

# Potencijal primjene pektina pulpe šećerne repe i različitih proteina u formiranju jestivih filmova

---

Vrtar, Sonja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:048763>

*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 Prehrambena tehnologija**

**Sonja Vrtar**

6914/PT

**POTENCIJAL PRIMJENE PEKTINA PULPE ŠEĆERNE REPE  
I RAZLIČITIH PROTEINA U FORMIRANJU JESTIVIH  
FILMOVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija uživala

**Mentor:** prof.dr.sc. Draženka Komes

**Zagreb, 2019.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno- biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**  
**Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda**  
**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

## **POTENCIJAL PRIMJENE PEKTINA PULPE ŠEĆERNE REPE I RAZLIČITIH PROTEINA U FORMIRANJU JESTIVIH FILMOVA**

**Sonja Vrtar, 0058204781**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost proizvodnje jestivih filmova s pektinom izoliranim iz pulpe šećerne repe u kombinaciji s proteinima piskavice, riže, graška, soje, sirutke i badema. Filmovi su formulirani u ekstraktu žutog čaja kao izvoru bioaktivnih spojeva. Pektin iz pulpe šećerne repe ekstrahiran je hidrolizom s klorovodičnom kiselinom, a proteini iz piskavice izolirani su alkalnom hidrolizom i naknadnom precipitacijom pri izoelektričnoj točki, dok su ostali proteini komercijalni. Primarnim sirovinama (izolirani pektin, proteini) određena su fizikalna svojstva, a formuliranim filmovima ispitana su fizikalno-kemijska, mehanička i senzorska svojstva te bioaktivni sastav (ukupni i pojedinačni polifenolni spojevi, flavan-3-oli) i antioksidacijski kapacitet.

Prema dobivenim rezultatima, čisti pektinski film pokazao je najbolja mehanička i senzorska svojstva, dok je film pripremljen kombinacijom pektina i proteina graška pokazao najlošija senzorska svojstva. Najbolja funkcionalna svojstva (udjel polifenolnih spojeva, antioksidacijski kapacitet) karakteriziraju jestive filmove pripremljene dodatkom proteina riže i badema.

**Ključne riječi:** bioaktivni spojevi, ekstrakt žutog čaja, jestivi filmovi, pektin, piskavica

**Rad sadrži:** 46 stranica, 16 slika, 8 tablica, 70 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Draženka Komes

**Pomoć pri izradi:** Sara Karača, mag. ing. i Monika Ostrman, mag. ing.

**Datum obrane:** 18. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **APPLICATION POTENTIAL OF SUGAR BEET PULP PECTIN AND VARIOUS PROTEINS IN THE FORMATION OF EDIBLE FILMS**

**Sonja Vrtar, 0058204781**

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the possibility of producing edible pectin films isolated from the pulp of sugarcane in use with proteins of fenugreek, rice, peas, soy, whey and almonds. Films are formulated in yellow tea extract as the source of bioactive compounds. Pectin from pulp of sugar beet was extracted by hydrolysis with hydrochloric acid, and proteins from fenugreek were isolated by alkaline hydrolysis and subsequent precipitation at the isoelectric point while other protein were commercially available. Physical properties are determined for the primary raw materials (isolated pectin, proteins) and the formulated films have physico-chemical, mechanical and sensory properties, as well as the bioactive composition (total and individual polyphenolic compounds, flavan-3-ol) and antioxidant capacity.

According to the obtained results, pure pectin film showed the best mechanical and sensory properties while the film which was prepared from pectin and pea protein showed the worst sensory properties. The best functional properties (content of polyphenolic compounds, antioxidant capacity) characterize edible films prepared with the addition of rice and almond protein.

**Keywords:** bioactive compounds, edible films, fenugreek, pectin, yellow tea extract

**Thesis contains:** 46 pages, 16 figures, 8 tables, 70 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Draženka Komes, Full Professor

**Technical support and assistance:** Sara Karača, BSc and Monika Ostrman, BSc

**Defence date:** September 18<sup>th</sup> 2019

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Šećerna repa- izvor pektina.....	2
2.2. Piskavica.....	5
2.3. Žuti čaj.....	6
2.4. Jestivi filmovi.....	7
2.5. Vrste jestivih filmova i materijali za izradu.....	8
2.6. Postupci primjene jestivih filmova.....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
3.1. Materijal.....	11
3.1.1. Kemikalije.....	11
3.1.1.1. Izdvajanje pektina.....	11
3.1.1.2. Karakterizacija pektina.....	11
3.1.1.3. Postupci izolacije proteina iz piskavice.....	12
3.1.1.4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina.....	12
3.1.1.5. Određivanje bioaktivnog sastava filmova.....	12
3.1.1.6. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom HPLC analize.....	13
3.1.2. Pribor i aparatura.....	13
3.1.2.1. Izdvajanje pektina.....	13
3.1.2.2. Karakterizacija pektina.....	14
3.1.2.3. Postupci izdvajanja proteina iz piskavice.....	14
3.1.2.4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina.....	15
3.1.2.5. Određivanje udjela suhe tvari ekstrakta i filmova.....	15
3.1.2.6. Određivanje bioaktivnog sastava filmova.....	15
3.1.2.7. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom HPLC-a.....	15
3.2. Metode rada.....	16
3.2.1. Izdvajanje pektina.....	16
3.2.1.1. Ekstrakcija pektina.....	16
3.2.1.2. Kiselinska hidroliza.....	16
3.2.1.3. Dijaliza.....	16
3.2.1.4. Uparavanje i liofilizacija.....	17

3.2.2. Karakterizacija pektina.....	17
3.2.2.1. Određivanje molarne mase i stupnja esterifikacije pektina.....	17
3.2.2.2. Određivanje udjela galakturonske kiseline.....	18
3.2.3. Postupci izolacije proteina iz piskavice.....	18
3.2.3.1. Odmašćivanje uzorka.....	18
3.2.3.2. Uklanjanje ekstraktibilnih tvari.....	19
3.2.3.3. Izdvajanje proteina pri izoelektričnoj točki.....	19
3.2.4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina.....	19
3.2.4.1. Kapacitet i stabilnost pjenjenja.....	19
3.2.4.2. Električna provodljivost.....	20
3.2.4.3. Kapacitet vezanja vode i ulja.....	20
3.2.4.4. Indeks aktivnosti emulzifikacije i indeks razdvajanja emulzija.....	20
3.2.5. Priprema ekstrakta žutog čaja i otapanje pektina i proteina u njemu.....	21
3.2.6. Formuliranje i otapanje filmova.....	21
3.2.7. Karakterizacija filmova.....	22
3.2.7.1. Određivanje udjela suhe tvari filmova i ekstrakta.....	22
3.2.7.2. Određivanje boje filmova.....	22
3.2.7.3. Određivanje debljine filmova.....	23
3.2.8. Određivanje bioaktivnog sastava filmova.....	23
3.2.8.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	23
3.2.8.2. Određivanje udjela flavan-3-ola.....	24
3.2.8.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	24
3.2.8.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	25
3.2.9. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom HPLC-a.....	26
3.2.10. Senzorska analiza.....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1. Karakterizacija pektina.....	28
4.2. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina.....	29
4.3. Vizualni izgled formuliranih filmova.....	33
4.4. Karakterizacija filmova.....	34
4.5. Bioaktivni sastav filmova.....	35
4.6. Senzorska svojstva formuliranih filmova.....	38
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>41</b>

## 1. UVOD

Zbog sve veće informiranosti i interesa samih potrošača dolazi do potrebe za unaprjeđivanjem i razvijanjem prehrambenih funkcionalnih proizvoda. Uz funkcionalne sastojke i reformulacije, jestivi filmovi su noviji trend u segmentu funkcionalne hrane, čija je uloga zaštita hrane i produljenje njezinog roka trajanja, a jedna od glavnih njihovih prednosti je mogućnost konzumacije zajedno s hranom predstavljajući tako zanimljivu alternativu konvencionalnoj ambalaži (plastika, papir...). Kako bi se poboljšala funkcionalna svojstva jestivih filmova, isti se obogaćuju različitim bioaktivnim sastojcima kao što su antioksidansi, vitamini, mineralne tvari, proteini i sl., koji sprječavaju oksidaciju hrane, pružaju antimikrobno djelovanje te imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje.

Uz alginat i kitozan, kao najčešće upotrebljavane nosače u izradi jestivih filmova, vrlo često se koristi i pektin. Pektin se u prehrambenoj industriji koristi kao sredstvo za želiranje i ugušćivanje te kao emulgator i stabilizator. Nadalje, novija istraživanja dokazuju da pektin male molekulske mase, u obliku pektinskih oligosaharida (POS), ima bolji prebiotički potencijal od polimera velike molekulske mase, što ga čini poželjnim materijalom u izradi jestivih filmova. U cilju poboljšanja nutritivne vrijednosti i mehaničkih svojstava jestivih filmova, u njihov sastav sve više se inkorporiraju i proteini, a u novije vrijeme posebice su atraktivni različiti biljni proteini.

Cilj ovog rada je izdvajanje i karakterizacija pektina iz pulpe šećerne repe i proteina iz piskavice te formiranje jestivih funkcionalnih filmova žutog čaja. Uz pektin kao nosač, osim proteina piskavice, filmovi će biti obogaćeni proteinima riže, graška, soje, sirutke i badema. Pripremljenim filmovima odredit će se fizikalno-kemijska (udio suhe tvari, debljina, boja) i mehanička (vlačna čvrstoća i elastičnost) svojstva, bioaktivni sastav (udio polifenola i flavan-3-ola te antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodama) te senzorska svojstva. Također, u formuliranim filmovima odredit će se udio pojedinačnih bioaktivnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Šećerna repa – izvor pektina

Danas se iz šećerne repe *Beta vulgaris* L. (Slika 1.) kao osnovne sirovine za proizvodnju šećera u umjerenom pojasu, dobiva oko 1/3 šećera proizvedenog u svijetu.



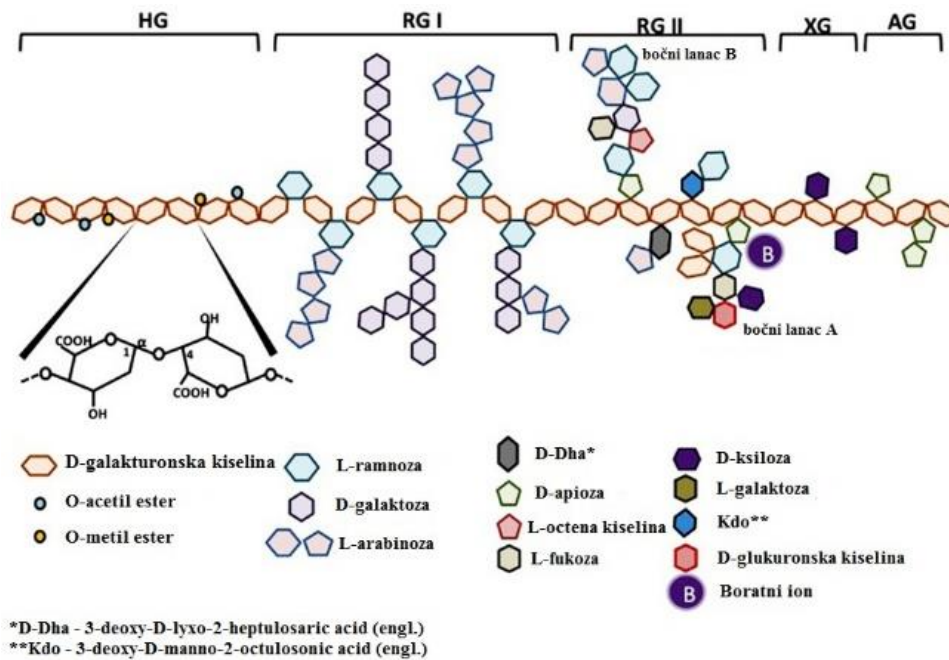
**Slika 1.** Šećerna repa *Beta vulgaris* L. (Anonymous 1)

U korijenu šećerne repe nalaze se šećer (~17 % suhe tvari) i druge nesaharozne tvari, čiji udio i međusobni odnosi ovise o različitim vanjskim čimbenicima, kao što su sastav tla, gnojidba, vremenski uvjeti i sl. Šećerna industrija proizvodi velike količine različitog otpada i nusproizvoda poput pulpe šećerne repe, lišća i melase koji se mogu koristiti kao vrijedne sirovine u drugim industrijama za proizvodnju proteina, organskih kiselina, enzima, prebiotičkih oligosaharida i drugih proizvoda (Zicari i sur., 2019).

Pulpa šećerne repe zaostaje nakon ekstrakcije šećera iz repinih rezanaca i obično se koristi kao stočna hrana, ali se može koristiti i za proizvodnju pektina, etanola, metanola, proteina i biogoriva.

