
3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	21
3.2.4.2. Određivanje udjela flavan-3-ola.....	22
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	23
3.2.5. Senzorska analiza.....	25
3.2.6. Određivanje koeficijenta korelacije.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Usporedba fizikalnih svojstava jestivih filmova.....	26

4.2. Mehanička svojstva jestivih filmova.....	29
4.3. Usporedba količine bioaktivnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta jestivih filmova prije i nakon njihovog sušenja.....	30
4.4. Usporedba rezultata senzorskog ocjenjivanja jestivih filmova.....	31
4.5. Međusobni odnos određenih svojstava jestivih filmova.....	32
5. RASPRAVA.....	33
5.1. Debljina, udio vode i suhe tvari.....	33
5.2. Topljivost u vodi.....	33
5.3. Boja formiranih filmova.....	34
5.4. Bioaktivni sastav i antioksidacijski kapacitet filmova.....	35
5.5. Mehanička svojstva.....	36
5.6. Senzorska svojstva ocjenjivanih filmova.....	36
5.7. Korelacijska analiza određenih svojstava jestivih filmova.....	37
6. ZAKLJUČCI.....	38
7. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Zbog povećanog interesa potrošača za zdravu prehranu i funkcionalne prehrambene proizvode, sve su veći zahtjevi prehrambenoj industriji za razvoj inovativnih prehrambenih proizvoda. Takvi proizvodi, bilo proizvedeni na način da su im nutritivni i bioaktivni sastav očuvani ili dodatno obogaćeni drugim sastojcima, imaju pozitivno djelovanje na jednu ili više funkcija u organizmu te pomažu u prevenciji razvoja mnogih bolesti. Bioaktivni sastojci kojima se prehrambeni proizvodi obogaćuju u svrhu proizvodnje novih proizvoda visoke nutritivne i biološke vrijednosti, kao što su prirodni antioksidansi (biljni polifenoli, vlakna, vitamini, arome) imaju veliku ulogu u proizvodnji funkcionalne hrane.

Aktivno pakiranje prehrambenih proizvoda predstavlja jednu od mogućnosti proizvodnje funkcionalnih proizvoda dodatno obogaćenih raznovrsnim bioaktivnim spojevima. Naime, zagađenje okoliša i zbrinjavanje otpada postali su jedan od glavnih globalno prisutnih problema suvremenog društva. Svjetska proizvodnja plastičnih masa porasla je oko 25 puta do 2010. godine, dok se manje od 5 % ukupne količine plastične ambalaže reciklira, što je dovelo do njezinog brzog nakupljanja u okolišu. Svake godine omoti hrane čine milijune tona otpada na odlagalištima, što predstavlja ozbiljan ekološki teret za okoliš. Stoga je upotreba biopolimera za proizvodnju jestive ambalaže i filmova sve zanimljivija alternativa plastičnoj ambalaži, primarno zbog svojstva biorazgradivosti i kompatibilnosti s prehrambenim proizvodima. Jestivi film definira se kao materijal za pakiranje koji predstavlja tanak sloj jestivih materijala na ili između komponenata hrane. Osim osnovnih barijernih svojstava jestivi filmovi proizvedeni primjenom prirodnih biopolimera posjeduju karakteristike poželjne u pakiranju i očuvanju kakvoće prehrambenih proizvoda, kao što su: sprečavanje posmeđivanja, antimikrobno djelovanje, poboljšanje teksture i druga funkcionalna svojstva. Ova svojstva mogu se postići dodatkom aktivnih sastojaka (nutrijenata, probiotika i aroma) u materijal za pakiranje ili korištenjem funkcionalno aktivnih polimera.

Među funkcionalnim sastojcima polifenolni spojevi iznimno su poželjni zbog svojih izraženih antioksidacijskih svojstava. Polifenoli se brzo apsorbiraju u ljudskom tijelu, kratko zadržavaju u plazmi i brzo izlučuju iz tijela. Inkorporiranjem polifenola u jestive filmove može se postići nekoliko prednosti pred uporabom obične plastične ambalaže:

- antimikrobno djelovanje
- usporavanje oksidacije lipida
- produljenje roka trajanja proizvoda
- proizvodnja funkcionalnih prehrambenih proizvoda obogaćenih polifenolima koji imaju korisne učinke na zdravlje.

Prema literaturnim podacima inkorporacija polifenola/biljnih ekstrakata već je prethodno učinkovito provedena, no, proizvedene filmove su karakterizirala i nepovoljna svojstva, kao što su promjena strukture, smanjenje elastičnosti i otpornosti na lom, manja prozirnost i sjaj te lošija barijerna svojstva.

U ovom radu ispitat će se mogućnost proizvodnje funkcionalnih jestivih filmova od hidrokoloidnih polimernih materijala; alginata, pektina i kitozana u ekstraktu kakaove ljuske kao izvoru bioaktivnih sastojaka. Filmovi će se proizvesti metodom izlivanja uz dodatak glicerola kao plastifikatora, dok će se učinak obogaćivanja jestivih filmova polifenolnim spojevima iz ekstrakta kakaove ljuske odrediti usporedbom s kontrolnim filmovima pripremanima u destiliranoj vodi. Pripremljenim filmovima odrediti će se fizikalna (debljina, udio suhe tvari i vode, topljivost u vodi) i mehanička svojstva, bioaktivni sastav (udjel polifenolnih spojeva) i antioksidacijski kapacitet pomoću DPPH metode te senzorska svojstva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija i primjena jestivih filmova

Jestivi zaštitni film je tanki sloj materijala koji se može konzumirati, a osigurava barijeru prema plinovima i vodenoj pari na prehrambenim proizvodima. Jestivi filmovi prekrivaju proizvod ili se primjenjuju kao sloj između komponenti hrane. Materijali za izradu filmova moraju posjedovati dobra mehanička svojstva, posebice elastičnost, organoleptička i zaštitna svojstva te prvenstveno moraju biti dozvoljeni za ljudsku konzumaciju. Svojstva jestivih filmova je moguće poboljšati dodatkom sredstava poput plastifikatora (koji omogućavaju omekšavanje teksture filma), arome, antimikrobnih tvari ili antioksidanasa (Galić, 2009). Primjena jestivih filmova prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Primjene jestivih filmova (Galić, 2009)

Svrha	Željena kvaliteta	Primjene
Zaštita od vlage i kisika	Dobra svojstva prevlačenja, niska propusnost na vodenu paru i kisik (mogući dodatak antioksidanta)	Svježa riba, sir, meso, mesni proizvodi; hrana srednjeg sadržaja vlage; suha hrana, orasi, suhi pekarski proizvodi; grickalice
Usporavanje mikrobnog kvarenja izvana	Dodatak antimikrobnih agenasa	Hrana srednjeg sadržaja vlage
Kontrola ravnotežne vlage unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu	Heterogeni proizvodi (pite, pize, kolači), sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Kontrola migracije otopine, boja, arome unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu i otapala	Heterogeni proizvodi (pite, pize, kolači), sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Sprečavanje penetracije salamure u hranu	Dobra barijerna svojstva na vodu i otapala	Usalamureni smrznuti proizvodi (škampi, rakovi i sl.)
Poboljšanje mehaničkih svojstava tijekom rukovanja	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Kikiriki, škampi, rakovi, snack-hrana i dr.
Osiguranje strukturalnog integriteta; pojačanje struktura hrane	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Restrukturirani mesni i riblji proizvodi, mehanički otkošteno meso; liofilizirane porcije hrane ili porcije suhe hrane
Osiguranje adhezivnosti smjese za paniranje tijekom prženja	Dobra adhezivnost	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Sprečavanje migracije vlage pri nanošenju prevlake maslaca i krušnih mrvica u procesu paniranja	Dobra adhezivnost i niska propusnost na vodu	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Zaštita većeg broja manjih komada hrane (pakiranih u vrećice ili šalice)	Niska propusnost vode; ne smije biti ljepljiv	Sir, procesirane kockice sira, voće srednjeg sadržaja vlage; smrznuta hrana; sladoled; proizvodi veličine jednog zalogaja

Osiguranje neljepljive i nemasne površine	Ne smije biti ljepljiv	Kockice sira, suho voće, konditorski proizvodi, snack-proizvodi, smrznuti proizvodi (da bi se eliminirala upotreba masnog papira između hamburgera)
Poboljšanje izgleda površine hrane	Glatka, sjajna, staklasta površina	Pekarski proizvodi (šećerna i druge glazure); slastice, orasi, voće srednjeg sadržaja vlage, snack-hrana
Pojačanje boje, arome i okusa hrane (dekorativni efekt)	Dodatak bojila, arome, začina	Različita hrana
Da sadržavaju prethodno odmjerene porcije koje se otapaju u vodi ili toploj hrani	Sposobnost stvaranja kapsula topljivih u vodi	Dehidrirane juhe, instant čajevi ili kava, praškasti napici, začini, zaslađivači

2.2. Podjela jestivih filmova i materijali za izradu

Jestivi filmovi svrstavaju se s obzirom na materijal od kojeg su proizvedeni u tri kategorije: *hidrokoloide koji uključuju proteine i polisaharide*, *lipidi* (masne kiseline i voskovi) i *kompoziti* (kombinacija hidrokoloida i lipida) (Skurtys i sur., 2010). Pregled materijala koji se koriste za izradu jestivih filmova prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Materijali za izradu jestivih filmova i prevlaka (Galić, 2009)

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

2.2.1. Hidrokoloidni filmovi

Hidrokoloide su hidrofilni polimeri biljnog, životinjskog, mikrobnog ili sintetskog podrijetla koji sadrže mnogo hidroksilnih skupina (Dhanapal i sur., 2012). Prisutnost hidroksilnih skupina značajno povećava afinitet vezanja vode. Hidrokoloide su dispergirani u prisutnosti vode te formiraju sustav koji nije niti prava otopina niti suspenzija, nego nešto između toga, a pokazuje svojstva koloida (Milani i Maleki, 2012). Često su korišteni za izradu jestivih filmova zbog učinaka na teksturu, aromu i rok trajanja proizvoda. Svi hidrokoloide koji se koriste su u potpunosti ili djelomično topljivi u vodi i prvenstveno se koriste za povećanje viskoznosti stacionarne faze (Dhanapal i sur., 2012). Hidrokoloide se ne koriste kao emulgatori jer nemaju karakteristike povezivanja hidrofilnih i lipofilnih skupina u molekularnu strukturu (Wüstenberg, 2014). Ovakvi filmovi pokazuju dobru zaštitu protiv oksidacije lipida i drugih osjetljivih sastojaka hrane, dok im je svojstvo zaštite od vlage ograničeno (Milani i Maleki, 2012).