Udio pektina u suhoj tvari šećerne repe iznosi 25 %. Pektin (Slika 2.) je heteropolisaharid u kojem su lanci D-galakturonske kiseline prekinuti umetanjem L-ramnopiranozilnih ostataka povezanih (1→2) glikozidnom vezom. Ti ostaci mogu biti supstituirani s bočnim lancima koji se sastoje od neutralnih šećera kao što su D-galaktoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-glukoza, D-manoza, L-fukoza i D-glukuronska kiselina. Pektinski kompleks tvore kovalentno povezani homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan-I (RG-I) i ramnogalakturonan-II (RG-II), a u manjem udjelu mogu biti supstituirani ksilogalakturonan (XG) i apiogalakturonan (AG) (Atmodjo i sur., 2013).





**Slika 2.** Struktura pektina (Leclere i sur., 2013)

Većina pektina prisutnog u pulpi šećerne repe je visokoesterificirana jer ima više od 50 % metiliranih ostataka (Rejaji i Salehi, 2016) te stoga tvori loše gelove kod niskog pH. Kako bi se dobio niskoesterificirani pektin provode se različiti postupci demetilacije visokoesterificiranog. U istraživanju Harel i suradnika (1998) predložena je demetilacija pektina šećerne repe pomoću amonijaka koji je davao gelove dovoljne mehaničke čvrstoće i netopivosti.

Kako bi se izolirao pektin iz šećerne repe potrebno je provesti ekstrakciju pri čemu se mogu koristiti razrijeđene otopine soli, kelirajući agensi (EDTA ili CDTA), lužine te vruće razrijeđene kiseline. Danas se najčešće provodi kiselinska ekstrakcija klorovodičnom ili sumpornom kiselinom, no, također sve se više ispituje mogućnost primjene ultrazvučne ekstrakcije (UAE) i ekstrakcije pomoću enzima (npr. galakturonaze), kao i subkritičnom vodom (Chen i sur.,2015). Kiselinska ekstrakcija općenito rezultira degradacijom arabinoznih bočnih lanaca i gubitkom ferulinskih skupina koji su ključni čimbenici u umrežavanju pektina (Rejaji i Salehi, 2016). U usporedbi s klasičnim metodama ekstrakcije, primjena ultrazvuka u ekstrakciji povećava prinos pektina i znatno skraćuje vrijeme ekstrakcije.

U Tablici 1. prikazan je popis znanstvenih istraživanja na temu izdvajanja pektina iz pulpe šećerne repe.

**Tablica 1.** Pregled znanstvenih istraživanja izdvajanja pektina iz pulpe šećerne repe

Tehnika ekstrakcije	Otapala	Svrha ekstrakcije	Referenca
Kiselinska ekstrakcija, 80 °C, 4h i neutralizacija do pH=4,5	Razrijeđena dušična kiselina i otopina natrijevog hidroksida	Karakterizacija i procjena prebiotičke aktivnosti pektina	Prandi i sur., 2018
Ekstrakcija 30 min, 85 °C, pH=1,8 i naknadna precipitacija	Voda, izopropanol	Procjena prebiotičkih svojstava <i>in vitro</i> fermentacijskim testovima s humanim fekalnim kulturama	Gomez i sur., 2016
Ekstrakcija otapalima i tretiranje pektinazom i tripsinom	Blago alkalna voda pH=7-7,5, EDTA	Kemijska analiza i određivanje antiproliferativne aktivnosti pektina na MCF-7 staničnoj liniji raka dojke	Concha i sur., 2013
Kiselinska ekstrakcija	Limunska kiselina	Ispitivanje emulzificirajućih svojstava	Li i sur., 2015
Kiselinska ekstrakcija, 80 °C, 1 ili 2 h, pH=1,5 ili 2,0	Limunska, jabučna i mliječna kiselina	Određivanje prinosa, čistoće, biokemijskih karakteristika i emulgirajućih svojstava	Ma i sur., 2013
Kiselinska ekstrakcija, pH=1,2, 90 °C, 3h uz naknadno pročišćavanje kroz precipitaciju alkoholom	Klorovodična kiselina, etanol	Ispitivanje reoloških i emulzificirajućih svojstava pri 4 različite metode sušenja	Huang i sur., 2017
Kiselinska ekstrakcija, pH=1,5, 80 °C, 1h	6 M otopina klorovodične kiseline	Ispitati utjecaj načina taloženja s etanolom na strukturne značajke pektina	Guo i sur., 2016
Kiselinska ekstrakcija, pH=1,5, 80 °C, 1h	Klorovodična kiselina	Karakterizacija i proizvodnja POS-a enzimskom hidrolizom	Combo i sur., 2013

Dokazano je da pektin usporava apsorpciju glukoze u serumu pretilih bolesnika i oboljelih od dijabetesa (Trumbo i sur., 2002), a kao topljivo prehrambeno vlakno, između ostalog, prevenira i pretilost, dijabetes i bolesti kardiovaskularnog sustava te daje osjećaj sitosti. Istraživanje Rastall i suradnika (2005) pokazalo je da pektini imaju prebiotička svojstva jer selektivno povećavaju populaciju korisnih bakterija kao što su bifidobakterije i lactobacilli, a smanjuju broj neželjenih bakterija, primjerice klostridija.

Pektin ima veliku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i brojnim drugim industrijama zbog dobrih emulgirajućih svojstava. Njegova važnost u prehrambenoj industriji temelji se na sposobnosti stvaranja gela u prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iona ili otopljene tvari pri niskom pH (Thakur i sur., 1997). Zbog slabih gelirajućih svojstava pektin iz pulpe šećerne repe se u prehrambenoj industriji prvenstveno koristi kao emulgator, a ne kao stabilizator ili sredstvo za geliranje jer je dokazano da učinkovito stabilizira emulziju adsorpcijom na površini kapljice ulja. U prehrambenoj industriji pektin se koristi u proizvodnji džemova, želea i smrznute hrane, a u farmaceutskoj industriji za sniženje razine kolesterola u krvi i kod gastrointestinalnih poremećaja. Pektin se koristi i u druge svrhe kao što je proizvodnja jestivih filmova, u pjenama i plastifikatorima.

Pektin iz šećerne repe razlikuje se od pektina iz jabuke, citrusa ili suncokreta po visokom sadržaju ramnoze, proteina, prisutnosti acetilnih skupina povezanih s  $\alpha$ -D-galakturonskom kiselinom i prisutnošću ferulinske kiseline u udjelu 0,5-1,0 % (Concha i sur., 2013), jedne od glavnih fenolnih kiselina stanične stijenke biljne stanice. Pektin šećerne repe ima slabija gelirajuća svojstva od pektina citrusa, ali ima odlična emulgirajuća svojstva zbog veće količine proteina.

## 2. 2. Piskavica

Piskavica (Slika 3.) je jedna od najstarijih ljekovitih biljaka podrijetlom iz središnje Azije, a pripada porodici *Fabaceae*. Uzgaja se u Egiptu, Kini, Turskoj, Kanadi, Australiji, sjevernoj i južnoj Africi, južnoj Europi i Indiji koja je najveći proizvođač, potrošač i izvoznik piskavice u svijetu. Piskavici pogoduje tropsko i umjereno područje bez ekstremnih zimskih temperatura. Samo ime potječe od latinske riječi „*Trigonella*“ što u prijevodu znači „mali trokut“ (Flammang i sur., 2004). Sjemenke piskavice su sitne, tvrde, glatke i žute do smeđe boje.

Sjemenke piskavice sadrže značajan udjel vlakana, koja djeluju kao prebiotik, fosfolipida, glikolipida, oleinsku, linolensku i linoleinsku kiselinu (Suliman i sur., 2000; Chatterjee i sur., 2010), kolin, vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, nikotinsku kiselinu, niacin i mnoge druge funkcionalne

komponente. Endosperm piskavice posebno je bogat proteinima (43,8 g/100 g) (Naidu i sur., 2011). Također, piskavica sadrži 6-7 % masti i 58 % ugljikohidrata od kojih je oko 25 % prehrambenih vlakana (US Department of Agriculture, 2012), a dobar je i izvor sumpora, magnezija, kalcija, željeza i fosfora (Kakani i Anwer, 2012).

Zbog visokog udjela vlakana, proteina i gume piskavica se može koristiti kao stabilizator ili emulgator u raznim prehrambenim proizvodima. Sjemenke piskavice uglavnom se koriste za pripremu biljnih infuzija ili kao začini. Proteini piskavice mogu se koristiti u proizvodnji pekarskih proizvoda jer sadrže više lizina, a manje histidina i metionina od proteina žitarica. Sjemenke piskavice imaju antibakterijska, antitumorska i antidijabetska svojstva te snižuju razinu kolesterola (Žuk-Gołaszewska i Wierzbowska, 2017). Istraživanje Amin i suradnika (2005) pokazalo je da ekstrakt piskavice učinkovito sprječava i inhibira napredovanje raka dojke.



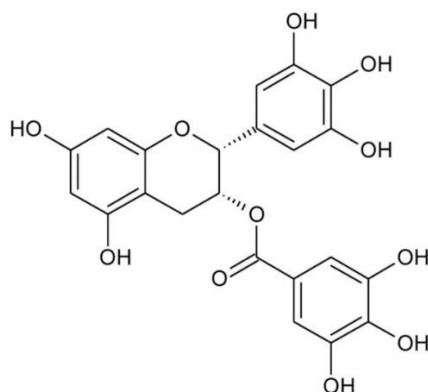
**Slika 3.** Piskavica (*Trigonella foenum graecum* L.) i njezine sjemenke (Anonymous 2)

### 2. 3. Žuti čaj

Žuti čaj dobiva se iz listova biljke čaj *Camellia sinensis*. Beru se mladi listovi, što bliže lisnom pupoljku, kako bi udio antioksidansa bio što viši. Žuti čaj je relativno nova vrsta čaja koja se pojavila i na europskom tržištu, a čiji postupak proizvodnje uključuje mekšanje, zagrijavanje, umatanje u papir (do 7 dana), sušenje na temperaturi 79- 90 °C 20-tak minuta te prosijavanje (Xu i sur., 2018).

Najpoznatiji antioksidansi u čaju su polifenoli, posebice katehini iz grupe flavan-3-ola, među kojima je najzastupljeniji epigalokatehin galat (Slika 4.), dok su katehin i galokatehin zastupljeni u manjem udjelu (Mihelj i sur., 2014). Također, žuti čaj sadrži 10 puta više galne kiseline od zelenog čaja (Kujawska i sur., 2016). Iz skupine purinskih alkaloida, metilksantina,

u žutom čaju zastupljeni su kafein i tragovi teobromina. Od aminokiselina u žutom čaju najzastupljenije su teanin, glutaminska kiselina i glicin koje daju svježiji okus čaja (Liu, 2011). Žuti čaj sadrži vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i C.



**Slika 4.** Strukturna formula epigalokatehin galata koji je najzastupljeniji među fenolnim spojevima u žutom čaju (Dettlaff i sur., 2017)

Bioaktivni spojevi lišća *Camellie sinensis* poznati su po svojim antikancerogenim, protuupalnim, antidijabetskim, baktericidnim i bakteriostatskim svojstvima (Gramza-Michalowska i sur., 2015). Također utječu na boju, aromu i okus čaja (Dias i sur., 2013). Znanstvena istraživanja (Zhao, 2009; Zhao i sur., 2008) pokazala su da žuti čaj inhibira rast stanica raka debelog crijeva. Zbog dokazanih protuupalnih svojstava (Wang i sur., 2013), žuti čaj može značajno smanjiti tegobe probavnog sustava, a učinkovit je i u prevenciji ateroskleroze. U istraživanju Han i suradnika (2016) dokazano je da žuti čaj (1:30, w/v) tijekom 36 dana snizuje razinu glukoze u krvi. U posljednje vrijeme žuti čaj se sve više preporučuje tijekom različitih dijeta jer je dokazano da regulira tjelesnu masu (Teng i sur., 2018).

#### 2.4. Jestivi filmovi

Jestivi filmovi definiraju se kao tanki sloj materijala koji prekriva površinu proizvoda i pruža barijeru prolasku vlage, kisika ili nekih otapala u hranu (Bourtoom, 2008). Oni štite hranu od mehaničkog oštećenja tijekom transporta te pružaju zaštitu od oksidacije, mikrobnog rasta i drugih kemijskih reakcija, a isto tako mogu poboljšati vizualni izgled prehrambenih proizvoda. Također, jestivi filmovi i premazi su biorazgradivi što znači da se mogu potpuno degradirati mikroorganizmima u procesu kompostiranja do ugljičnog dioksida, vode, metana i nekih ostataka biomase (Reddy i sur., 2013).