2.2.1.1. Alginat

Alginat je polisaharid koji se u prehrambenoj industriji najčešće koristi za geliranje odn. učvršćivanje i zgušnjavanje. Proizvodi se ekstrakcijom iz smeđe alge (*Phaeophyceae*), a u komercijalnom obliku najčešće se nalazi u obliku soli alginske kiseline. Alginska kiselina je polimer β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline, a njihova kombinacija pokazuje jedinstvena svojstva uključujući sposobnost zgušnjavanja, stabilizacije, stvaranja suspenzije, tvorbe filma, proizvodnje gela i stabilizacije emulzije. Zbog hidrofilne prirode, ovi filmovi ne predstavljaju dobru barijeru za zaštitu od vode i vlage (Koushki i sur., 2015). Dodatak kalcija u otopinu alginata pospješuje kapacitet geliranja s obzirom da alginat zbog anionske strukture pokazuje svojstvo formiranja gela u prisutnosti kationa. Poboljšanje svojstava jestivih alginatnih filmova postiže se još i dodatkom probiotika, ulja (češnjak, origano) i škroba (Skurtys i sur., 2010).

2.2.1.2. Kitozan

Hitin je drugi najzastupljeniji polimer u prirodi nakon celuloze. Nalazi se u egzoskeletu rakova, staničnoj stijenci gljiva i drugim biološkim materijalima. Kitozan se dobiva deacetilacijom hitina u prisutstvu lužine. Kitozan je kopolimer koji se sastoji od β -(1-4)-2-

acetamido-D-glukoze i β -(1-4)-2-amino-D-glukoze (Arvanitoyannis i sur., 1998). Prednosti uporabe kitozana su njegova netoksičnost, biorazgradivost, biokompatibilnost te intrinzična antimikrobna aktivnost i inhibitorno djelovanje na rast raznih bakterija. Izvršna je komponenta jestivih filmova zbog sposobnosti tvorbe filmova i dobrih mehaničkih svojstava te formiranja transparentnih filmova koji mogu naći svoju primjenu u različitim pakiranjima. Čisti kitozanski filmovi su obično kohezivni i kompaktni, dok im je površina glatka, bez pora i pukotina (Skurtys i sur., 2010). No, kitozanski filmovi su slabo propusni za plinove (CO_2 i O_2) i imaju veliku propusnost vodene pare. Kako bi se poboljšala zaštitna svojstva propusnosti vode u kitozanske filmove se često inkorporiraju različite komponente (Bourbon i sur., 2011).

2.2.1.3. Pektin

Pektin je linearni polisaharid čija je glavna komponenta α -D-galakturonska kiselina. Karboksilne skupine (COOH) u molekuli pektina su djelomično esterificirane metanolom (nastaje $-\text{COOCH}_3$ grupa). Sekundarne hidroksilne grupe mogu biti djelomično esterificirane acetatom (octenom kiselinom) ovisno o podrijetlu pektina. Prema broju esterificiranih karboksilnih skupina pektin se dijeli u dvije grupe: visokoesterificirani i niskoesterificirani. Za industrijsku proizvodnju i uporabu, pektin se najčešće ekstrahira iz mesnatog dijela jabuke i kore citrusa; najčešće limete, limuna ili naranče te u manjoj mjeri iz šećerne repe. Ekstrakcija pektina uglavnom se provodi vodenom otopinom kiseline pri 50-90 °C, 3-12 sati pri pH=1-3, nakon čega slijedi precipitacija alkoholom. Ovom metodom se netopljivi protopektin degradira u topljivi pektin.

Najvažnija svojstva pektina u prehrambenoj industriji su njegova iznimno dobra topljivost u vodi te sposobnost geliranja. Osim za geliranje primjenjuje se kao ugušćivač i ima stabilizirajuća svojstva te se zbog toga koristi i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji visokoesterificirani pektin daje poželjnu čvrstoću, strukturu i stabilnost prilikom kuhanja voćnim prerađevinama - džemovima, žele proizvodima i konditorskim proizvodima s visokim sadržajem šećera, a također se koristi i kao ne-gelirajući stabilizator u fermentiranim mliječnim proizvodima ili napicima od soje i voćnim napicima. Visokoesterificirani pektin koristi se i za održavanje volumena i zadržavanje vode, mekoću i stabilnost prilikom smrzavanja kruha i smrznutog tijesta. Niskoesterificirani pektin koristi se kao zgušnjivač za voćne preljeve za sladolede i preljeve tekuće konzistencije te mliječne

deserte. U niskomasnim proizvodima (umaci, sladoled, procesirano meso i sir) služi kao zamjena za mast (Wüstenberg, 2015).

2.2.2. Proteinski filmovi

Proteinski filmovi mogu poboljšati nutritivnu vrijednost prehrambenih proizvoda. Mehanička svojstva jestivih filmova na bazi proteina bolja su od filmova na bazi polisaharida i lipida zbog jedinstvene strukture proteina (bazirane na 20 različitih monomera) koja im daje širi raspon funkcionalnih svojstava, posebno veliki potencijal za intramolekularno vezanje. Proteinski filmovi mogu stvarati višestruke kemijske veze na različitim pozicijama. No, njihova primjena, u odnosu na sintetske polimere, ograničena je zbog loše zaštite od propusnosti vodene pare i slabijih mehaničkih svojstava. Kako bi se poboljšala barijerna svojstva ovih filmova koriste se različite metode kao što su: promjena svojstava proteina kemijskim i enzimskim postupcima, kombiniranjem s hidrofobnim materijalima ili durgim polimerima i korištenjem fizikalnih metoda. Ove metode se primarno koriste za poboljšanje mehaničkih i barijernih svojstava (Bourtoom, 2009).

2.2.3. Plastifikatori

Jestivi filmovi moraju biti elastični, fleksibilni, žilavi, ne smiju biti lomljivi niti pucati tijekom rukovanja i skladištenja. Plastifikatori niske molekulske mase (nehlapljivi) se dodaju otopini hidrokolidnih filmova kako bi modificirali odn. poboljšali fleksibilnost jestivih filmova. Plastifikatori niske molekulske mase, visoke polarnosti, s većim brojem polarnih grupa i većom udaljenosti među polarnim grupama unutar molekule daju poželjna svojstva elastičnosti jestivim filmovima. Oni smanjuju intramolekulske interakcije između susjednih polimernih lanaca (Skurtys i sur., 2010). Primjerice, molekule proteina su sklone formiranju jakih kovalentnih veza, disulfidnih mostova i vodikovih veza što rezultira strukturom koja je krta i već pri najmanjem djelovanju sile dolazi do njezinog lomljenja. Dodatkom molekula plastifikatora koje se inkorporiraju u strukturu filmova, ometa se formiranje jakih veza na pojedinim mjestima. Na tim mjestima gdje se nalaze plastifikatori ne dolazi do formiranja veze, a budući da su oni homogeno raspoređeni po cijeloj strukturi rezultat je pojava savitljivosti i rastezljivosti filma. Kao plastifikatori za proizvodnju jestivih filmova koriste se polioli (glicerol, propilen glikol, polietilen glikol, sorbitol, etilen glikol), neki monosaharidi,

disaharidi i oligosaharidi, lipidi i njihovi derivati te voda. Najbolja svojstva među plastifikatorima pokazuje glicerol jer daje najbolja mehanička svojstva filmovima i nešto slabiju propusnost vodene pare (Nemet, 2009.; Skurtys i sur., 2010). Općenito su plastifikatori potrebni kod polisaharidnih i proteinskih jestivih filmova. Dodaju se u količinama između 10% i 60% od ukupne mase hidrokoloida (Skurtys i sur., 2010).

2.3. Svojstva hidrokoloidnih jestivih filmova

2.3.1. Debljina

Debljina jestivog filma i prevlake važan je parametar jer izravno utječe na biološka svojstva i rok trajanja obložene hrane. Učinkovitost zaštite hrane primarno ovisi o kontroli širenja otopine za oblaganje koja utječe na debljinu filma. Postoje dvije metode mjerenja debljine filma: kontaktna metoda i ne-kontaktna metoda. Ne-kontaktna metoda je djelotvornija jer ne uništava uzorak. Među kontaktnim metodama, zbog svoje jednostavnosti, najčešće se koristi direktno metričko mjerenje - premaz se podigne od površine hrane i mjeri se debljina pomoću mikrometra. Filmovi imaju debljinu manju od 0,25 mm.

2.3.2. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva jestivih filmova čine tri parametra:

- otpor materijala na pucanje pod napetošću (vlačna čvrstoća),
- Young-ov modul
- postotak produljenja prije pucanja (Skurtys i sur., 2010).

Vlačna čvrstoća predstavlja mehanički otpor filma zbog kohezijskih sila između lanaca (Galus i Lenart, 2013). Postotak produljenja pokazuje sposobnost rastezanja filma prije pucanja. Young-ov modul ili modul elastičnosti je omjer naprezanja i rezultirajućeg produljenja filma i predstavlja mjeru krutosti filma (Ozdemir i Floros, 2008).

2.3.3. Barijerna svojstva

Oblaganjem hrane jestivim filmom, površinska koncentracija plinova može se mijenjati tijekom skladištenja. Kemijski sastav površine hrane je dinamičan i promjene se javljaju

uglavnom zbog metabolizma hrane, mikrobnog disanja, topljivosti plinova i propusnosti jestivih filmova. Djelotvornost jestivih filmova u velikoj mjeri ovisi o njihovim barijernim svojstvima za plinove, vodenu paru, aromu i ulja, a to ovisi o kemijskom sastavu i strukturi polimera koji se koriste u proizvodnji filma, karakteristikama proizvoda i uvjetima skladištenja.

2.3.3.1. Propusnost plinova i vodene pare

Transport plinova u jestivom filmu se sastoji od tri koraka: adsorpcija plina na površinu jestivog filma, difuzija adsorbiranih čestica od jedne do druge strane filma i na kraju desorpcija čestica plina iz jestivog filma. Difuzija čestica plina kroz film može se opisati prvim Fickovim zakonom (Skurtys i sur., 2010). Tok (J) koji je proporcionalan koncentracijskom gradijentu može se izraziti kao

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

(1)

gdje su:

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

D= koeficijent difuzije ili difuzivnost (m^2/s)

C= koncentracija tvari koja difundira (g/m^3 ili mL/m^3)

X=debljina filma (m)

ili

$$J = D \cdot \frac{C_2 - C_1}{X} = Q/(A \cdot t)$$

(2)

gdje su:

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

A=površina filma (m^2)

t=vrijeme (s)

(1) stacionarna difuzija

(2) pri konstantnom koeficijentu difuzije

Primjenom Henryevog zakona i preraspodjelom navedenih jednadžbi dobiva se jednadžba za određivanje propusnosti

$$\frac{Q}{A \cdot t} = D \cdot S \cdot \frac{p_2 - p_1}{X} = P \cdot \Delta p / X$$

gdje su:

S=Henryjeva konstanta topljivosti (mole/atm)

Δp =razlika parcijalnog pritiska plina kroz film (Pa)

P=propusnost (mL ili g*m/m²*s*Pa)

Propusnost kisika, ugljikovog dioksida i vodene pare može se izračunati pomoću jednadžbe

$$P = Q \cdot X / (A \cdot t \cdot \Delta p)$$

(Park i Chinnan, 1995).