## 2.5. Vrste jestivih filmova i materijali za izradu

Jestivi filmovi se mogu svrstati u 3 kategorije ovisno o materijalu od kojeg su proizvedeni, a to mogu biti hidrokoloidi koji uključuju proteine i polisaharide (biopolimeri), lipidi i kompoziti (mješavina biopolimera i lipida). Od biopolimera koriste se proteini biljnog ili životinjskog podrijetla kao što su proteini soje, suncokreta, sirutke, kazein ili keratin te polisaharidi poput škrobova, alginata, pektina, karagenana i derivata celuloze. Od jestivih lipida može se koristiti pčelinji vosak, trigliceridi (npr. frakcije mliječnih masti), acetilirani monogliceridi, slobodne masne kiseline i esteri saharoze. Da bi se poboljšala funkcionalna svojstva filmova u njih se mogu dodavati plastifikatori poput glicerola, polietilen glikola, masnih kiselina i monoglicerida. Isto tako mogu se dodavati sredstva za umrežavanje i poboljšanje mehaničkih svojstava, emulgatori i tvari koje poboljšavaju kvalitetu, stabilnost i sigurnost hrane, kao što su antioksidansi ili antimikrobni spojevi. U Tablici 2. prikazani su neki primjeri funkcionalnih jestivih filmova.

**Tablica 2.** Primjeri funkcionalnih jestivih filmova

Materijal	Ekstrakt	Primjena/Uloga	Referenca
Kitozan	Zeleni čaj	Sprječava oksidaciju prehrambenih proizvoda	Siripatrawan i Harte, 2010
Proteini sirutke	Ružmarin i timijan	Antimikrobna zaštita prehrambenih proizvoda od <i>L. monocytogenes</i> i <i>S. aureus</i>	Andrade i sur., 2018
Želatina	Maslinovo ulje	Višestruka primjena	Ma i sur., 2012
Proteini ječma i želatina	Sjemenke grejpa	Pakiranje lososa	Song i sur., 2012
Kitozan	Spirulina	Funkcionalna ambalaža hrane zbog odličnih antioksidacijskih i antibakterijskih svojstava	Balti i sur., 2017
Kitozan, karvakrol iz ulja origana	Košnice grožđa	Očuvanje hrane i produljenje roka trajanja	Rubilar i sur., 2013
Proteini kokosovog mlijeka	Kokosova voda	Pakiranje prehrambenih proizvoda u UV barijeri zbog tamnosmeđe boje filmova	Rodsamran i Sothornvit, 2018

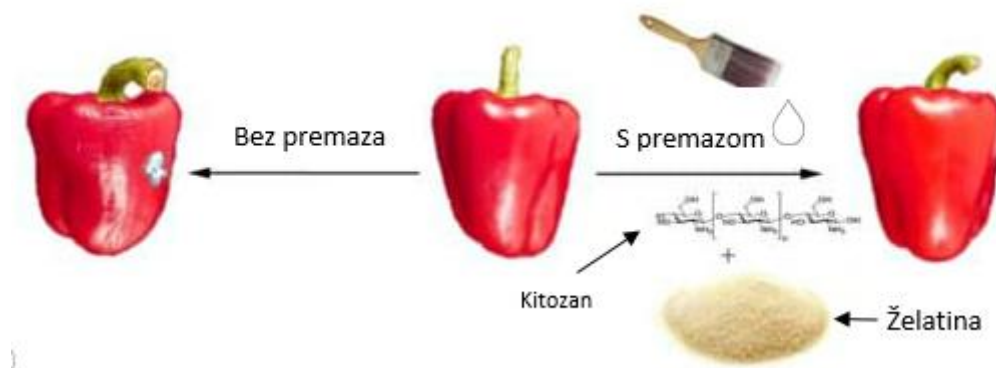
## 2.6. Postupci primjene jestivih filmova

Uranjanje se koristi kada je potrebno filmom obložiti cijeli proizvod. Taj postupak najpogodniji je za brzo pokvarljive namirnice kao što je bobičasto voće (Slika 5.) koje se uranja u pripremljenu otopinu na nekoliko sekundi. Nedostatak ovog postupka je nakupljanje smeća ili prljavštine te rast mikroorganizama u spremniku za uranjanje.



**Slika 5.** Uranjanje jagode u otopinu kitozana i lizozima (Ketchum, 2004)

Premazivanje se najčešće koristi za produljenje trajnosti svježeg i minimalno procesiranog voća i povrća. Istraživanje Poverenov i suradnika (2014) pokazalo je da kombinacija kitozana i želatine poboljšava strukturu paprike, inhibira propadanje i produljuje trajnost. Koristeći takvu prevlaku produljeno je razdoblje skladištenja paprike na 3 tjedna pri 7 °C te do 14 dana na 20 °C bez gubitka kvalitete namirnice (Slika 6.).



**Slika 6.** Jestivi premaz produljuje trajnost crvene paprike (Poverenov i sur., 2014)

Prskanje se vrlo često koristi za filmove na bazi lipida, a učinkovitost ove metode ovisi o tlaku raspršivanja te o temperaturi, viskoznosti i površinskoj napetosti tekućine za oblaganje. Bitan čimbenik ovog postupka je oblik i dizajn mlaznice za raspršivanje koji utječe na brzinu raspršivanja, veličinu kapljica, udaljenost i kut raspršivanja.

Lijevanje otopine jestivog filma pogodna je metoda za filmove na bazi proteina. Za ovaj postupak bitna su površinska svojstva supstrata na kojima nastaju filmovi, kao i metoda i vrijeme sušenja. Nastali film može se sušiti u okolišnim uvjetima, vrućim zrakom, infracrvenim zračenjem ili mikrovalovima, a odabrana metoda sušenja utječe na fizikalna i mehanička svojstva konačnog filma.

Ekstruzija je alternativna metoda lijevanju otopine jestivog filma primjenom visoke temperature i smicanja kako bi se omekšao i rastopio polimer. Prednosti ekstruzije u odnosu na lijevanje su te da je to brža metoda koja zahtjeva manje energije s obzirom na činjenicu da se u ekstruder mogu unijeti više koncentrirane filmske otopine (Dangaran i sur., 2009).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijal

U ovom radu, kao izvor pektina za ekstrakciju, korištena je pulpa šećerne repe (*Beta vulgaris* L.), dok su proteini izolirani iz piskavice (*Trigonella foenum graecum* L.). Proteini riže (*Oryza sativa* L.), graška (*Pisum sativum* L.), soje (*Glycine max* L.), sirutke i badema (*Prunus dulcis* L.) bili su komercijalni, kupljeni u specijaliziranoj trgovini zdrave hrane, kao i piskavica, dok je pulpa šećerne repe donirana iz Tvornice šećera Osijek. Kao baza za formuliranje bioaktivnih jestivih filmova korišten je ekstrakt žutog čaja (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Formulacije funkcionalnih jestivih filmova žutog čaja

Uzorak	Izolirani pektin (%)	Protein (%)
F1	100	-
F2	50	proteini piskavice 50
F3	50	proteini riže 50
F4	50	proteini graška 50
F5	50	proteini soje 50
F6	50	proteini sirutke 50
F7	50	proteini badema 50

#### 3.1.1. Kemikalije

##### 3. 1. 1. 1. Izdvajanje pektina

- 1) Aceton, Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 96%-tni etanol, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- 3) Otopina klorovodične kiseline (pH 1,53), Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

##### 3. 1. 1. 2. Karakterizacija pektina

###### Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina

- 1) 96%-tni etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 2) 0,1 M otopina natrijevog hidroksida (Kefo d.o.o, Ljubljana, Slovenija)
- 3) Kruti natrijev klorid (Sigma Aldrich, SAD)
- 4) 0,25 M otopina klorovodične kiseline (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)

### Određivanje udjela galakturonske kiseline

- 1) Koncentrirana sumporna kiselina, (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 2) 4 M otopina sulfaminske kiseline i kalijevog sulfamata
- 3) 75 mM otopina natrijevog tetraborata
- 4) m-hidroksidifenilna otopina
- 5) 0,5%-tna otopina NaOH, (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 6) Standardi D-galakturonske kiseline (Sigma Aldrich, SAD)

### 3. 1. 1. 3. Postupci izdvajanja proteina iz piskavice

- 1) n-heksan (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- 2) 70%-tni etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 3) Aceton (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 4) 1 M otopina klorovodične kiseline, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 5) 1 M otopina natrijevog hidroksida, (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

### 3. 1. 1. 4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina

#### Indeks aktivnosti emulzifikacije i indeks razdvajanja emulzija

- 1) 0,1%-tna otopina SDS-a

### 3. 1. 1. 5. Određivanje bioaktivnog sastava filmova

#### Određivanje udjela ukupnih fenola

- 1) Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2) Otopina natrijevog karbonata (20%), (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 3) Standardi galne kiseline (Sigma Aldrich, SAD)

#### Određivanje udjela flavan-3-ola

- 1) Vanilin (Acros organics, SAD)
- 2) Metanol, (J.T.Baker, Pennsylvania, SAD)
- 3) Koncentrirana klorovodična kiselina (Carlo Erba, Francuska)

#### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- 1) Metanol, (J.T.Baker, Pennsylvania, SAD)
- 2) Otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (Fluka, SAD)
- 3) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Fluka, SAD)

### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 1) 96%-tni etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 2) Otopina kalijevog peroksodisulfata ( $K_2S_2O_8$ )
- 3) Otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS) (Sigma Algrich, SAD)
- 4) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), (Fluka, SAD)

### 3. 1. 1. 6. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom HPLC analize

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

- 1) Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Zagreb, Hrvatska)
- 2) Mravlja kiselina, Carlo Erba (Val de Reuil, Francuska)
- 3) Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)

### 3. 1. 2 Pribor i aparatura

#### 3. 1. 2. 1. Izdvajanje pektina

##### Ekstrakcija pektina

- 1) Aparatura za filtraciju (lijevak, filter papir Whatman No.1, Erlenmeyerova tikvica)
- 2) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)
- 3) Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo selo, Hrvatska)
- 4) Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce, staklene čaše, staklene menzure, magnetići, kapaljke, laboratorijska žlica, odmjerna tikvica
- 5) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 6) Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- 7) Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvija)

##### Kiselinska hidroliza

- 1) Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo selo, Hrvatska)
- 2) Laboratorijsko posuđe: odmjerne tikvice, staklene boce, Falcon epruvete
- 3) Aparatura za filtraciju (lijevak, filter papir Whatman No.1, Erlenmeyerova tikvica)

##### Dijaliza

- 1) Laboratorijsko posuđe: plastične čaša, staklene čaše, staklena menzura, magnetići
- 2) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 3) Membrana za dijalizu, Cellu Sep, nominal MWCO 6000-8000 Da; 7,96 mL/cm (Membrane Filtration Products, Inc.; Teksas, SAD)
- 4) Prijenosni konduktometar Cond 330i, WTW (Bavaria, Njemačka)

### Uparavanje i liofilizacija

- 1) Laboratorijsko posuđe: tikvice za uparavanje, kapaljke, staklene i plastične Petrijeve zdjelice
- 2) Liofilizator, FreeZone 1, Labconco (Kansas City, MO, SAD)
- 3) Rotacijski vakuum uparivač, Heidolph (Njemačka)

### 3. 1. 2. 2. Karakterizacija pektina

#### Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina

- 1) Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- 2) Laboratorijsko posuđe: staklene čaše, staklena pipeta, staklena bireta, staklene menzure, magnetić
- 3) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 4) pH – metar s elektrodom, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)

#### Određivanje udjela galakturonske kiseline

- 1) Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete, odmjerne tikvice, staklena pipeta, automatske mikropipet, stakleni štapić, Falcon epruveta
- 2) Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- 3) Spektrofotometar, Genesys 10s UV-Vis, Thermo scientific (SAD)
- 4) Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvija)
- 5) Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo selo, Hrvatska)
- 6) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)

### 3. 1. 2. 3. Postupci izolacije proteina iz piskavice

#### Odmaščivanje uzorka

- 1) Laboratorijsko posuđe: staklene čaše, Falcon epruvete, Petrijeve zdjelice, magnetić
- 2) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 3) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)

#### Uklanjanje ekstraktibilnih tvari

- 1) Laboratorijsko posuđe: staklene čaše, Falcon epruvete
- 2) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 3) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)

#### Izdvajanje proteina pri izoelektričnoj točki

- 1) pH – metar s elektrodom, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- 2) Laboratorijsko posuđe: staklena čaša, Falcon epruvete
- 3) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 4) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)

### 3. 1. 2. 4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina

#### Kapacitet i stabilnost pjenjenja

- 1) Staklena čaša
- 2) Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- 3) Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- 4) Ultraturax, IKA-T18 basic (Njemačka)

#### Električna provodljivost

- 1) Konduktometar Cond-330 i, WTW (Njemačka)

#### Kapacitet vezanja vode i ulja

- 1) Plastične epruvete
- 2) Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)
- 3) Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- 4) Laboratorijska centrifuga SL8 R, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)

#### Indeks aktivnosti emulzifikacije i indeks razdvajanja emulzija

- 1) Laboratorijsko posuđe: Falcon epruvete, staklene epruvete, staklene pipete
- 2) Ultraturax, Biosan (Riga, Latvia)

### 3. 1. 2. 5. Određivanje udjela suhe tvari filmova i ekstrakta

- 1) Laboratorijsko posuđe: staklena čaša, aluminijske posude, staklene pipete, pinceta, špatula
- 2) Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- 3) Sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)

### 3. 1. 2. 6. Određivanje bioaktivnog sastava filmova (ukupnih fenola, udjela flavan-3-ola, DPPH i ABTS metoda)

- 1) Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete, mikropipeta, pipete, kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Spektrofotometar, Genesys 10s UV-Vis, Thermo scientific (SAD)

### 3. 1. 2. 7. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom HPLC-a

- 1) Laboratorijsko posuđe: čaše, odmjerne tikvice, pipete i kivete volumena, lijevci, epruvete, štapići za miješanje, automatske mikropipete
- 2) Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (CA-45/25), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
- 3) HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

- 4) HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- 5) HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 x 4,6 mm, 5µm), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

### 3. 2. Metode rada

#### 3. 2. 1. Izdvajanje pektina

##### 3. 2. 1. 1. Ekstrakcija pektina

Ekstrakcija pektina provodi se 70 %-tnim etanolom. U laboratorijskoj boci od 1000 mL pomiješa se 50 g uzorka s 500 mL pripremljenog otapala. Ekstrakcija se provodi na sobnoj temperaturi miješanjem na magnetskoj miješalici 30 min. Nakon završene ekstrakcije, smjesa se filtrira, a zaostali talog se kvantitativno prenese u laboratorijsku bocu te se postupak ekstrakcije ponavlja još dva puta. Nakon treće ekstrakcije, ekstrahirani kolač suši se izmjenom otapala tako da se talog dva puta ispere s 350 mL 96 %-tnog etanola te zatim s 200 mL acetona, a između svakog ispiranja uzorak se odvaja filtracijom. Nakon ispiranja uzorka acetonom, talog se prebaci u plastičnu posudu, prekrije staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Suhi uzorak homogenizira se u tarioniku.

##### 3. 2. 1. 2. Kiselinska hidroliza

Za kiselinsku hidrolizu koristi se razrijeđena klorovodična kiselina (pH 1,5). U staklenu bocu odvaje se 20 g ekstrahiranog uzorka i doda 500 mL pripremljene otopine klorovodične kiseline. Boca se začepi. Hidroliza se provodi u vodenoj kupelji na 90 °C kroz 2 h uz miješanje svakih 15 minuta. Po završetku hidrolize, boca se ohladi u hladnoj kupelji uz blago odvijeni čep da se spriječi pojava vakuuma unutar boce. Slijedi centrifugiranje (10 min, 8000 rpm). Dobiveni pektinski ekstrakti skupljaju se u menzuri gdje se izmjeri volumen te se polako uz miješanje dodaje 4 puta veći volumen 96 %-tnog etanola. Smjesa se ostavi stajati u hladnjaku na 4 °C tijekom noći da se inducira maksimalna precipitacija pektina. Dobiveni precipitati kvantitativno se filtriraju. Kako bi se uklonilo što više smjese etanola i vode te olakšalo izdvajanje precipitata, pred kraj filtracije provodi se centrifugiranje (10 min, 8000 rpm). Dobiveni talog pektinskih precipitata otopi se u 60 mL vode i stavlja se na dijalizu.

##### 3. 2. 1. 3. Dijaliza

Dijaliza precipitata provodi se kako bi se uklonile primjese male molekulske mase ili zaostali etanol. Za dijalizu uzorka koristi se tubularna dijalizacijska membrana čija se duljina određuje

s obzirom na dimenzije iste (7,96 mL/cm) te ukupni volumen koji se treba dijalizirati, a treba se uračunati i prostor za zatvaranje membrane s donje i gornje strane te prostor za dodatni ulazak vode u membranu tijekom dijalize. Na jednom kraju membrane zaveže se čvrsti čvor kako uzorak ne bi iscurio te se preko lijevka uzorak kvantitativno prenese u membranu do jedne trećine uz vrlo malo dodane vode. Na 1 cm od kraja, membrana se zatvori plastičnom kopčom i homogenizira. Membrane s uzorkom stavljaju se cijelim volumenom u plastičnu laboratorijsku čašu od 5 L ispunjenu destiliranom vodom kojoj se prethodno izmjeri provodljivost pomoću konduktometra. Dijaliza se provodi uz miješanje na magnetskoj mješalici (150 rpm). Svakih 2 h mjeri se provodljivost izvanmembranske tekućine kako bi se dijaliza provodila odgovarajućom brzinom, odnosno kako bi se kontinuirano uspostavljao koncentracijski gradijent otopljenih tvari kao pogonske sile dijalize. Dijaliza traje od 24 do 48 h.

#### 3. 2. 1. 4. Uparavanje i liofilizacija

Nakon dijalize slijedi uparavanje kako bi se uklonilo što više vode u kojoj je otopljen pektin. Otopina pektina kvantitativno se prebaci u tikvicu sa okruglim dnom od 1000 mL i uparava se na rotacijskom vakuum uparivaču 2 h pri tlaku 200 mbara i temperaturi 65 °C. Upareni pektin (volumena 100 mL) izlije se u Petrijeve zdjelice, prekrije poklopcem s izbušenim rupicama i pričvrsti parafilmom te se stavlja u laboratorijski zamrzivač na -80 °C tijekom noći. Nakon smrzavanja slijedi liofilizacija (36 h) te usinjavanje liofiliziranog uzorka u mlincu.

#### 3. 2. 2. Karakterizacija pektina

##### 3. 2. 2. 1. Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina

U staklenu čašu od 250 mL izvaže se 0,5 g pektina, doda 5 mL 96 %-tnog etanola, 1 g natrijevog klorida i 100 mL destilirane vode. Smjesa se miješa na magnetskoj mješalici do potpunog otapanja pektina. Zatim se titrira do pH=7,5 sa 0,1 M otopinom NaOH te se očita volumen (a u mL) 0,1 M otopine NaOH koji je potrošen za navedenu titraciju. Ekvivalentna masa (EW/g mol<sup>-1</sup>) računa se prema izrazu (1) (Aina i sur., 2012).

$$EW \text{ (g/mol)} = m_{\text{pektina}} \text{ (g)} / (V_{\text{NaOH}} \text{ (mL)} * c_{\text{NaOH}} \text{ (mol/L)}) \quad (1)$$

gdje su:

$$m(\text{pektina}) = \text{početna masa pektina}$$

$$V(\text{NaOH}) = \text{volumen otopine natrijevog hidroksida utrošen za titraciju do pH=7,5}$$

$c(\text{NaOH}) = \text{koncentracija otopine natrijevog hidroksida}$

U neutraliziranu otopinu pektina doda se 25 mL 0,25 M NaOH uz miješanje. Nakon 30 min u istu otopinu doda se 25 mL 0,25 M otopine HCl-a i ponovno titrira sa 0,1 M NaOH do pH=7,5. Očita se volumen utrošenog titranta (b u mL) te se izračuna stupanj esterifikacije (DE (%)) prema izrazu (2) (Aina i sur., 2012).

$$\text{DE (\%)} = 100b/(a+b) \quad (2)$$

### 3. 2. 2. 2. Određivanje udjela galakturonske kiseline

U staklenu epruvetu odvažuje se 5 mg uzorka pektina šećerne repe. Epruveta sa uzorkom stavi se u hladnu kupelj te se doda 1 mL koncentrirane sumporne kiseline. Otopina se miješa 5 min staklenim štapićem nakon čega se dodaje još 1 mL koncentrirane sumporne kiseline. Otopina se miješa 5 min u hladnoj kupelji. Postupak se ponovi još jednom, a nakon toga dodaje se 0,5 mL destilirane vode te se otopina miješa 5 minuta u hladnoj kupelji. Sadržaj epruvete razrijedi se destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL, prenese u Falcon epruvetu od 15 mL te centrifugira (10 minuta, 2000 rpm). 400  $\mu\text{L}$  alikvota iz supernatanta stavlja se u tri epruvete za svaki uzorak te se zatim dodaje 40  $\mu\text{L}$  4 M otopine  $\text{H}_3\text{NSO}_3$  i miješa na vortex-u. U sve epruvete doda se 2,4 mL 75 mM otopine  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$  i ponovo miješa na vortex-u. Epruvete se stave u vodenu kupelj na 100 °C kroz 20 min, a nakon isteka vremena hlade se pod mlazom hladne vode. U dvije epruvete u paraleli doda se 80  $\mu\text{L}$  m-hidroksidifenilne otopine, a u treću se doda jednaki volumen 0,5 %-tne otopine NaOH. Nakon 5-10 min razvija se ružičasta boja te se mjeri apsorbancija na 525 nm. Iz dobivenih vrijednosti konstruira se baždarni pravac koji služi za određivanje galakturonske kiseline (Melton i sur., 2001).

### 3. 2. 3. Postupci izdvajanja proteina iz piskavice

Prije izdvajanja proteina sirovina je usitnjena u mlincu te je prosijana kako bi se ujednačila veličina čestica.

#### 3. 2. 3. 1. Odmašćivanje uzorka

U staklenu čašu od 800 mL izvažuje se 50 g uzorka i doda 200 mL n-heksana. Čaša se prekrije parafilmom i Petrijevom zdjelicom. Sadržaj se miješa na magnetskoj mješalici 30 min. Nakon isteka vremena, centrifugiranjem se iz suspenzije odvoji supernatant, a u kruti talog doda se



200 mL n-heksana. Postupak se ponovi još dva puta. Nakon trećeg centrifugiranja, talog se ostavi stajati preko noći da organsko otapalo ishlapi.

### 3. 2. 3. 2. Uklanjanje ekstraktibilnih tvari

Uklanjanje ekstraktibilnih tvari provodi se trostrukom ekstrakcijom sa 70 %-tnim etanolom. U staklenu čašu odvaži se 50 g odmašćenog uzorka i doda se 500 mL otapala. Sadržaj se miješa na magnetskoj mješalici 30 min. Po isteku vremena, ekstrakt se centrifugira pri čemu se supernatant odbacuje, a kruti talog prebaci natrag u čašu. Ekstrakcija se ponavlja dva puta s istom količinom otapala. Kruti talog koji zaostane nakon treće ekstrakcije suši se izmjenom otapala ispiranjem sa 350 mL 96 %-tnog etanola (2x) i s 200 mL acetona.

### 3. 2. 3. 3. Izdvajanje proteina pri izoelektričnoj točki

Destiliranoj vodi podese se pH na 9,5 dodavanjem 1 M NaOH. U staklenu čašu odvaži se 50 g uzorka i doda 500 mL pripremljene lužnate vode. Čaša se prekrije parafilmom. Hidroliza se provodi na sobnoj temperaturi 60 min uz miješanje na magnetskoj mješalici. Po završetku hidrolize, slijedi centrifugiranje (10 min, 8000 rpm) uz izdvajanje male količine taloga koji se ispere s malo vode i ponovno centrifugira (5 min, 8000 rpm). Dobiveni talog ispere se s tri kapi vode i još jednom centrifugira pri istim uvjetima kao i drugi put. Supernatanti centrifugiranja se spoje te se proteini precipitiraju dodatkom 1 M otopine HCl-a do postizanja pH= 4,5. Kako bi precipitacija proteina bila što bolja, otopina se hladi na 4 °C 2 h. Nakon hlađenja, slijedi centrifugiranje (10 min, 8000 rpm). Nastali talog se resuspendira u vodi i prelije u Petrijeve zdjelice koje se prekriju poklopcem sa izbušenim rupicama, pričvrste parafilmom te liofiliziraju 24 h.

### 3. 2. 4. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina

#### 3. 2. 4. 1. Kapacitet i stabilnost pjenjenja

U staklenoj čaši pomiješa se 0,255 g uzorka sa 25 mL vode. Otopina se miješa do potpunog otapanja proteina nakon čega se podese pH otopine na 7,0 pomoću NaOH. Proteini koji se nisu dobro otopili se centrifugiraju (5 min, 8000 rpm) da se odvoji supernatant. Uzorak se miješa na Ultraturax, IKA-T18 basic uređaju 3 minute na brzini 4 i bilježi se volumen (A u mL). Kapacitet pjenjenja (FC u %) računa se prema izrazu (3) (Kempka i sur., 2015).

$$FC (\%) = ((A-B)/B) \times 100 \quad (3)$$

gdje su:

A= volumen nakon homogeniziranja

B= početni volumen

Stabilnost pjenjenja (FS u %) računa se prema istom izrazu samo što je u tom slučaju A volumen nakon 30 min.