2.3.4. Optička svojstva: sjaj, prozirnost i boja

Optička svojstva utječu na neke ključne aspekte kvalitete hrane. Unutrašnja i površinska mikrostruktura filma imaju važnu ulogu u optičkim svojstvima filma. Na sjaj jestivih filmova utječe mikrostruktura, vrsta i količina surfaktanta, raspodjela i veličina promjera čestica disperzne faze, relativna vlažnost, vrijeme skladištenja i hrapavost površine (Skurtys i sur., 2010).

2.4. Postupci primjene jestivih filmova

2.4.1. Uranjanje

Premaz nastaje uranjanjem namirnice u jestivu otopinu sa određenim svojstvima kao što su gustoća, viskoznost, površinska napetost te brzina izvlačenja hrane iz otopine. Hrana je uronjena u otopinu 5-30 sekundi.

2.4.2. Premazivanje

Za metodu premazivanja utvrđeno je da je bolja od metoda uranjanja ili omatanja u smislu smanjenja gubitka vlage proizvoda koji se želi zaštititi.



Slika 1. Premazivanje krastavca otopinom jestivog filma (Dhanapal i sur., 2012)

2.4.3. Prskanje

U prehrambenoj industriji premazivanje prskanjem je uobičajeni postupak koji se obično koristi kada otopina za premazivanje nije jako viskozna. Viskozna otopina teško se ili uopće ne raspršuje. Sprej izlazi iz mlaznice kao dvodimenzionalni list tekućine koji se razbija u seriju cilindričnih vrpca. Kontrola konačne veličine kapljica i kvaliteta premaza ovise o temperaturi mlaznice, protoku zraka i tekućine, vlažnosti zraka i otopini polimera. Danas su sistemi prskanja automatizirani, no, kod formiranja polimernih filmova na ovaj način potrebno je izrazito voditi računa o vremenu i metodi sušenja.

2.4.4. Lijevanje otopine jestivog filma

Ova tehnika najčešće se koristi za izradu hidrokoloidnih filmova. Otopina vode, vode i etanola ili disperzije jestivih materijala lijevane su na prikladni supstrat i kasnije se suše. Tijekom sušenja filma otapalo isparava. Izbor supstrata je važan za dobivanje filma kako bi se on mogao izvaditi bez oštećenja nakon što otapalo ispari. Filmovi se suše u zračnoj pećnici nekoliko sati. Poželjan je optimalan sadržaj vlage u filmu (5-10% w/v). Struktura filma ovisi o uvjetima sušenja (relativna temperatura i vlažnost zraka), debljini mokrog lijevanja kao i sastavu otopine za lijevanje.

2.4.5. Ekstruzija

Proces ekstruzije temelji se na termoplastičnim svojstvima polimera. Kod ovog procesa često je potreban dodatak plastifikatora kao što su polietilen glikol i sorbitol u količini od 10-60% w/w. U usporedbi sa lijevanjem otopine jestivog filma ova metoda je korisna za industrijsku

proizvodnju jer ne zahtijeva dodatak otapala i nema potrebnog vremena za isparavanje (Dhanapal i sur., 2012).

2.5. Proizvodnja jestivih filmova s inkorporiranim bioaktivnim spojevima

Osim zaštite, jestivi filmovi se mogu koristiti kao nosioci bioaktivnih spojeva (npr. antioksidanasa) te time pospješuju funkcionalna svojstva hrane (Bourbon i sur., 2011, Eça i sur., 2014). Prije dodavanja antioksidanasa filmu potrebno je, osim antioksidacijskog kapaciteta odrediti i način na koji oni utječu na svojstva materijala u koji su inkorporirani i karakteristike hrane kao što su aroma, boja i kemijske interakcije. Antioksidansi se mogu dodavati filmovima u obliku čistih spojeva, esencijalnih ulja ili ekstrakata.

Tijekom prethodnih znanstvenih istraživanja, kao čisti spojevi dodavali su se askorbinska i limunska kiselina, resveratrol ili tokoferol. Prema podacima iz literature askorbinska kiselina sprječava enzimatsko posmeđivanje voća tako da smanjuje stvaranje kinona koji nastaju djelovanjem enzima polifenol oksidaze. Dodatak α -tokoferola, vanilina, propil galata, fenola, natrijevog tripolifosfata, butiliranog hidroksitoluena i hidroksianisola i resveratrola pozitivno utječe na smanjenje lipidne peroksidacije. Korištenje funkcionalnih jestivih filmova s dodanim čistim antioksidansima produljuje rok trajanja hrane koja je sklona oksidaciji. Esencijalna ulja su aromatična, prirodni su antioksidansi i pokazuju antimikrobna svojstva. Većina tih ulja predstavlja mješavinu terpena, fenolnih kiselina te ostalih aromatskih i alifatskih spojeva. Njihov sastav varira ovisno o vrsti ulja. Prisutnost esencijalnih ulja smanjuje lipidnu peroksidaciju i produljuje rok trajanja proizvoda. Esencijalna ulja mogu poboljšati zaštitu od propusnosti vodene pare zbog toga jer su hidrofobna. Dodatak ekstrakata kao što su ekstrakt čaja, voća, povrća, ginsenga, drugih biljnih vrsta i propolisa pojačava antioksidacijska svojstva, poboljšavaju kvalitetu proizvoda, produljuje rok trajanja i usporava oksidaciju lipida. U većini slučajeva antioksidacijski kapacitet filmova je proporcionalan količini dodanih aktivnih spojeva (Eça i sur., 2014). Pregled jestivih filmova s mogućim inkorporiranim bioaktivnim sastojcima prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Pregled znanstvenih istraživanja o dobivanju jestivih filmova s inkorporiranim bioaktivnim sastojcima

Materijal	Dodani sastojak	Referenca
Alginat	<i>kalcij</i>	Koushki i sur., 2015.
		Olivas i sur., 2008.
	<i>ulje origana</i>	Benavides i sur., 2012.
	<i>ulje češnjaka</i>	Pranoto i sur., 2005.
	<i>pire jabuke</i>	Rojas-Graü i sur., 2008.
	<i>ekstrakt ginsenga</i>	Norajit i sur., 2010.
	<i>askorbinska i limunska kiselina</i>	Robles-Sánchez i sur., 2013.
Kitozan	<i>želatina</i>	Arvanitoyannis i sur., 1998.
	<i>celuloza</i>	Hasegawa i sur., 1994
	<i>kolagen</i>	Zhang i sur., 1997.
	<i>ekstrakt galangala</i>	Mayachiew i sur., 2010.
	<i>ekstrakt indijskog ogrozda</i>	Mayachiew i sur., 2010.
	<i>masne kiseline</i>	Srinivasa i sur., 2007.
	<i>laktoferin</i>	Brown i sur., 2008.
	<i>oleinska kiselina</i>	Vargas i sur., 2009.
	<i>α-tokoferol</i>	Blanco-Fernandez i sur., 2013.
	<i>ekstrakt ružmarina</i>	Xiao i sur., 2010.
	<i>ulje cimeta</i>	Xing i sur., 2011.
	<i>esencijalno ulje lista cimeta, oleinska kiselina</i>	Perdones i sur., 2014.
Pektin	<i>instant zeleni čaj</i>	Kang i sur., 2007.
	<i>ulje lista cimeta</i>	Alaya-Zavala i sur., 2013.
Melgarejo-Flores i sur., 2013.		

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

U ovom radu kao materijal za izradu jestivih filmova korišteni su: alginat niske viskoznosti (Sigma-Aldrich, SAD), niskoesterificirani pektin (Cargill, Njemačka) i kitozan (Acros organic, SAD) te mljevena kakaova ljuska kao izvor bioaktivnih sastojaka za obogaćivanje filmova. Ljuska kakaovog zrna je nusproizvod pri preradi kakaovog zrna za proizvodnju čokolade, a dobivena je iz konditorske industrije „Kandit d.o.o.“ (2014. godine). Za potrebe izrade ovog rada, kakaova ljuska usitnjena je u mlinu za domaćinstvo te je provedeno granulacijsko frakcioniranje i izdvojena frakcija ujednačene veličine čestica za ekstrakciju.

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema ekstrakta kakaove ljuske

Ekstrakti kakaove ljuske pripremani su trostrukom (ponavljanom) ekstrakcijom primjenom hidroalkoholne mješavine kao otapala na sobnoj temperaturi, a u svrhu ekstrakcije bioaktivnih spojeva kakaove ljuske, primarno polifenola i metilksantina.

Reagensi:

1) 70%-tni etanol

Aparatura i pribor:

- 1) analitička vaga
- 2) staklene čaše volumena 100 mL
- 3) boca sisaljka, Büchnerov lijevak
- 4) vodena vakuum sisaljka
- 5) magnetska miješalica
- 6) filter papir Whatman br. 1

Postupak rada:

U staklene čaše od 100 mL odvažuje se 5,00 g uzorka i dodaje 50 mL otapala za ekstrakciju (70%-tni etanol). Ekstrakcija se provodi miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom 30 minuta, nakon čega se uzorak profiltrira preko Büchnerovog lijevka i vakuum sisaljke. Zaostali talog prenese se u staklenu čašu i ponovno ekstrahira sa novih 50 mL otapala prema prethodno opisanom postupku. Postupak ekstrakcije ponovi se još jednom, te se dobiveni ekstrakti nakon 3. ekstrakcije objedinjuju i koncentriraju uparavanjem na 5-puta manji volumen (30 mL). Suha tvar tako dobivenog ekstrakta iznosila je 0,97%, a pH vrijednost = 5,06.

3.2.2. Priprema jestivih filmova

Za formiranje filmova korišteno je tri vrste polimernih hidrokolooidnih materijala: alginat (A), pektin (P) i kitozan (K) uz dodatak glicerola kao plastifikatora.

Aparatura i pribor:

- 1) analitička vaga
- 2) staklene čaše volumena 100 mL
- 3) magnetska miješalica
- 4) Petrijeve zdjelice

Postupak rada:

U staklene čaše odvažuje se određena količina hidrokolooidnih praškastih materijala za pripremu 50 mL 2% (w/v) otopina alginata i pektina te 1% (w/v) otopine kitozana (K). Za pripremu kontrolnih filmova s navedenim materijalima suspenzije otopine su pripremljene u destiliranoj vodi, dok je u slučaju filmova s kitozansom pH otopine podešen na 2,50 primjenom octene kiseline. Otopinama se također dodaje 1% (w/v) glicerola (plastifikatora), te se homogenizira na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi do potpunog otapanja.

U slučaju filmova s inkorporiranim bioaktivnim spojevima pripremljene su otopine u prethodno pripremljenom ekstraktu kakaove ljuske.