#### 3. 2. 4. 2. Električna provodljivost

Električna provodljivost mjeri se konduktometrom u otopinama koje su prethodno pripremljene za određivanje kapaciteta i stabilnosti pjenjenja. Elektroda uređaja uroni se u otopinu uzorka, a na ekranu se očita vrijednost električne provodljivosti u  $\mu\text{s/cm}$ .

#### 3. 2. 4. 3. Kapacitet vezanja vode i ulja

Odvaže se 0,05 g uzorka u plastičnu epruvetu te doda 5 mL destilirane vode. Otopina se miješa na vortex-u 1 min. Uzorak se ostavi stajati 3 h na sobnoj temperaturi nakon čega se centrifugira (5 min, 3000 rpm) i bilježi volumen supernatanta. Na isti način određuje se i kapacitet vezanja ulja samo što se umjesto 5 mL vode uzorku dodaje 5 mL ulja. Za računanje kapaciteta vezanja vode (WHC) ili ulja (FAC) koristi se izraz (4) (Stone i sur., 2015).

$$\text{WHC/FAC} = ((V_0 - V_v) / V_0) / m \quad (4)$$

gdje su:

WHC/FAC - kapacitet vezanja vode/ulja (mL/g)

$V_0$  - volumen vode/ulja dodane uzorku (mL)

$V_v$  - volumen supernatanta (mL)

m-masa uzorka (g)

#### 3. 2. 4. 4. Indeks aktivnosti emulzifikacije i indeks razdvajanja emulzija

Određivanje indeksa aktivnosti emulzifikacije i razdvajanja emulzija provedeno je prema modificiranom postupku opisanom u istraživanju Belščak-Cvitanović i sur. (2018). Razrjeđenjem 1 % otopine proteina za određivanje sposobnosti pjenjenja pripreme se 0,1 % otopine pojedinog proteina. Iz njih se pipetira 6 mL uzorka u Falcon epruvetu te homogenizira 1 min na Ultraturax-u (brzina 4) s 2,0 mL suncokretovog ulja. Iz pripremljenih emulzija izuzme se 50  $\mu\text{L}$  otopine s dna Falcon epruveta te se ručno (90 s) miješa s 5 mL 0,1 % otopine SDS-a (sodium dodecyl sulfata) i odmah se mjeri apsorbancija na 500 nm. Nakon što uzorak odstoji 10 min u kivetu, ponovno se mjeri apsorbancija. Slijepa proba sadrži samo 0,1 % SDS.

Iz vrijednosti izmjerenih apsorbancija izračunaju se indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) i indeks razdvajanja emulzija (ESI) prema izrazima (5) i (6) (Wang i sur., 2016).

$$EAI(m^2/g) = (2T/c \times (1-\varphi) \times 10\,000) \times A_0 \times \text{razrijeđenje} \quad (5)$$

$$T=2,303$$

$$ESI(\%) = (A_{10}/A_0) \times 100 \% \quad (6)$$

gdje su:

$A_0$  = vrijednost apsorbancije u 0 min                       $c$  = koncentracija otopine proteina

$A_{10}$  = vrijednost apsorbancije nakon 10 min               $\varphi$  = udio ulja (0,25)

### 3. 2. 5. Priprema ekstrakta žutog čaja i otapanje pektina i proteina u njemu

20 g biljnog materijala, prethodno usitnjenog u mlincu, prelije se sa 200 mL vode zagrijane na 80 °C te se ekstrahira 5 min. Po završetku ekstrakcije, uzorak se filtrira preko 4 sloja gaze i ohladi se u hladnoj kupelji.

U čašu od 150 mL odvaže se 2,8 g pektina ekstrahiranog iz pulpe šećerne repe i prelije sa 70 mL prethodno pripremljenog ekstrakta, a u odgovarajuće čaše od 50 mL odvaže se po 0,8 g proteina iz piskavice, riže, graška, soje, sirutke i badema i prelije sa 20 mL ekstrakta žutog čaja. Pripremljene smjese miješaju se na magnetskoj mješalici preko noći.

### 3. 2. 6. Formuliranje i otapanje filmova

Za pripremu filmova koriste se pripremljene otopine pektina i proteina. Za film samo sa pektinom koristi se 10 g otopine pektina, a za filmove s proteinima i pektinom koristi se 5 g otopine pektina i 5 g otopine proteina. Svi filmovi formuliraju se u paraleli. Pripremljene otopine izliju se u Petrijeve zdjelice i doda se kap 85 %-tnog glicerola. Formulirani filmovi stave se na ravnu površinu i suše na sobnoj temperaturi 48 h. Nakon sušenja, filmovi se vade iz Petrijevih zdjelica špatulom i čuvaju u eksikatoru.

Za određivanje bioaktivnog sastava pojedinih filmova, 5 g filma otopi se u 30 mL 10 %-tnog etanola. Tako pripremljeni uzorci koriste se za analizu pomoću spektrofotometrijskih metoda i HPLC uređaja.

### 3. 2. 7. Karakterizacija filmova

#### 3. 2. 7. 1. Određivanje udjela suhe tvari ekstrakta i filmova

Na analitičkoj vagi izvaže se ~ 1,0 g filma, odnosno 5,0 g ekstrakta u suhu i prethodno izvaganu aluminijsku posudicu sa izžarenim kvarcnim pijeskom. Posudice sa uzorkom suše se u sušioniku na 105 °C kroz 4 h nakon čega se hlade u eksikatoru. Ohlađene posudice sa suhim uzorkom ponovno se važu te suše do postizanje konstantne mase. Mjerenja se provode u paraleli. Udio suhe tvari računa se prema izrazima (7) i (8).

$$\% \text{ vode} = (a-b) \times 100 / m \quad (7)$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad (8)$$

gdje su:

a – masa prije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

b – masa poslije sušenja (g)

#### 3. 2. 7. 2. Određivanje boje filmova

Određivanje boje filmova provodi se na nekoliko različitih mjesta na filmu pomoću konduktometra koji ispisuje vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , a rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Vrijednost kolorimetrijske razlike, kojom su prikazani rezultati, predstavlja odstupanje reprodukcije od originala prema navedenim kriterijima:

$\Delta E < 0,2$  = razlika boje se ne vidi

$\Delta E = (3-6)$  = razlika boje se dobro vidi

$\Delta E = (0,2-1)$  = razlika boje se primjećuje

$\Delta E > 6$  = očigledna odstupanja boje

$\Delta E = (1-3)$  = razlika boje se vidi

Vrijednost kolorimetrijske razlike računa se prema izrazima (9), (10), (11), (12) (Petrović i sur., 2013).

$$\Delta E = \Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2 \quad (9)$$

$$\Delta L = L_0 - L_1 \quad (10)$$

$$\Delta a = a_0 - a_1 \quad (11)$$

$$\Delta b = b_0 - b_1 \quad (12)$$

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

### 3. 2. 7. 3. Određivanje debljine filmova

Debljina filmova određuje se na 6 različitih mjesta za svaki film pomoću digitalnog mikrometra (Helios-Preisser Digital Micrometer, Type 40 EX, Njemačka), a rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom ( $\mu\text{m}$ ).

### 3. 2. 8. Određivanje bioaktivnog sastava filmova

#### 3. 2. 8. 1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Za određivanje udjela ukupnih polifenola koristi se spektrofotometrijska metoda temeljena na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u plavo obojeni wolframov i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se 2 sata od početka reakcije na 765 nm.

#### Postupak rada:

U epruvetu se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 50  $\mu\text{L}$  uzorka, 2,50 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 7,5 mL 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  čime se pokreće reakcija. Uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena mjeri se apsorbancija na 765 nm. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Svi uzorci pripremaju se u paraleli, a rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost sa pripadajućim standardnim devijacijama. Rezultati se izražavaju na temelju baždarnog pravca izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g filma. Udio ukupnih polifenola računa se pomoću jednadžbe (13).

$$y = 0,001x - 0,0001 \quad (13)$$

gdje su:

y - izmjerena vrijednost apsorbancije pri 765 nm

x - koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

### 3. 2. 8. 2. Određivanje udjela flavan-3-ola

Flavan-3-oli određuju se spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na reakciji vanilina s alkoholnim skupinama na položajima C6 i C8 u molekulama flavan-3-ola pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet nastalog crvenog obojenja mjeri se na 500 nm.

#### Postupak rada:

U epruvetu se otpipetira 0,5 mL uzorka i 3 mL prethodno pripremljene 4 %-tne otopine vanilina u metanolu. Nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline u epruvete koje se nalaze u hladnoj vodenoj kupelji. Slijepa proba umjesto vanilina sadrži čisti metanol. Rezultati se izražavaju kao mg (+) – katehina/g uzorka. Udio flavan-3-ola računa se prema formuli (14).

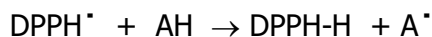
$$(+)\text{-katehin} = 290,8 \times \Delta E \times \text{razrijeđenje} \quad (14)$$

gdje je:

$\Delta E$  = razlika apsorbancije između uzorka i slijepa probe

### 3. 2. 8. 3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

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



#### Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100  $\mu\text{L}$  uzorka i doda se 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te se odmah mjeri apsorbancija na 515 nm u razmaku od 1 minute. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 100  $\mu\text{L}$  metanola. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , a rezultati se preračunavaju

prema baždarnoj krivulji (15) i izražavaju kao maseni udjel ( $\mu\text{g/g}$  uzorka) ekvivalenata Trolox-a.

$$y = 0,6030x - 0,0068 \quad (15)$$

gdje su:

x - koncentracija otopine Trolox-a ( $\text{mg/L}$ )

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije na 515 nm

#### 3. 2. 8. 4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na redukciji plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. U ovom radu oksidacija otopine ABTS-a provodila se otopinom kalijevog persulfata. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti korištenog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Udjel reduciranog ABTS radikala antioksidansima izražava se kao funkcija koncentracije i vremena, te se mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala spektrofotometrijski na 734 nm. Dobiveni udjel reduciranog ABTS radikala uspoređuje se sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima.

##### Postupak rada:

Oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom pripremi se otopina  $\text{ABTS}^+$  radikala, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. U odmjernoj tikvici od 5 mL pomiješa se 88  $\mu\text{L}$  140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata i nadopuni do oznake sa 7 mM otopinom ABTS reagensa. Tako pripremljena otopina stoji preko noći na sobnoj temperaturi. Prije analize otopina se razrijedi 96 %-tnim etanolom do konačne koncentracije  $\text{ABTS}^+$  radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . U epruvetu se otpipetira 20  $\mu\text{L}$  uzorka i 2 mL otopine  $\text{ABTS}^+$  radikala i nakon 6 minuta se mjeri apsorbancija na 734 nm. Prije toga mjeri se apsorbancija slijepe probe koja umjesto uzorka sadrži 20  $\mu\text{L}$  vode. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se prema baždarnom pravcu (16) preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa).

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad (16)$$

gdje su:

x - antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox /L)

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije na 734 nm

3. 2. 9. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Priprema uzorka:

5 g formuliranog filma otopi se u 30 mL 10%-tnog etanola. Otopina se filtrira kroz odgovarajuće mikrofiltere te se injektira se u kromatografski sustav (10 µL).

Postupak rada:

Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva temelji se na razlikama u polarnosti pojedinih komponenata, a provodi se kromatografijom obrnutih faza na ACE Excel SuperC18 (250 x 4,6 mm, 5µm) koloni (nepolarna stacionarna faza) eluacijom polarnim otapalima (Belščak-Cvitanović i sur., 2012). Parametri HPLC analize:

Mobilna faza: A – 2% mravlja kiselina

Detekcija: UV/VIS PDA ( $\lambda=278$  nm)

B – Metanol

Temperatura kolone: sobna

Protok: 1 mL/min

Vrijeme trajanja analize: 35 min (+ 5 min Post Time)

Eluiranje: gradijentno (Tablica 4.)

**Tablica 4.** Gradijent otapala za HPLC analizu bioaktivnih spojeva

t (min)	OTAPALO A (%)	OTAPALO B (%)	PROTOK (mL min <sup>-1</sup> )
0	98	2	1,0
10	68	32	1,0
20	60	40	1,0
30	30	70	1,0
35	5	95	1,0



Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:

Detekcija galne kiseline, epigalokatehin galata, kafeina, katehina, epigalokatehina i teobromina provodi se snimanjem eluata Photo Diode Array (PDA) detektorom uz rezoluciju 1,2 nm na valnoj duljini 278 nm (UV područje). Identifikacija spoja provodi se usporedbom vremena zadržavanja (Rt) dobivenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda i usporedbom s UV-spektrima standarda (oblik spektra i apsorpcijski maksimumi). Za kvantitativno određivanje spojeva u uzorcima koriste se jednadžbe baždarnih pravaca za pojedini spoj (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
Galna kiselina	$y = 29,783x - 61,812$
Epigalokatehin galat	$y = 9,6163x + 66,845$
Kafein	$y = 18,949x + 32,951$
Katehin	$y = 5,4785x + 17,056$
Epigalokatehin	$y = 21,775x - 24,912$
Teobromin	$y = 35,066x + 8,0907$

HPLC analiza provodi se u dvije paralelne probe, a rezultati se izražavaju kao mg/g filma te se prikazuju kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Za prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom koristi se program Star Chromatography Workstation Version 5, dok se rezultati obrađuju pomoću programa Microsoft Office Excel.

### 3. 2. 10. Senzorska analiza

Za senzorsko ocjenjivanje filmova koristi se hedonistička bodovna ljestvica s ocjenama od 1-9 pri čemu 9 označava izrazito poželjnu kvalitetu, a 1 označava defektan proizvod. U ovom ocjenjivanju sudjelovalo je 5 djelatnica i studentica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta starosti između 22-45 godina (Ozdemir i Floros, 2008). Senzorskom analizom ocjenjivani su: izgled, boja, transparentnost, elastičnost i prihvatljivost. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost sa odgovarajućom devijacijom za svako ocijenjeno svojstvo.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je korištenjem prirodnih materijala, pektina iz pulpe šećerne repe i proteina (piskavice, riže, graška, soje, sirutke i badema) te žutog čaja, kao izvora bogatog bioaktivnim spojevima, pripremiti funkcionalne jestive filmove. Primarnim sirovinama određena su fizikalna svojstva: pektinu iz šećerne repe određen je stupanj esterifikacije, ekvivalentna masa, pH te udio galakturonske kiseline, dok je proteinima određen kapacitet i stabilnost pjenjenja, kapacitet vezanja vode i ulja, indeks aktivnosti emulzifikacije, indeks razdvajanja emulzija te provodljivost. Formuliranim filmovima su, osim fizikalno-kemijskih (udio suhe tvari, boja i debljina), određena i mehanička svojstva (vlačna čvrstoća i elastičnost). Antioksidacijski kapacitet formuliranih filmova određen je ABTS i DPPH metodama, dok je primjenom HPLC-DAD analize u filmovima određen udio pojedinačnih polifenolnih spojeva. Također, formuliranim filmovima ispitana su senzorska svojstva.

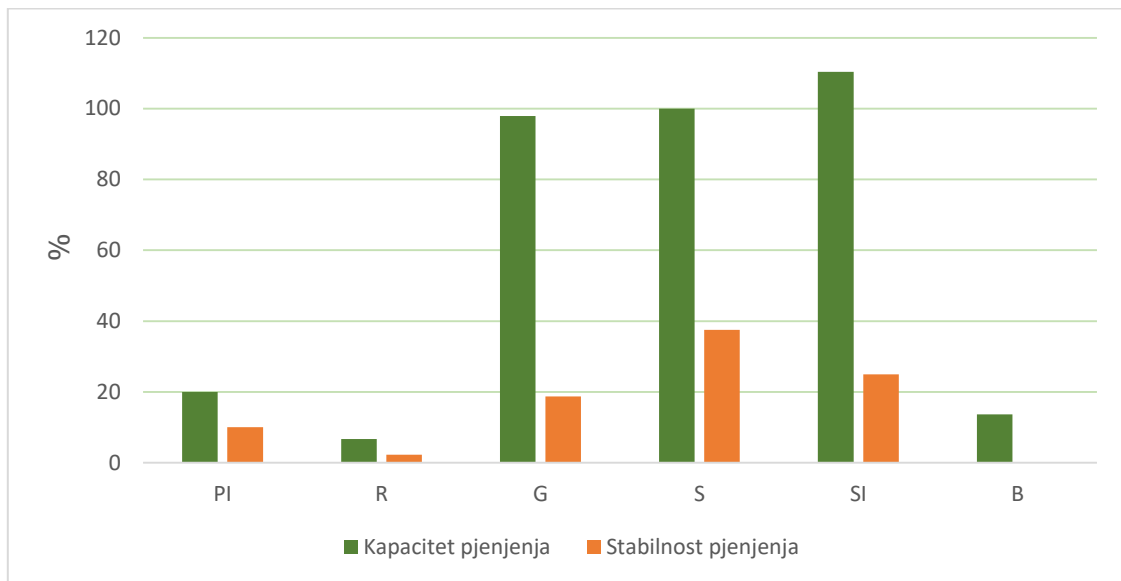
### 4. 1. Karakterizacija pektina

**Tablica 6.** Karakterizacija pektina izoliranog iz pulpe šećerne repe

Uzorak	DE (%)	EW (g/mol)	pH	% GaIUA
Pulpa šećerne repe	74,52 ± 0,21	1086,96 ± 1,02	3,12	84,04 ± 0,18

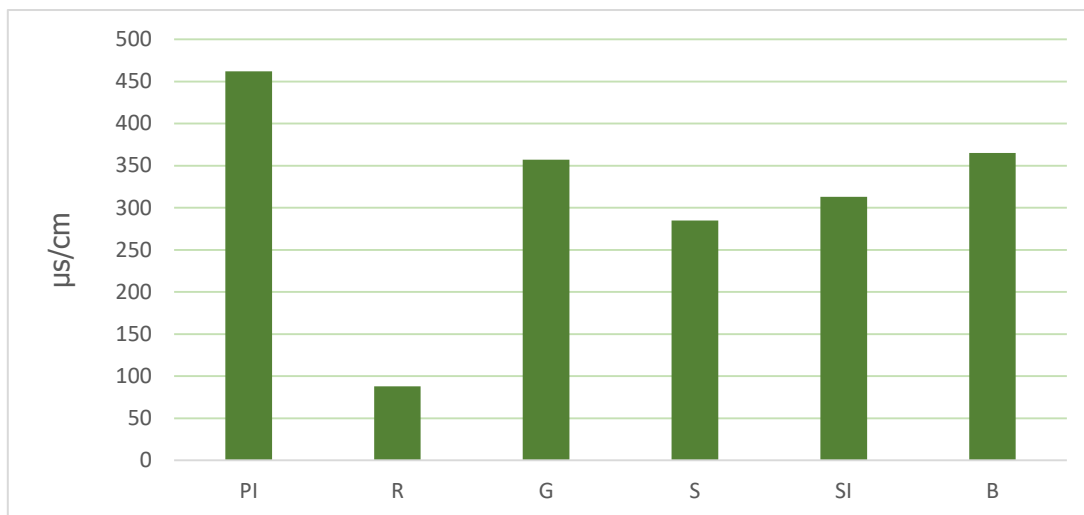
U ovome radu provedena je ekstrakcija i karakterizacija (ekvivalentna masa, stupanj esterifikacije, pH i udio galakturonske kiseline) pektina iz pulpe šećerne repe. Rezultati karakterizacije pektina prikazani su u Tablici 6. Stupanj esterifikacije pektina iznosio je 74,52 % te je dobiveni rezultat malo viši s obzirom na rezultat Sen i suradnika (2013) gdje je iznosio oko 66 %. Također, određena je ekvivalentna masa pektina koja je iznosila 1086,96 g/mol, te udio galakturonske kiseline koji je iznosio 84,04 %. U istraživanju Muller-Maatsch i suradnika (2016) udio galakturonske kiseline u pektinu šećerne repe iznosio je oko 65 %, međutim, brojni su razlozi zbog kojih može doći do nepodudarnosti u rezultatima, uključujući karakteristike i pripremu polazne sirovine te uvjete ekstrakcije pektina.

#### 4. 2. Karakterizacija funkcionalnih svojstava proteina



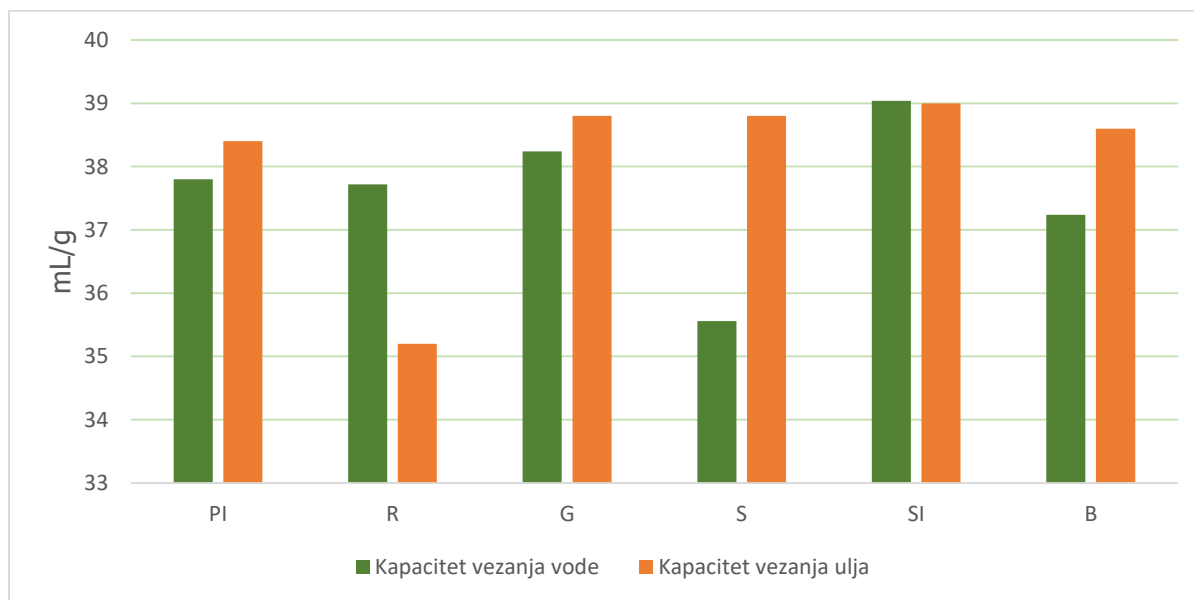
**Slika 7.** Kapacitet pjenjenja (%) i stabilnost pjenjenja (%) proteina piskavice (PI), riže (R), graška (G), soje (S), sirutke (SI) i badema (B)

Izdvajanje proteina iz piskavice provedeno je alkalnom hidrolizom i naknadnom precipitacijom pri izoelektričnoj točki. Ispitivana su funkcionalna svojstva tih proteina, kao i komercijalnih proteina riže, graška, soje, sirutke i badema. Jedno od važnih svojstava proteina je stvaranje i stabilizacija pjene u proizvodnji raznih namirnica. Kao dobri agensi za pjenjenje, proteini bi trebali formirati i stabilizirati pjene brzo i učinkovito pri niskoj koncentraciji u rasponu pH koji su u raznim namirnicama (Barać i sur., 2011). Kapacitet i stabilnost pjenjenja prikazan je na Slici 7. Najveći kapacitet pjenjenja pokazali su proteini sirutke (110,42 %), dok proteini graška i soje imaju podjednake kapacitete pjenjenja, a slijede ih proteini piskavice (20 %), čiji su rezultati u skladu s istraživanjem Mabrouki i suradnika (2015) koji su odredili da je FC piskavice 21,37 %. Najmanji FC imaju proteini riže (6,67 %). Najbolju stabilnost pjenjenja pokazali su proteini soje (37,5 %), slijede proteini sirutke, graška, piskavice (10 %), a najlošiju stabilnost pjenjenja imaju proteini riže (2,22 %), dok kod proteina badema pjena nije stabilna. U radu Wang i suradnika (2016) FC proteina riže iznosio je oko 5 %. Stabilnost pjenjenja za proteine piskavice u istraživanju Feyzi i suradnika (2017) iznosila je 65 %, što je 6,5 puta više od rezultata u ovom radu, no budući da se radi o biljnoj sirovini brojni su razlozi koji mogu utjecati na taj rezultat, a ponajprije i samo podrijetlo, uvjeti uzgoja i varijetet piskavice. Kao što se može na vidjeti Slici 7. proteini kojima je određen veći kapacitet pjenjenja, imaju i veću stabilnost pjene.