Nakon pripreme otopina, formirani su filmovi lijevanjem u Petrijeve zdjelice (unutarnji promjer = 11,7 cm). U svaku Petrijevu zdjelicu izlijeva se 15 mL uzorka pomoću staklene pipete, kako bi se osigurala homogenost i jednoličnost filmova. Nakon izlijevanja otopina

Petrijeve zdjelice se postavljaju na ravnu površinu i filmovi se suše na temperaturi od 30°C 24 sata. Nakon 24 sata filmovi se uklanjaju iz Petrijevih zdjelica pomoću špatule i čuvaju u eksikatorima s osiguranim kontroliranim uvjetima vlage do analize.

3.2.3. Karakterizacija filmova

3.2.3.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari)

Udio vode i suhe tvari određen je gravimetrijskom metodom (određivanjem mase prije i nakon sušenja uzorka na 105°C do konstantne mase) prema AOAC metodi (1995).

Aparatura i pribor:

- 1) aluminijske posudice
- 2) staklene pipete volumena 10 mL
- 3) pinceta
- 4) analitička vaga
- 5) sušionik
- 6) eksikator

Postupak rada:

Udjel vode odn. suhe tvari određivan je u ekstraktima kakaove ljuske te formiranim filmovima. U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s izarenim kvarcnim pijeskom izvaže se oko 5,00 g ekstrakta ili 1,00 g filmova na analitičkoj vagi. Nakon vaganja posudice s uzorcima suše se u sušioniku na 105°C do postizanja konstante mase. Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru, posudice s osušenim uzorcima se ponovo važu na analitičkoj vagi. Sva mjerenja provedena su u paraleli a udjel vode i suhe tvari u ekstraktima i jestivim filmovima računa se pomoću jednadžbi

$$\begin{aligned} \text{Voda (\%)} &= ((m_0 + m_1) - m_2) / m_1 * 100 \\ \text{Suha tvar (\%)} &= 100 - \text{Voda (\%)} \end{aligned}$$

gdje su:

m_0 -masa aluminijske posudice

m_1 -masa uzorka

m_2 -masa aluminijske posudice i uzorka nakon sušenja.

3.2.3.2. Određivanje topljivosti filmova u vodi

Topljivost filmova u vodi određena je gravimetrijskom metodom prema postupku Rangel-Marrón i sur. (2013).

Aparatura i pribor:

- 1) aluminijska posudica za određivanje udjela suhe tvari
- 2) analitička vaga
- 3) pipete volumena 10 mL
- 4) sušionik
- 5) eksikator

Postupak rada:

Filmovi prethodno osušeni na 105°C i korišteni za određivanje udjela vode, izvagani su te su alginatni i pektinski filmovi suspendirani u 15 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi, dok su kitozanski filmovi suspendirani u istom volumenu vode zakiseljene octenom kiselinom (pH=2). Nakon 24 h, filmovi su uklonjeni iz otopine, a oko 5,00 g dobivene otopine izvaže se u osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu. Nakon vaganja lončići s uzorcima se stave u sušionik na 105 °C. Uzorci se suše do postizanja konstante mase, hlade i ponovno se zabilježi masa. Sva mjerenja provedena su u paraleli.

Topljivosti filmova u vodi računa se pomoću jednadžbe:

$$\text{Topljivost u vodi (\%)} = \frac{(m_0 + m_1) - m_2}{m_1} \cdot 100$$

gdje su:

m_0 -masa staklenog lončića

m_1 -masa uzorka

m_2 -masa staklenog lončića i uzorka nakon sušenja.

Određivanje topljivosti kitozana računa se pomoću jednadžbe

$$\text{Topljivost u vodi (\%)} = ((m_0 - m_1) / m_0) * 100$$

gdje su:

m_0 -početna masa suhe tvari uzorka

m_1 -masa suhe tvari uzorka nakon otapanja u vodi (24 h)

3.2.3.3. Određivanje debljine filmova

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

3.2.3.4. Određivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva filmova određena su analizatorom teksture (Texture analyzer, TA.HDplus, Stable Micro Systems, UK) korištenjem jednoosnog vlačnog ispitivanja. Učvršćivanje uzoraka izvedeno je korištenjem hvataljki u obliku potkove (A/HDG, Stable Micro Systems, UK). Čvrsto i stabilno učvršćivanje uzoraka postignuto je korištenjem čeličnih čeljusti širine 30 mm i hrapave površine. Parametri ispitivanja podešeni su na razvlačenje (rastezanje), pri čemu je brzina prije testa bila podešena na $1,00 \text{ mms}^{-1}$, a tijekom testa na $0,05 \text{ mms}^{-1}$. Test se provodio do točke pucanja.

Za određivanje mehaničkih svojstava jestivi filmovi su izrezani na trakice veličine $1 \times 2,5 \text{ cm}$. Prije samog ispitivanja svi uzorci bili su temperirani na sobnu temperaturu pri kojoj su se analize i provodile ($21^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$). Analiza mehaničkih svojstava svakog uzorka provedena je 3 puta.

Na temelju dimenzija uzoraka, početna deformacijska visina mjerila se kao udaljenost između dvije čeljusti, a površina opterećenja izračunala kao deformacijska visina \times širina uzorka. Cauchyjevo naprezanje opisano jednadžbom izabrano je kao prikladno za proračun, s

obzirom da funkcionira pri malim produženjima i elastičnim deformacijama, koje su prisutne u uzorku.

$$\varepsilon = \frac{\delta L}{L_0}$$

gdje su:

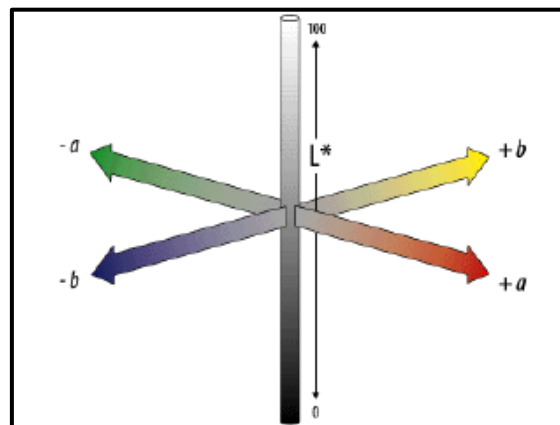
δL promjena u dužini uzorka nastala zbog djelovanja vlačne sile
 L_0 deformacijska visina.

Završno naprezanje računa se kao produženje uzorka do točke pucanja.

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

3.2.3.5. Određivanje boje

CIE L*a*b* prostorni model boja je trodimenzionalni sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja u kojima su sudjelovali ljudi dobrog vida bez deformacije viđenja boja. Koordinate CIELAB sustava boja temelje se na Heringtonovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava.



Slika 2. CIE L*a*b* prostor boja (Petrović i sur., 2013)

Raspon boja je crveno-zeleno za os a, raspon boja žuto-plavo za os b, te akromatska os L sa vrijednosti u rasponu od 0% (crna) do 100% (bijela). Brojčane vrijednosti u CIE L*a*b* kolornom sustavu prikazuju sve boje koje ljudsko oko može percipirati. (Petrović i sur., 2013).

Postupak rada:

Boja jestivih filmova određena je pomoću kolorimetra pri čemu su dobivene L*, a* i b* vrijednosti. Za svaki pojedinačni film mjerenje je provedeno na nekoliko različitih mjesta, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom devijacijom. Rezultati se izražavaju kao vrijednost kolorimetrijske razlike (ΔE) (Petrović i sur., 2013). Kolorimetrijska razlika opisuje kvalitetu reprodukcije, odnosno pokazuje odstupanje reprodukcije od originala. Odstupanje boja može se provesti na osnovu vrijednosti kolorimetrijske razlike prema slijedećim kriterijima:

- $\Delta E < 0,2$ = razlika boja se ne vidi,
- $\Delta E = (0,2-1)$ = razlika boja se primjećuje,
- $\Delta E = (1-3)$ = razlika boja se vidi,
- $\Delta E = (3-6)$ = razlika boja se dobro vidi,
- $\Delta E > 6$ = očigledna odstupanja boja).

Vrijednost kolorimetrijske razlike se izračunava pomoću jednadžbe:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$
$$\Delta L = L_0 - L_1$$
$$\Delta a = a_0 - a_1$$
$$\Delta b = b_0 - b_1$$

gdje su:

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

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

3.2.4. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova

Za određivanje bioaktivnog sastava filmova pripremljene su otopine svih uzoraka filmova u vodi. U uzorke kitozanskih filmova dodana je askorbinska kiselina u svrhu podešavanja odgovarajuće pH vrijednosti pri kojoj su ti filmovi topljivi u vodi. Kako bi se usporedio utjecaj sušenja i vremenskog skladištenja filmova, i simulirao način primjene filmova na prehrambenim proizvodima, filmovi su također sušeni na povećanoj temperaturi (60°C) i nakon toga skladišteni na sobnoj temperaturi tijekom mjesec dana u svrhu usporedbe očuvanja njihovog bioaktivnog sastava s početnim sastavom (neposredno nakon formiranja).

3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri 765 nm (Ough i Amerine, 1988).

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen vodom u omjeru 1:2)
- 2) 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Aparatura i pribor:

- 1) staklene epruvete
- 2) stalak za epruvete
- 3) pipete volumena 10 ml
- 4) mikropipete volumena 100 μL i 500 μL
- 5) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 6) spektrofotometar.

Postupak rada:

U epruvetu se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20%-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20%-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na 765 nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i uzorci samo što umjesto uzorka sadrži 100 μL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g čestica. Udio ukupnih polifenola računa se pomoću jednadžbe

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

gdje su:

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

x-koncentracija otopine galne kiseline (mg/L).

3.2.4.2. Određivanje udjela flavan-3-ola

Metoda se temelji na reakciji vanilina (*p*-hidroksibenzaldehida) s hidroksilnim skupinama na položajima C6 i C8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet crvenog obojenja, koji se određuje spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm, direktno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (Price i sur., 1978).

Reagensi:

- 1) vanilin
- 2) metanol
- 3) koncentrirana klorovodična kiselina (HCl)

Aparatura i pribor:

- 1) Odmjerna tikvica (250 mL)

- 2) staklene epruvete
- 3) stalak za epruvete
- 4) pipeta volumena 5 mL
- 5) mikropipeta volumena 500 μ L
- 6) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 7) spektrofotometar

Postupak rada:

Za provođenje metode pripremi se 4%-tna (m/v) otopina vanilina u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 3 mL pripremljene otopine vanilina i 500 μ L uzorka. Nakon 5 minuta u svaku epruvetu se doda 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Nakon 15 minuta od dodatka kiseline mjeri se apsorbancija na 500 nm pomoću spektrofotometra. Za pripremu slijepe probe umjesto uzorka dodaje se 500 μ L čistog metanola. Za svaki uzorak provedene su tri paralelne probe. Udio flavan-3-ola računa se pomoću jednadžbe

$$\text{(+)katehin} = 290,8 \cdot \Delta A$$

gdje je:

ΔA -razlika apsorbancije između uzorka i slijepe probe.

3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Blois, 1958; Brand-Williams i sur., 1995).

Reagensi:

- 1) metanol
- 2) DPPH

Aparatura i pribor:

- 1) Odmjerna tikvica (250 mL)
- 2) staklene epruvete
- 3) pipeta volumena 5 mL
- 4) mikropipeta volumena 100 μ L
- 5) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 6) spektrofotometar

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μ L ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH i promiješa. Reakcija se odvija 30 min u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola.

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije (Y-os (ΔA)) o koncentraciji (X-os (mM/L)), odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije DPPH radikala (ΔA) nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati ΔA preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta - analog vitamina E).

$$y = 0,6030x - 0,0068$$

gdje su:

- x – koncentracija otopine Trolox-a (mg/L)
- y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

Rezultati se izražavaju su kao maseni udjel (μ g/g uzorka) ekvivalenta Trolox-a te su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5. Senzorska analiza

Senzorsko ocjenjivanje filmova provedeno je primjenom hedonističke bodovne ljestvice, s ocjenama od 1-10, prema kojoj 10 označava izrazito poželjnu kvalitetu, a 1 označava defektan proizvod. U senzorskom ocjenjivanju sudjelovalo je 30 panelista, djelatnika i studenata Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (podjednak broj osoba muškog i ženskog spola, starosti između 25 - 40 godina) (Ozdemir i Floros, 2008).

Panelisti su prije samog ocjenjivanja raspravljali i upoznavali se sa sličnim uzorcima te sa skalom intenziteta, dok se nije postigao dogovor oko senzorskih atributa koji će biti ocjenjivani te njihove kvantifikacije. Uzevši u obzir prethodna iskustva panelista i znanstvene radove iste tematike, izabrani su atributi koji su se činili najpogodnijima za senzorsku karakterizaciju uzoraka.

Senzorskom analizom ocjenjivani su: izgled, boja, transparentnost, elastičnost i prihvatljivost. Svakom svojstvu je dodijeljen faktor značajnosti pomoću kojeg su izračunati ponderirani bodovi, odnosno njihova srednja vrijednost i pripadajuća devijacija.

3.2.6. Određivanje koeficijenta korelacije

Korelacija je sukladnost vrijednosti dviju skupina podataka, a iskazuje stupanj povezanosti ispitivanih pojava. Upotreba koeficijenta korelacije ovisi o vrsti podataka, odnosno o ljestvici koju slijede podaci. Najčešće se koriste Pearsonov i Spearmanov koeficijent korelacije.

Za tumačenje vrijednosti koeficijenta korelacije (r) vrijede ista pravila za oba koeficijenta, te se smatra da vrijednost r od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 upućuju kako nema povezanosti, dok vrijednosti od 0,25 do 0,50 ili od -0,25 do -0,50 upućuju na slabu povezanost među varijablama. Vrijednosti r od 0,50 do 0,75 ili od -0,50 do -0,75 upućuje na umjerenu do dobru povezanost, te vrijednosti r od 0,75 do 1 ili od -0,75 do -1 upućuju na vrlo dobru do izvrsnu povezanost među varijablama (Udovičić i sur., 2007). Međusobni odnos određen je za senzorska svojstva, mehaničko svojstvo elastičnosti i L^* -vrijednosti rezultata određivanja boje.

4. REZULTATI

U ovom radu su, korištenjem prirodnih biopolimernih materijala; alginata, pektina i kitozana, pripremljeni kontrolni jestivi filmovi i filmovi u ekstraktu kakaove ljuske u svrhu njihovog obogaćivanja bioaktivnim spojevima. Formiranim filmovima određena su fizikalna (debljina, udio suhe tvari i vode – tablica 4; topljivost u vodi – slika 3; boja – tablica 5), mehanička (vlačna čvrstoća, elastičnost, rad, naprezanje i deformacija – tablica 6) i senzorska svojstva (izgled, prihvatljivost, elastičnost, boja i transparentnost – slika 5), bioaktivni sastav (udio ukupnih polifenola i flavan-3-ola – tablica 7) i antioksidacijski kapacitet prije i nakon sušenja, te je provedena korelacijska analiza pojedinih svojstava (senzorska svojstva, mehaničko svojstvo elastičnosti i boja (L^* vrijednost) – tablica 8). U svrhu bolje vizualne karakterizacije, slika 4. prikazuje digitalne fotografije pripremljenih jestivih filmova.

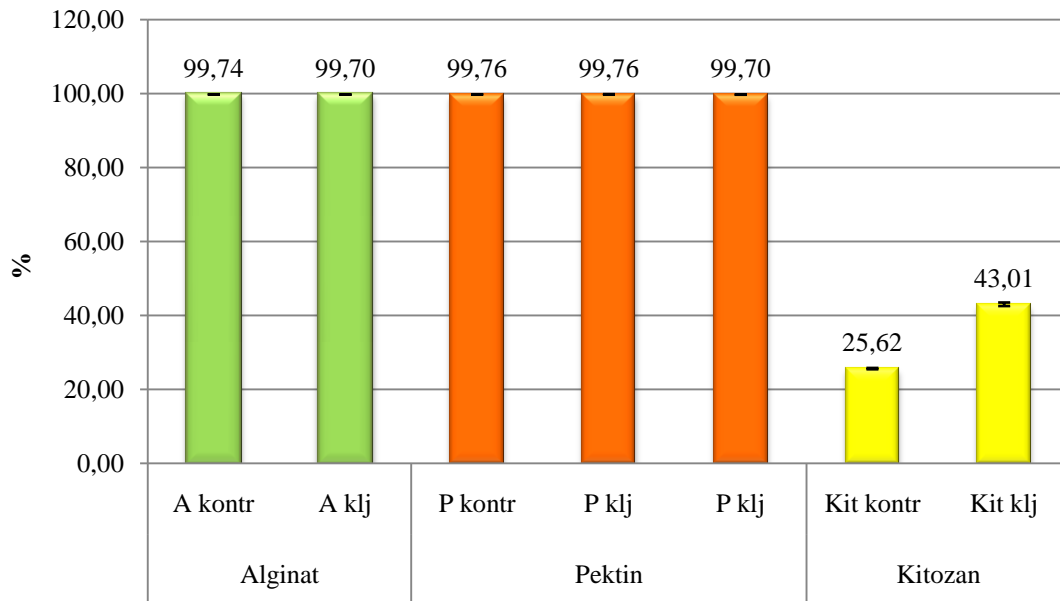
4.1. Usporedba fizikalnih svojstava jestivih filmova

Tablica 4. Debljina filma, udio suhe tvari i vode u alginatnim, pektinskim i kitozanskim kontrolnim filmovima i onima formiranim u ekstraktu kakaove ljuske

Uzorak	Debljina [μm]	Suhe tvar [%]	Voda [%]
A_{kontr}	46,00 \pm 12,82	81,52 \pm 1,69	18,49 \pm 1,69
A_{klj}	46,22 \pm 14,31	87,23 \pm 1,96	12,78 \pm 1,96
P_{kontr}	33,80 \pm 8,64	85,25 \pm 1,50	14,75 \pm 1,20
P_{klj}	46,83 \pm 9,17	85,11 \pm 1,48	14,89 \pm 1,48
P_{klj}	61,80 \pm 7,68	85,27 \pm 1,87	14,73 \pm 1,87
$\text{Kit}_{\text{kontr}}$	38,25 \pm 3,42	88,27 \pm 1,57	11,74 \pm 1,57
Kit_{klj}	104,67 \pm 10,34	83,24 \pm 1,68	16,76 \pm 1,68

Kontr- kontrolni film

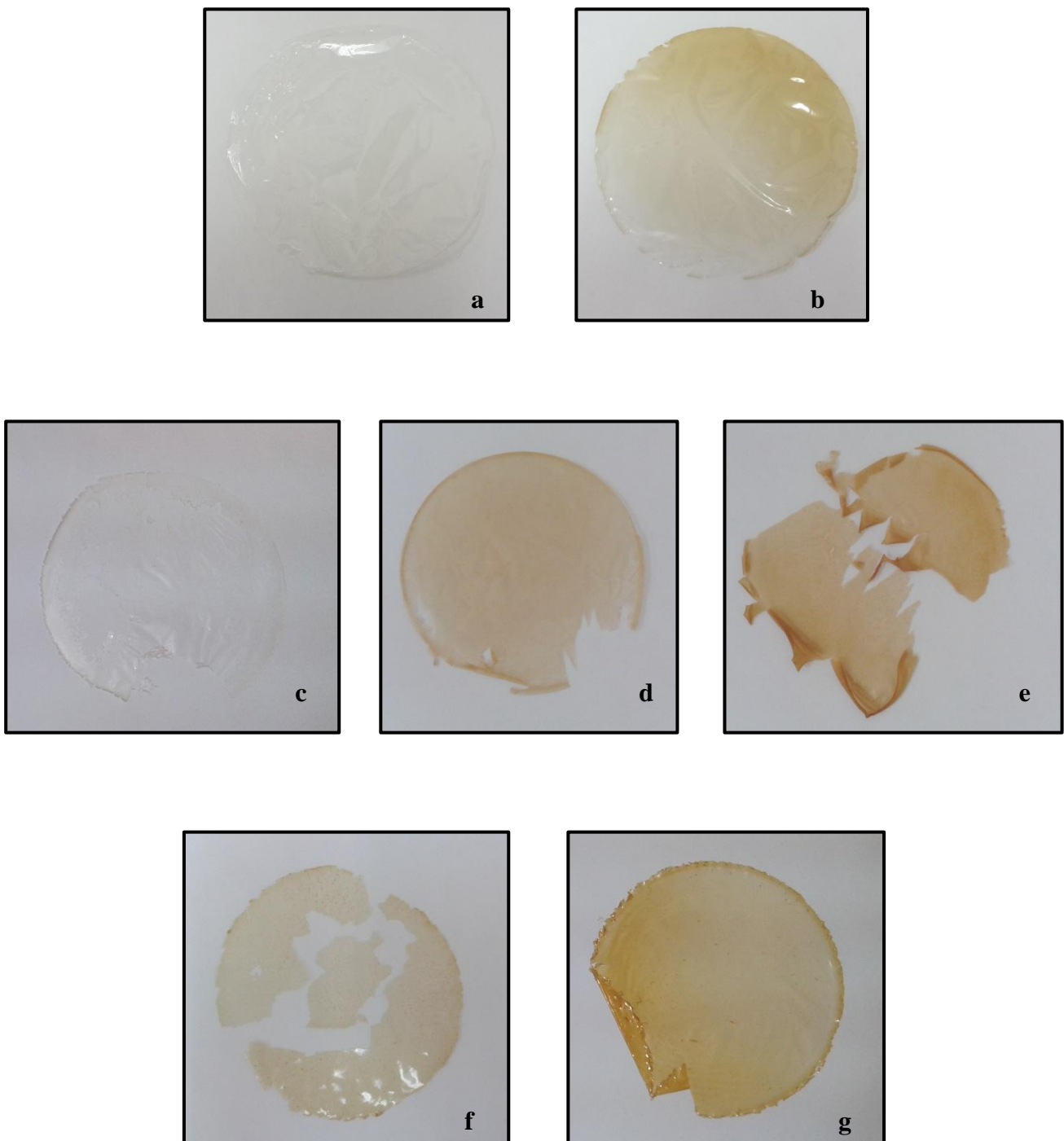
Klj – kakova ljuska



Slika 3. Topljivost u vodi alginatnih, pektinskih i kitozanskih kontrolnih filmova i filmova formiranih u ekstraktu kakaove ljuške