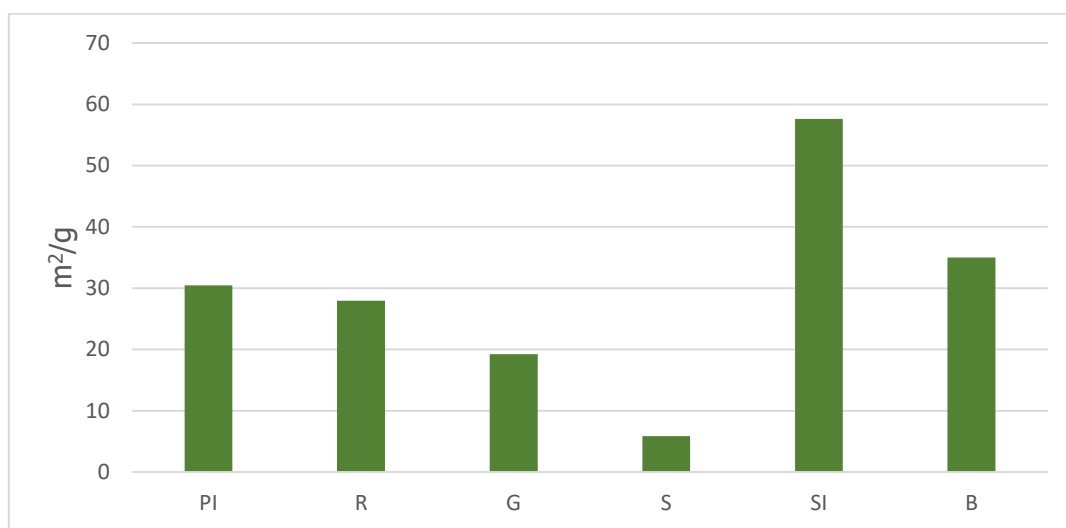
**Slika 8.** Električna provodljivost proteina piskavice (PI), riže (R), graška (G), soje (S), sirutke (SI) i badema (B)

Električna provodljivost proteina prikazana je na Slici 8. Najveću provodljivost imaju proteini piskavice (462  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), a zatim slijede proteini graška > badema > sirutke > soje, dok u prosjeku trostruko manju provodljivost imaju proteini riže.



**Slika 9.** Kapacitet vezanja vode (WHC) i ulja (FAC) proteina piskavice (PI), riže (R), graška (G), soje (S), sirutke (SI) i badema (B)

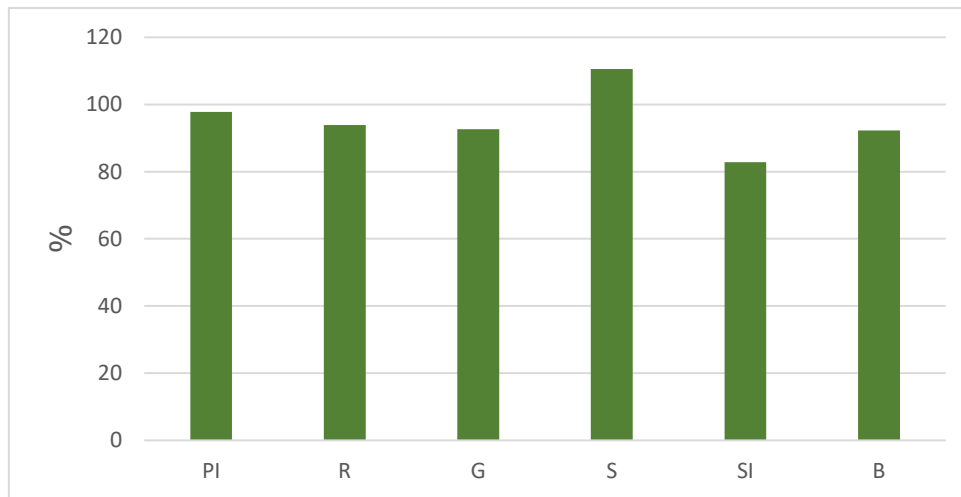
Na Slici 9. prikazane su vrijednosti kapaciteta vezanja vode, odnosno ulja za korištene proteine. Proteini sirutke pokazali su najveći kapacitet vezanja vode i ulja te su njihove vrijednosti iste (39 mL/g). Manji kapacitet vezanja vode imaju proteini graška (38,24 mL/g), te redom proteini piskavice i riže (s jednakim kapacitetom vezanja vode (37 mL/g)), proteini badema (37,24 mL/g), te najmanji proteini soje (35,56 mL/g). Vrijednosti kapaciteta vezanja ulja ujednačene su kod proteina piskavice, graška, soje i badema (38 mL/g), a najmanji FAC pokazali su proteini riže (35,2 mL/g).



**Slika 10.** Indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) proteina piskavice (PI), riže (R), graška (G), soje (S), sirutke (SI) i badema (B)

Također, ispitana su svojstva indeksa aktivnosti emulzifikacije (EAI) koja su prikazana na Slici 10. Najveće vrijednosti indeksa aktivnosti emulzifikacije određene su s proteinima sirutke (57,61 m<sup>2</sup>/g), dok su najmanje određene s proteinima soje (5,83 m<sup>2</sup>/g). Vrijednosti EAI proteina ne mogu se uspoređivati s rezultatima iz literature jer se razlikuju u čistoći te u obliku u kakvom su korišteni (izolirani ili komercijalni).

Svojstva indeksa razdvajanja emulzija (ESI) prikazana su na Slici 11. Najveći indeks razdvajanja emulzija pokazali su proteini soje (preko 100 %), a slijede ih proteine piskavice (97,8 %), riže (93 %), badema i graška (92%) . U istraživanju Wang i suradnika (2016) ESI za proteine riže

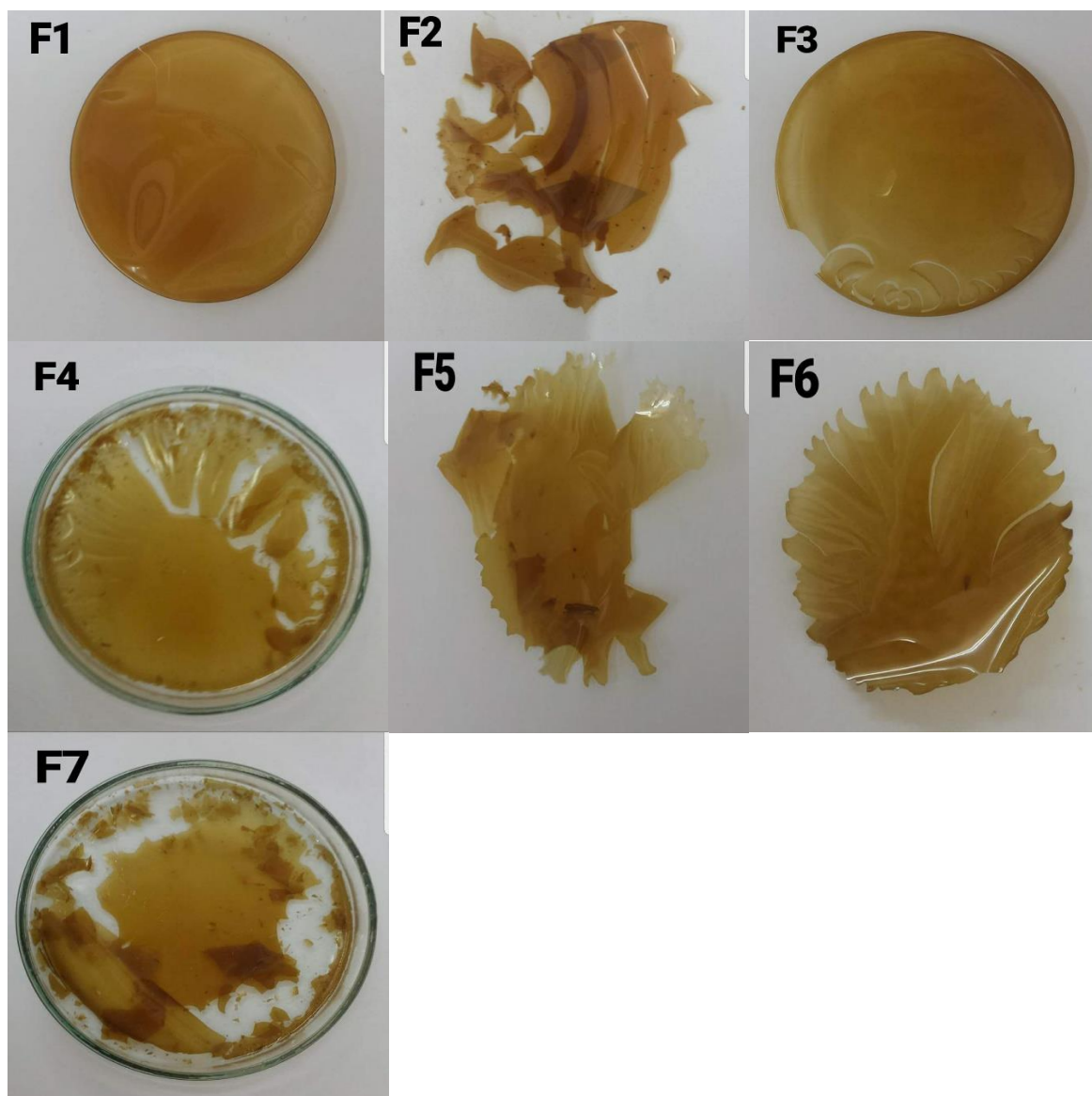


**Slika 11.** Indeks razdvajanja emulzija (ESI) proteina iz piskavice (PI), riže (R), graška (G), soje (S), sirutke (SI) i badema (B)

iznosio je oko 23 % što je, uspoređujući s rezultatima iz ovoga rada, znatno manja vrijednost. Razlika u dobivenim rezultatima može se prepisati različitim izvoru proteina riže. U ovome radu korišteni su komercijalni proteini riže, dok su u spomenutom istraživanju korišteni izolirani proteini, a između njih postoji razlika u čistoći. Proteini sirutke imaju nižu vrijednost ESI (82,8 %).

Vizualni izgled jestivih filmova prikazan je na Slici 12. (od F1-F7). Prema vizualnim karakteristikama, najsjajniji i bez neravnih površina ili napuknuća pokazao se film čistog pektina (F1). Najmanje sjaja ima F2, dok ostali filmovi pokazuju zadovoljavajući sjaj. Jestivi film F3 ima samo mala napuknuća po rubu na jednoj strani, dok filmovi F2, F5 i F6 imaju puno pukotina, u slučaju filmova F4 i F7 prilikom vađenja iz Petrijevih zdjelica došlo je do puknuća u sitne komadiće. Najtamniji film je F2, a najsvjetliji je F7.

#### 4.3. Vizualni izgled formuliranih filmova



**Slika 12.** Fotografije formuliranih filmova žutog čaja s čistim pektinom (F1), pektinom i proteinima piskavice (F2), riže (F3), graška (F4), soje (F5), sirutke (F6) i badema (F7)

#### 4. 4. Karakterizacija formuliranih filmova

**Tablica 7.** Fizikalno-kemijske i mehaničke karakteristike formuliranih filmova žutog čaja

Uzorak	Suha tvar (%)	L*	a*	b*	$\Delta E$	Debljina filmova/ $\mu\text{m}$	Vlačna čvrstoća/N	Elastičnost (%)
F1	81,99±0,01	21,42±2,72	2,24±0,47	6,33±0,91	-	96,50±22,28	3,64±0,83	18,02±2,40
F2	94,45±0,56	26,64±1,53	2,16±0,31	5,71±0,36	34,79±27,09	140,33±39,11	-	-
F3	94,11±0,07	25,43±2,83	1,36±0,31	5,43±1,77	38,31±41,53	96,50±14,94	-	-
F4	94,80±0,22	22,70±1,63	0,61±0,17	5,94±0,99	17,09±12,01	85,17±13,44	-	-
F5	95,01±0,00	22,72±2,53	1,97±0,28	5,91±0,35	18,36±10,02	133,00±38,04	-	-
F6	93,55±0,12	17,99±3,57	3,81±1,41	13,63±0,68	80,45±21,38	104,33±12,40	-	-
F7	94,50±0,08	24,84±3,35	1,89±0,65	7,09±0,51	33,41±35,61	38,67±7,23	-	-
Ekstrakt	3,51±0,13	-	-	-	-	-	-	-

„-“ nije mjereno



U Tablici 7. prikazane su fizikalno-kemijske i mehaničke karakteristike formuliranih filmova. Najmanji udio suhe tvari ima čisti pektinski film (82 %), dok se u filmovima formuliranima kombinacijom pektina i proteina udio suhe tvari kreće u rasponu od 93,55 do 95,01 %. Najveći udio suhe tvari sadrži film F5 (95,01 %).