Tablica 5. Boja alginatnih, pektinskih i kitozanskih kontrolnih filmova i filmova formiranih u ekstraktu kakaove ljuške

Uzorak	L*	a*	b*	ΔE
A _{kontr}	25,18±6,48	-0,44±0,38	0,76±0,83	-
A _{klj}	27,31±4,49	0,23±0,19	3,25±1,11	5,43±1,90
P _{kontr}	31,53±1,27	-0,21±0,06	0,14±0,31	-
P _{klj}	30,07±1,73	0,76±0,24	5,31±0,63	5,68±1,10
P _{klj}	26,45±5,35	0,82±0,17	5,49±1,31	8,40±4,29
Kit _{kontr}	28,09±3,41	-0,36±0,14	3,31±0,48	-
Kit _{klj}	24,87±3,39	-0,46±0,12	6,53±0,82	5,26±2,54



Slika 4. Fotografije jestivih filmova a) alginat-kontrolni, b) alginat-kakaova ljuska, c) pektin-kontrolni, d) pektin-kakaova ljuska, e) pektin-kakaova ljuska, f) kitozan-kontrolni, g) kitozan-kakaova ljuska

4.2. Mehanička svojstva jestivih filmova

Tablica 6. Mehanička svojstva alginatnih, pektinskih i kitozanskih kontrolnih filmova i filmova formiranih u ekstraktu kakaove ljuske

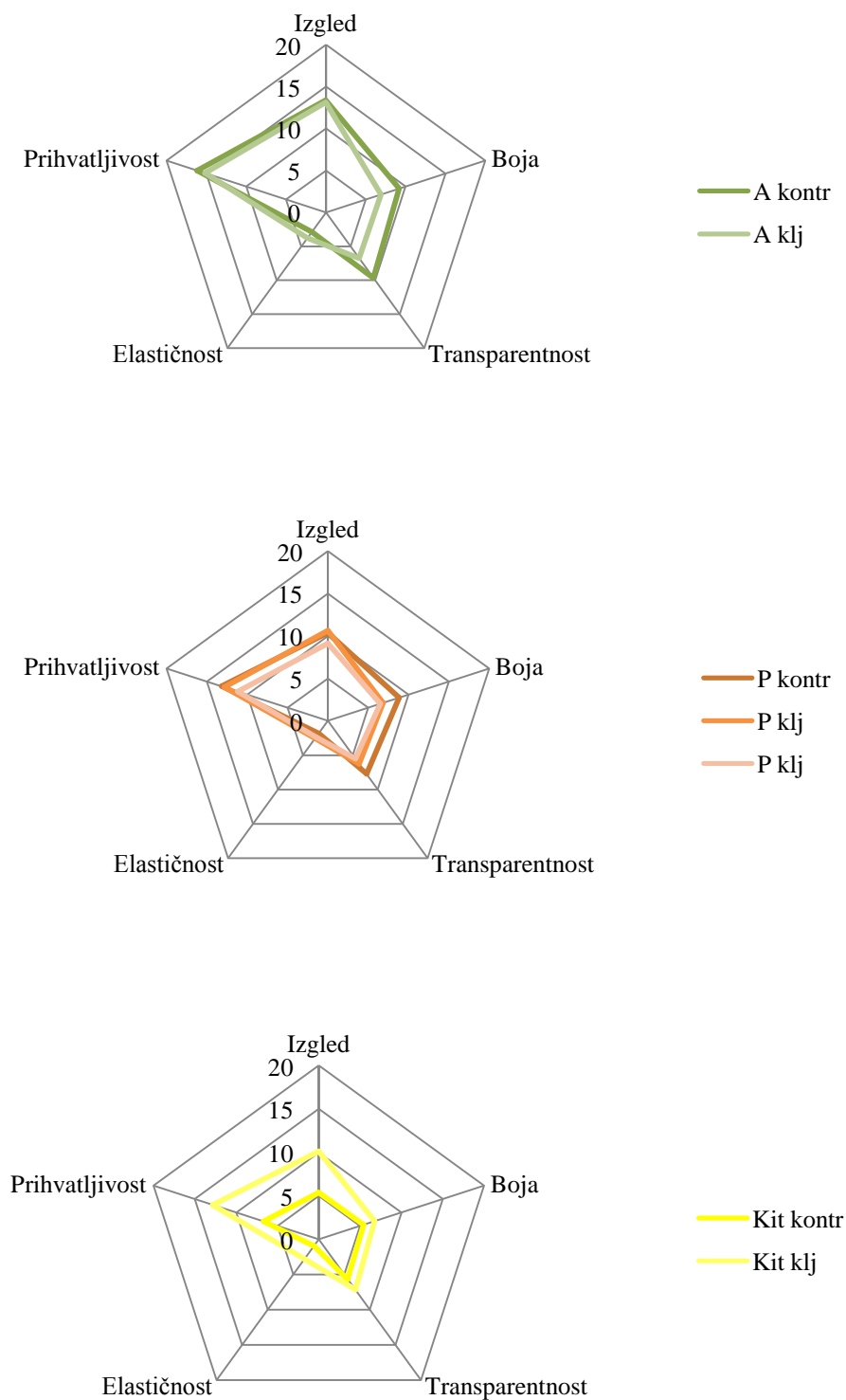
Uzorak	Vlačna čvrstoća [N]	Elastičnost [mm]	Elastičnost [%]	Rad	Naprezanje [Pa]	Deformacija [%]
A_{kontr}	6,17±0,35	14,74±0,19	49,12	3091,08±371,59	305962	0,73
A_{klj}	1,01±0,07	15,27±0,45	50,88	2062,99±218,30	50074	1,70
P_{kontr}	0,94±0,08	10,77±0,48	35,89	451,25±24,61	46634	0,43
P_{klj}	1,49±0,15	12,11±0,80	40,37	1935,55±215,32	5951	3,15
P_{klj}	1,80±0,03	11,73±0,93	39,11	1721,15±137,93	89429	1,12
Kit_{kontr}	0,80 ±0,24	11,56±0,54	31,23	894,00±57,04	28745	1,34
Kit_{klj}	0,73±0,04	10,33±0,75	34,44	1341,39±37,55	36075	2,60

4.3. Usporedba količine bioaktivnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta jestivih filmova prije i nakon njihovog sušenja

Tablica 7. Količina bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet alginatnih, pektinskih i kitozanskih kontrolnih filmova i filmova formiranih u ekstraktu kakaove ljuske

Uzorak	Polifenoli prije sušenja [mg/g]	Polifenoli nakon sušenja [mg/g]	Flavan-3-oli prije sušenja [mg/g]	Flavan-3-oli nakon sušenja [mg/g]	Antioksidacijski kapacitet prije sušenja [mmol Trolox/g]	Antioksidacijski kapacitet nakon sušenja [mmol Trolox/g]
A_{kontr}	0,10±0,01	0,05±0,00	1,50±0,98	1,87±0,54	-0,01±0,00	0,00±0,00
A_{klj}	9,18±0,92	15,99±0,99	2,20±0,71	3,58±0,06	0,07±0,00	0,07±0,00
P_{kontr}	0,01±0,00	0,038±0,00	3,64±0,84	1,34±0,80	0,00±0,00	0,01±0,00
P_{klj}	17,46±1,01	24,76±1,18	4,49±0,85	3,35±0,94	0,08±0,01	0,10±0,03
P_{klj}	14,82±1,27	22,86±1,07	2,85±0,23	2,41±0,15	0,07±0,01	0,10±0,03
Kit_{kontr}	36,98±0,88	-	2,64±0,03	-	10,36±1,13	-
Kit_{klj}	93,59±5,49	-	2,20±0,13	-	11,80±0,71	-

4.4. Usporedba rezultata senzorskog ocenjivanja jestivih filmova



Slika 5. Senzorska analiza alginatnih, pektinskih i kitozanskih kontrolnih filmova i filmova formiranih u ekstraktu kakaove ljuške

4.5. Medusobni odnos određenih svojstava jestivih filmova

Tablica 8. Korelacijska analiza pojedinih svojstava jestivih filmova

	Senzorsko ocjenjivanje					Mehaničko svojstvo	Boja
Svojstvo	Transpare- ntnost	Izgled	Boja	Elastičnost	Prihvatlji- vost	Elastičnost	L^*
Transpare- ntnost	1	-	-	-	-	-	-
Izgled	0,68	1	-	-	-	-	-
Boja	0,89	0,70	1	-	-	-	-
Elastičnost	0,31	0,87	0,28	1	-	-	-
Prihvatljivost	0,72	0,99	0,76	0,83	1	-	-
Elastičnost	0,34	0,89	0,21	0,74	0,79	1	-
L^*	-0,22	-0,20	0,10	-0,39	-0,19	-0,26	1

5. RASPRAVA

U ovom radu pripremljeni su jestivi filmovi od alginata, pektina i kitozana otapanjem navedenih materijala u destiliranoj vodi (kontrolni filmovi) te u ekstraktu kakaove ljuske, kako bi se pripremili funkcionalni, obogaćeni filmovi i usporedili sa kontrolnima pripremljenima od istih biopolimernih materijala. Pripremljenim filmovima određivana su fizikalna, kemijska i mehanička svojstva, provedeno je senzorsko ocjenjivanje te korelacijska analiza kako bi se utvrdilo da li postoji odnos između pojedinih parametara kakvoće dobivenih filmova (mehanička svojstva, boja, senzorska svojstva).

5.1. Debljina, udio vode i suhe tvari

U tablici 4 prikazani su rezultati određivanja debljine jestivih filmova, pri čemu najveću debljinu ima kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuske ($104,67 \pm 10,34 \mu\text{m}$), dok je najtanji kontrolni pektinski film ($33,80 \pm 8,64 \mu\text{m}$), nakon čega slijedi kontrolni kitozanski film ($38,25 \pm 2,35 \mu\text{m}$). Općenito se može primijetiti kako je debljina kontrolnih filmova manja u odnosu na filmove pripremljene u ekstraktu kakaove ljuske. Prema rezultatima Bourbona i suradnika (2011) debljina kitozanskih filmova je značajno veća i iznosi 147-186 μm , što je posljedica korištenja manje ploče za izlivanje (promjera 8,5 cm) te većeg volumena otopine za formiranje filma (28 mL filma), u odnosu na one korištene u ovom radu (Petrijeva zdjelica promjera 11,7 cm i volumen od 15 mL filma). Manji volumen te posljedično manja debljina filmova formiranih u ovom radu korišteni su s ciljem dobivanja tankih prevlaka i filmova na raznovrsnim prehrambenim proizvodima, koji bi eliminirali vizualno primjećivanje često debljih prevlaka filmova na proizvodima.

U istoj tablici prikazani su rezultati udjela suhe tvari i vode u formiranim filmovima. Najveći udio suhe tvari sadrži kontrolni kitozanski film ($88,27 \pm 1,57 \%$), a najmanji kontrolni alginatni film ($81,52 \pm 1,69 \%$). S obzirom na udjel vode i suhe tvari, nije primijećen općeniti trend povećanja ili smanjenja udjela ovih parametara nakon pripreme u ekstraktu kakaove ljuske, već je udjel vode i suhe tvari vezan uz pojedini materijal i njegova hidrokolojna svojstva.

5.2. Topljivost u vodi

Topljivost pripremljenih jestivih filmova određena je u destiliranoj vodi bez podešavanja pH vrijednosti za alginatne i pektinske filmove, te u vodi zakiseljenoj octenom kiselinom (pH=2)

za kitozanske filmove. Alginatni i pektinski kontrolni filmovi i filmovi pripremljeni u ekstraktu kakaove ljuške pokazuju gotovo potpunu topljivost u vodi (~99,70%), dok je topljivost kitozanskih filmova znatno manja- topljivost kontrolnog kitozanskog filma iznosi 25,62%, a topljivost filma pripremljenog u ekstraktu kakaove ljuške 43,01% (slika 3). Topljinost kitozanskih filmova u istraživanju Kima i suradnika (2006) određivana je u ovisnosti o pH vrijednosti otapala te vrsti kiseline koja se koristila za podešavanje pH vrijednosti. Prema tim rezultatima potpuna topljivost kitozanskog filma postignuta je samo korištenjem mliječne kiseline, u usporedbi s mravljom i octenom kiselinom, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu, prema kojima je topljivost u octenoj kiselini oko 30-40%. Zbog topljivosti u vodi alginatni i pektinski filmovi ne pokazuju dobra svojstva za zaštitu od propusnosti vode i vodene pare, što je u skladu s rezultatima Skurtysa i suradnika (2010), no, za detaljnije utvrđivanje kakvoće i svojstava alginatnih, pektinskih i kitozanskih filmova potrebno je provesti dodatna određivanja barijernih svojstava prema drugim plinovima (kisik i ugljični dioksid).

5.3. Boja formiranih filmova

Rezultati određivanja boje jestivih filmova prikazani su u tablici 5. Numeričke vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* pokazuju velike razlike ovisno o vrsti filma, odnosno, o tome da li je film pripremljen u vodi (kontrolni uzorci) ili ekstraktu. Prema vizualnim karakteristikama filmova, prikazanim na fotografijama na slici 4, kontrolni kitozanski film je blijedo žute boje za razliku od alginatnog i pektinskog kontrolnog filma koji su bezbojni. Sukladno tome, najveću L^* vrijednost pokazuje kontrolni pektinski film ($31,53 \pm 1,27$) što znači da je on najsvjetliji, dok je kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuške najtamniji zbog najmanje L^* vrijednosti ($24,87 \pm 3,39$).

Prema dobivenim rezultatima, pektinski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuške ima najpozitivniju a^* vrijednost ($0,82 \pm 0,17$), što prema CIELab kolorimetrijskom sustavu označava najzastupljenije crvene komponente boje. Sukladno tome, kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuške ima najnegativniju a^* vrijednost ($-0,46 \pm 0,12$) - najizraženiju zelenu komponentu boje te najpozitivniju b^* vrijednost ($6,53 \pm 0,82$), odnosno najizraženiju žutu boju. Prema rezultatima vrijednosti ukupne razlike boje - ΔE , nema značajnih razlika u tom parametru s obzirom na različite vrste filmova (proizvedene od različitih biopolimernih materijala), već je taj parametar izraženiji s obzirom na debljinu filma

(najveću vrijednost pokazuje pektinski film). Također, taj parametar daje podatak o najvećoj razlici boje navedenog pektinskog filma u odnosu na kontrolni pektinski film.

5.4. Bioaktivni sastav i antioksidacijski kapacitet filmova

Kao izvor bioaktivnih spojeva, posebice polifenola u ovom radu korišten je ekstrakt kakaove ljuske. Udio ukupnih polifenola u ekstraktu kakaove ljuske prema istraživanju Quiroz-Reyesa i suradnika (2013) iznosio je od $17,85 \pm 1,33$ do $25,34 \pm 1,85$ mg/g, ovisno o tehnici pripreme ekstrakta. Ovi rezultati u skladu su s onima dobivenima u ovom radu, koji su slični ili veći kao i udio polifenola u pripremljenim jestivim filmovima u ovome radu (ovisno o udjelu određenom prije ili nakon njihovog sušenja).

Udio ukupnih polifenola u kontrolnom alginatnom i pektinskom filmu je zanemariv, što je i sukladno očekivanjima. No, značajne razlike vidljive su u udjelima ukupnih polifenola između filmova formiranih od različitih biopolimernih materijala. Prema tim rezultatima, najmanji udjel polifenola određen je u alginatnom filmu pripremljenom u ekstraktu kakaove ljuske ($9,18 \pm 0,92$ mg/g), dok najveći udio pokazuje kontrolni kitozanski film ($36,98 \pm 0,88$ mg/g). Rezultati udjela polifenola kitozanskih filmova značajno su veći od ostalih filmova zbog njihovog otapanja u vodi uz dodatak askorbinske kiseline (sniženje pH vrijednosti kako bi se kitozan u potpunosti otopio), koja reagira s Folin-Ciocalteu reagensom prilikom određivanja udjela ukupnih polifenola. Udio ukupnih polifenolnih spojeva u pektinskom filmu pripremljenom u ekstraktu kakaove ljuske je veći nego u onom pripremljenom od alginata i iznosi od $14,82 \pm 1,27$ do $17,46 \pm 1,01$ mg/g. Najveći učinak obogaćivanja polifenolnim spojevima određen je u kitozanskom filmu pripremljenom u ekstraktu kakaove ljuske ($93,59 \pm 5,49$ mg/g). U istraživanju Siripatrawan i Harte (2010) za izradu jestivih kitozanskih filmova korišten je ekstrakt zelenog čaja kao izvor bioaktivnih spojeva te se njegovim dodavanjem u većoj koncentraciji proporcionalno povećavao i udio polifenolnih spojeva filmova, dok je udio u kontrolnom filmu bio zanemariv. Udio flavan-3-ola i antioksidacijski kapacitet u ovom radu kod alginatnog i pektinskog filma su proporcionalni udjelu ukupnih polifenola u tim filmovima te pektinski film pokazuje veće vrijednosti (tablica 7). Kontrolni filmovi pokazuju izrazito malu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta zbog malog sadržaja polifenolnih spojeva. Najveći antioksidacijski kapacitet određen je u kitozanskom filmu pripremljenom u ekstraktu kakaove ljuske ($11,80 \pm 0,71$ mmol Trolox/g), što je ponovno posljedica prisutnosti askorbinske kiseline koja je snažan antioksidans (Hacişevki, 2009). Nakon sušenja filmova (60 °C) došlo je do povećanja udjela ukupnih polifenola u svim

filmovima, osim pektinskog filma pripremljenog u ekstraktu kakaove ljuške koji sadrži manji udio flavan-3-ola nakon sušenja.

5.5. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva jestivih filmova prikazana su u tablici 6. Najbolju vlačnu čvrstoću pokazao je alginatni kontrolni film ($6,17 \pm 0,35$ N), dok je najmanju pokazao kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuške ($0,73 \pm 0,04$ N). Kontrolni kitozanski film pokazuje najmanji postotak elastičnosti (31,23%), dok je najveća elastičnost alginatnog filma pripremljenog u ekstraktu kakaove ljuške (15,27%). Rezultati određivanja vlačne čvrstoće u skladu su s rezultatima elastičnosti filmova, prema kojima najbolja svojstva ovih parametara mehaničkih svojstava imaju alginatni filmovi.

Vrijednosti rada i napreznja također su najveće za kontrolni alginatni film. Najmanji rad i postotak deformacije pokazuje kontrolni pektinski film, što upućuje na činjenicu da kontrolni filmovi općenito pokazuju bolja i poželjnija mehanička svojstva u odnosu na filmove pripremljene u ekstraktu kakaove ljuške. To potvrđuju i rezultati napreznja prema kojima pektinski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuške ima najmanju vrijednost napreznja, dok mu je postotak deformacije najveći. Ovi rezultati ukazuju da priprema bioaktivnih filmova u ekstraktima prirodnih supstrata, zbog heterogenog i kompleksnog sastava takvih ekstrakata koji ne sadrže samo nisko molekulske bioaktivne spojeve, već i složenije topljive sastojke kao što su topljivi polisaharidi ili proteini, narušava mehanička svojstva filmova. Naime, prema ovim rezultatima, prisutnost takvih spojeva iz prirodnih ekstrakata može utjecati na hidrokolojna svojstva i intermolekulska povezanost velikih polisaharidnih lanaca, odnosno, prekidati njihove specifične interakcije, što direktno utječe i na određivana mehanička svojstva filmova.

Na temelju dobivenih rezultata, usporedbom mehaničkih svojstava svih filmova pokazalo se da su najpoželjnija svojstva alginatnog kontrolnog filma.

5.6. Senzorska svojstva ocjenjivanih filmova

Senzorske karakteristike jestivih filmova ocjenjivane u ovom radu bile su: izgled, boja, transparentnost, elastičnost i prihvatljivost. Međusobno su uspoređivani istovrsni kontrolni filmovi i oni pripremljeni u ekstraktu kakaove ljuške (slika 5).

Prema rezultatima senzorskog ocjenjivanja, sva svojstva alginatnog i pektinskog kontrolnog filma bolje su ocijenjena u odnosu na filmove pripremljene u ekstraktu kakaove ljuske, osim elastičnosti. Suprotno tome, sva svojstva kitozanskog filma pripremljenog u ekstraktu kakaove ljuske ocijenjena su bolje od svojstava kontrolnog kitozanskog filma. Usporedbom svih jestivih filmova najbolja svojstva pokazao je kontrolni alginatni film, a najlošija svojstva kontrolni kitozanski film. Prema istraživanju Ozdemira i Florosa (2008) senzorski je određivana ljepljivost i izgled proteinskih jestivih filmova kao kritičnih svojstava koja pružaju važne informacije za primjenu jestivih filmova u prehrambenoj industriji. Filmovi su pripremljeni od izolata proteina sirutke uz različit udio sorbitola kao plastifikatora (30-50% w/w), sa ili bez dodatka pčelinjeg voska i kalijeveg sorbata čija je svrha poboljšanje svojstava filmova. Rezultati tog rada pokazali su da povećanje udjela pčelinjeg voska povećava ljepljivost filmova i ima negativan utjecaj na izgled filma. Filmovi kojima je dodan samo plastifikator pokazuju najbolja senzorska svojstva, što znači da dodani materijali nepovoljno utječu na njih. Dobiveni rezultati ovog rada upućuju na činjenicu da su pektinski i alginatni filmovi poželjniji prema svojim senzorskim karakteristikama, te da obogaćivanje filmova bioaktivnim spojevima iz ekstrakta kakaove ljuske ima nepovoljan učinak na senzorska svojstva u odnosu na kontrolne filmove što je u skladu s rezultatima prethodno navedenog istraživanja.

5.7. Korelacijska analiza određenih svojstava jestivih filmova

Međusobni odnosi pojedinih svojstava filmova, izraženi kao koeficijenti linearne korelacije prikazani su u tablici 8. Vrijednosti koeficijenata korelacije za parametar boje L^* i ostala svojstva upućuju na to da među njima nema povezanosti ($r=-0,39 - 0,10$). Postotak elastičnosti pokazuje vrlo dobru povezanost sa elastičnosti, prihvatljivosti i izgledom, čiji su rasponi koeficijenata korelacije od 0,74 do 0,89. Vizualne karakteristike filmova (transparentnost, izgled i boja) također pokazuju izvrsnu međusobnu ovisnost ($r=0,68-0,89$). Vrijednosti koeficijenata korelacije za svojstvo prihvatljivosti i svih ostalih senzorskih i mehaničkih svojstava upućuju na vrlo dobru povezanost, dok je najveći koeficijent korelacije određen sa svojstvom izgleda ($r=0,99$), što znači da izgled filmova ima najveći utjecaj te je presudan za njihovu prihvatljivost. Osim sa prihvatljivošću izgled filma pokazuje izvrstan stupanj korelacije sa senzorskim i mehaničkim svojstvom elastičnosti ($r=0,87-0,89$).

6. ZAKLJUČCI

1. Najmanja debljina određena je za pektinski (kontrolni), a najveća za kitozanski film (pripremljen u ekstraktu kakaove ljuske).
2. Pripremom obogaćenih filmova (u ekstraktu kakaove ljuske) dolazi do povećanja debljine filmova.
3. Udio vode i suhe tvari jestivih filmova funkcija je vrste biopolimernog materijala, a ne pripreme u vodi ili ekstraktu kakaove ljuske.
4. Zbog izražene topljivosti u vodi alginatni i pektinski filmovi ne pokazuju dobra barijerna svojstva za zaštitu od vode i vodene pare.
5. Najbolja mehanička (vlačna čvrstoća, rad i naprezanje) i senzorska svojstva (izgled, boja, transparentnost i prihvatljivost) određena su za kontrolni alginatni film.
6. Najlošija mehanička svojstva (vlačna čvrstoća, elastičnost, deformacija) određena su za kitozanski film pripremljen u ekstraktu kakaove ljuske.
7. Pripremom u ekstraktu kakaove ljuske postignuto je značajno povećanje (obogaćenje) polifenolnih spojeva jestivih filmova, u odnosu na kontrolne filmove.
8. Uzimajući u obzir debljinu, mehanička i senzorska svojstva boljima su se pokazali kontrolni filmovi, no, filmovi pripremljeni u ekstraktu kakaove ljuske imali su značajno bolja bioaktivna svojstva (udjel polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet).

7. LITERATURA

Arvanitoyannis, I. S., Nakayama, A., Aiba, S. (1998) Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate polymers* **37**, 371-382.

Ayala-Zavala, J. F., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Leyva, J. M., Ortega-Ramírez, L. A., Carrasco-Lugo, D. K., Pérez-Carlón, J. J., Melgarejo-Flores, B. G., González-Aguilar, G. A., Miranda M. R. A. (2013) Pectin-Cinnamon Leaf Oil Coatings Add Antioxidant and Antibacterial Properties to Fresh-Cut Peach. *Flavour and Fragrance Journal* **28**, 39-45.

Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J. E. (2012) Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect on the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering* **110**, 232-239.

Blanco-Fernandez, B., Rial-Hermida, M. I., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2013) Edible Chitosan/Acetylated Monoglyceride Films for Prolonged Release of Vitamin E and Antioxidant Activity. *Journal of Applied Polymer Science* **129**, 626-635.

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

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

Brown, A. C., Wang, B., Oh, J. H. (2008) Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *Journal of Food Protection* **71**

Dhanapal, A., Sasikala, P., Lavanya Rajamani, Kavitha, V., Yazhini, G., Shakila Banu, M. (2012) Edible films from Polysaccharides. *Food Science and Quality Management* **3**, 9-18.

Eça, K. S., Sartori, T., Menegalli, F. C. (2014) Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology* **17**, 98-112.

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

Galus, S., Lenart, A. (2013) Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering* **115**, 459-465.

Hacışevki, A. (2009) An overview of ascorbic acid biochemistry. *J. Fac. Pharm, Ankara* **38**, 233-255.

Hasegawa, M., Isogai, A., Kuga, S., Onabe, F. (1994) Preparation of cellulose-chitosan blend film using chloral/dimethylformamide. *Polymer* **35**, 983-987.

Kang, H. J., Jo, C., Kwon, J. H., Kim, J. H., Chung, H. J., Byun, M. W. (2007) Effect of a pectin-based edible coating containing green tea powder on the quality of irradiated pork patty. *Food control* **18**, 430-435.

Kim, K. M., Son, Sung-Koo, Weller, C. L., Hanna, M. (2006) Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *Journal of Food Science E: Food Engineering and Physical Properties* **71**, 119-124.

Koushki, M. R., Azizi, M. H., Azizkhani M., Koohy-Kamaly, P. (2015) Effect of Different Formulations on Mechanical and Physical Properties of Calcium Alginate Edible Films. *Journal of Food Quality and Hazards Control* **2**, 45-50.

Mayachiew, P., Devahastin, S. (2010) Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chemistry* **118**, 594-601.

Mayachiew, P., Devahastin, S., Mackey, B. M., Niranjana, K. (2010) Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. *Food Research International* **43**, 125-132.

Melgarejo-Flores, B. G., Ortega-Ramírez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., González-Aguilar, G. A., Miranda M. R. A., Ayala-Zavala, J. F. (2013) Antifungal Protection and Antioxidant Enhancement of Table Grapes Treated with Emulsions, Vapors and Coatings of Cinnamon-Leaf Oil. *Postharvest Biology and Technology* **86**, 321-328.

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

Nemet, N. (2009) Jestivi filmovi i omotači u proizvodnji ambalaže, *Tehnologija hrane* [online] **02**, 9-18, <<http://sr.scribd.com>>. Pristupljeno 27. lipnja 2015.

- Norajit, K., Kim, K. M., Ryu, G. H. (2010) Comparative Studies on the Characterization and Antioxidant Properties of Biodegradable Alginate Films Containing Ginseng Extract. *Journal of Food Engineering* **98**, 377-384.
- Olivas, G. I., Barbosa-Canovas, G. V. (2008) Alginate-calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LTW-Food Science and Technology* **41**, 359-366.
- Ozdemir, M., Floros, J. D. (2008) Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering* **84**, 116-123.
- Ozdemir, M., Floros, J.D. (2008) Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering* **86**, 215-224.
- Park, H.J., Chinnan, M.S. (1995) Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Materials. *Journal of Food Engineering* **25**, 497-507.
- Perdones, Á., Vargas M., Atarés, L., Chiralt, A. (2014) Physical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Chitosan-Cinnamon Leaf oil Films as Affected by Oleic Acid. *Food Hydrocolloids* **36**, 256-264.
- Petrović, V., Milković, M., Valdec, D. (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solventnim i UV bojilima. *Tehnički glasnik* **7**, 191-197.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M., Rakshit, S. K. (2005) Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International* **38**, 267-272.
- Priecina, L., Karklina, D. (2014) Natural Antioxidant Changes in Fresh and Dried Spices and Vegetables. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **8**, 494-498.
- Quiroz-Reyes, C.N., Aguilar-Méndez, M.A., Ramírez-Ortíz, M.E., Ronquillo-De Jesús, E. (2013) Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **12**, 11-18.

- Ramos Ó. L., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2012) Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International* **45**, 351-361.
- Rangel-Marrón, M., Montalvo-Paquini, C., Paloue, E., López-Malo, A. (2013) Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and water vapor permeability of sodium alginate edible films. *Recent Advances in Chemical Engineering, Biochemistry and Computational Chemistry*, 72-78.
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G., Martín-Belloso, O. (2013) Influence of Alginate-Based Edible Coatings as Carrier of Antibrowning Agents on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Kent Mangoes. *LTW- Food Science and Technology* **50**, 240-246.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008) Effect of Natural Antibrowning Agents on Color and Related Enzymes in Fresh-Cut Fuji Apples as an Alternative to the Use of Ascorbic Acid. *Journal of Food Science* **73**, 267-272.
- Siripatrawan, U., Harte, Bruce R. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* **24**, 770-775.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J. M. (2010) *Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings*, Nova Science Publishers Inc, New York.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Tharanathan, R. N. (2007) Effects of plasticizers and fatty acid on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids* **21**, 1113-1122.
- Thakhiew, W., Devahastin S., Soponronnarit, S. (2010) Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. *Journal of Food Engineering* **99**, 216-224.
- Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L., Petrovečki, M. (2007) Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochemia Medica* **17**, 1-138.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009) Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids* **23**, 536-547.

Wüstenberg, T. (2015) Cellulose and Cellulose Derivate sin the Food Industry:Fundamentals and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Xiao, C., Zhu, L., Lou, W., Song, X., Deng, Y. (2010) Comdined Action of Pure Oxygen Pretreatment and Chitosan Coating Incorporated with Rosemary Extracts on the Quality of Fresh-Cut Pears. *Food Chemistry* **121**, 1003-1009.

Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., Tang, Y. (2011) Effects of Chitosan Coating Enriched with Cinnamon Oil on Qualitative Properties of Sweet Pepper (*Capiscum annum L.*). *Food Chemistry* **124**, 1443-1450.

Zhang, Q., Liu, L., Ren, L., Wang, F. (1997) Preparation and characterization of collagen-chitosan composites. *J. Appl. Polym. Sci.* **64**, 2127-2130.