Svi filmovi pripremljeni kombinacijom pektina i proteina imaju veću vrijednost parametra boje L\* u odnosu na čisti pektinski film, osim F6. F2 ima najveću vrijednost L\* što upućuje na povećanje svjetline uzorka. Najveću vrijednost parametra a\* ima F6 što ukazuje da ima najviši intenzitet crvene boje, dok najmanji intenzitet crvene boje ima F4 (najmanji a\*). Parametar b\* najveći je za F6 što znači da on ima najzastupljeniju žutu komponentu boje, a F3 najmanje zastupljenu. Vrijednost  $\Delta E$  je za sve filmove proizvedene kombinacijom pektina i proteina veća je od 6 što ukazuje na razlike u boji u odnosu na čisti pektinski film.

Najveća debljina određena je kod filma F2 (140,33  $\mu\text{m}$ ), a najmanja za F7 (38,67  $\mu\text{m}$ ).

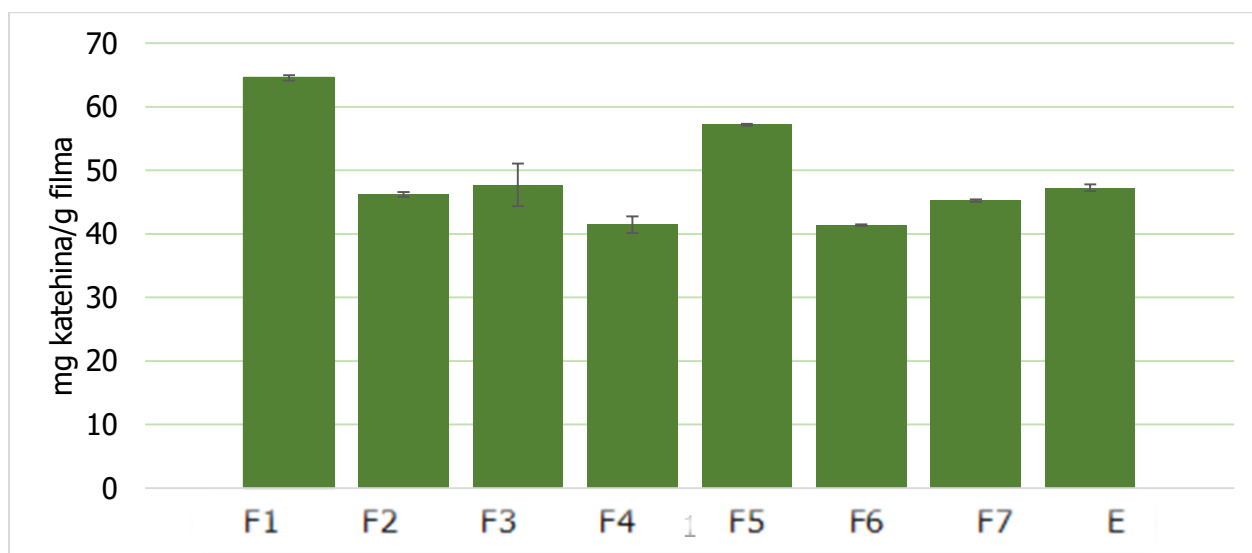
Mehanička svojstva (vlačna čvrstoća i elastičnost) bilo je moguće izmjeriti samo za čisti pektinski film, dok mjerenje istih svojstava nije bilo moguće za ostale filmove zbog krhke strukture i lomljivosti.

#### 4. 5. Bioaktivni sastav formuliranih filmova



**Slika 13.** Udjel ukupnih polifenola (mg GAE/ g filma) u formuliranim filmovima žutog čaja

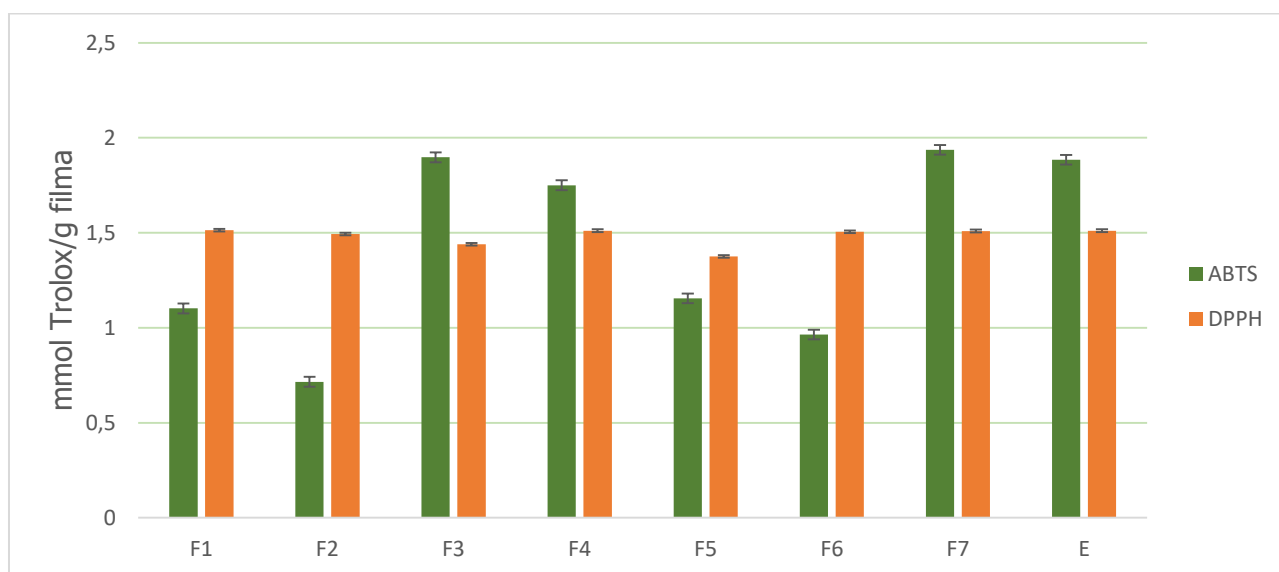
Udio ukupnih polifenola u formuliranim filmovima žutog čaja prikazan je na Slici 13. Kao izvor bioaktivnih spojeva korišten je ekstrakt žutog čaja. Udio ukupnih polifenola u ekstraktu žutog čaja prema istraživanju Kopjar i suradnika (2015) iznosi od 0,575 do 6,629 g/kg, ovisno o veličini čestica i ekstrakcijskom otapalu. Rezultati pokazuju da filmovi F3, F6, F7 imaju veći udio ukupnih polifenola od samog ekstrakta žutog čaja, dok F5, F4, F2, kao i čisti pektinski film imaju manji udio ukupnih polifenola u odnosu na čisti ekstrakt. Udjelu ukupnih polifenola u filmovima F3, F6 i F7 osim ekstrakta žutog čaja doprinose i pektin te proteini. Za određivanje ukupnih polifenola korišten je Folin-Ciocalteu reagens koji ulazi u interakcije s proteinima. Bakrovi ioni ( $\text{Cu}^{2+}$ ) u lužnatom mediju vežu se na peptidne veze i reduciraju se u  $\text{Cu}^+$  pri čemu nastaje kompleks protein- $\text{Cu}^+$ . U drugom koraku FC reagens reagira s tim kompleksom i reducira se dajući karakteristično plavo obojenje otopine (Alam, 1992).



**Slika 14.** Udjel flavan-3-ola (mg katehina/ g filma) u formuliranim filmovima žutog čaja

Vrijednosti udjela flavan-3-ola u formuliranim filmovima prikazane su na Slici 14. Najveći udio flavan-3-ola ima čisti pektinski film (64,56 mg katehina/g filma). Također, F5 ima veći udio flavan-3-ola (57,17 mg katehina/g filma), nego ekstrakt žutog čaja, dok svi ostali filmovi imaju malo manje udjele flavan-3-ola u usporedbi s ekstraktom, što ukazuje da i pektin i proteini soje doprinose povećanom udjelu flavan-3-ola.

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prikazane su na Slici 15.



**Slika 15.** Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox/ g filma) formuliranih filmova žutog čaja određen ABTS i DPPH metodama

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pokazuje da svi formulirani filmovi imaju slične ili jednake antioksidacijske kapacitete kao i ekstrakt žutog čaja. U istraživanju Kopjar i suradnika (2015) ekstrakt žutog čaja dobiven iz praškastih listića, kakvi su korišteni i u ovome radu, imao je antioksidacijski kapacitet 40,733  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  (ABTS metoda), odnosno 26,521  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  (DPPH metoda). Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva ovisi o broju OH skupina i njihovom položaju (Kazazić, 2004). Rezultati ABTS metode ukazuju da F7 ima veći antioksidacijski kapacitet (1,94 mmol Trolox/ g filma) od ekstrakta žutog čaja, dok F3 ima jednak antioksidacijski kapacitet kao i ekstrakt. Svi ostali filmovi imaju manji antioksidacijski kapacitet od ekstrakta. Do razlika u rezultatima antioksidacijskog kapaciteta među metodama može doći zbog razlike u osjetljivosti pojedine metode, te same pripreme uzoraka i zato što ABTS reagens reagira s lipofilnim i hidrofilnim skupinama, a DPPH radikal samo s hidrofilnim skupinama (Sricharoen i sur., 2015).

Udjel bioaktivnih spojeva (galna kiselina, epigalokatehin galat, kafein, katehin, epigalokatehin te teobromin) u jestivim filmovima određen je HPLC analizom (Tablica 8.). Filmovi formulirani kombinacijom pektina i proteina pokazali su veći udio galne kiseline i kafeina, u odnosu na ekstrakt žutog čaja, dok je čisti pektinski film pokazao manje vrijednosti. Udio epigalokatehin galata je u svim filmovima manji u usporedbi s ekstraktom žutog čaja. Udio katehina je veći u F3 (8,88 mg/ g), u odnosu na ekstrakt žutog čaja, dok svi ostali filmovi sadrže manje katehina. F7 pokazao je viši udio epigalokatehina (8,89 mg/ g) od ekstrakta žutog čaja, dok je kod drugih

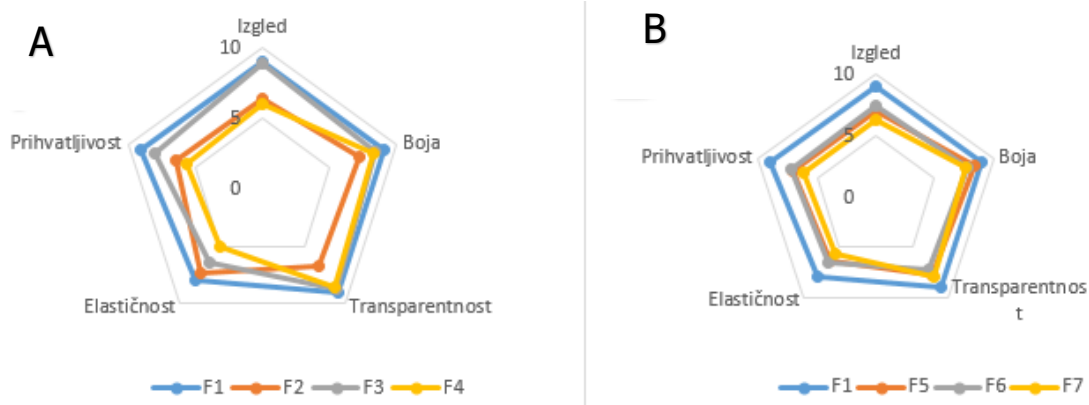
filmova određen niži udio. Svi filmovi imaju veći udio teobromina u usporedbi sa ekstraktom, dok čisti pektinski film i F2, F3, F6 uopće ne sadrže teobromin.

**Tablica 8.** Udjel (mg/g) pojedinačnih bioaktivnih spojeva u formuliranim filmovima

Spoj/ Uzorak	Galna	Epigalokatehin	Kafein	Katehin	Epigalokatehin	Teobromin
	kiselina	galat				
mg/g ± SD						
F1	1,38±0,04	45,47±0,31	32,87±0,02	6,13±0,28	5,41±0,04	n.d.
F2	1,91±0,08	25,15±0,69	40,23±0,00	3,59±0,09	2,65±0,12	n.d.
F3	2,79±0,08	44,49±0,49	50,90±0,14	8,88±0,01	7,83±0,10	1,27±0,07
F4	2,41±0,01	40,58±0,78	43,65±4,85	6,97±2,03	5,76±0,54	0,99±0,11
F5	2,92±0,04	36,23±0,36	50,50±0,56	7,16±0,12	4,51±0,25	1,19±0,00
F6	2,03±0,05	44,93±0,02	40,10±0,13	1,90±0,09	5,49±0,29	n.d.
F7	2,77±0,01	49,66±0,43	50,43±0,47	6,35±0,16	8,89±0,02	1,32±0,01
Ekstrakt	1,82±0,06	55,31±0,24	34,87±0,16	7,93±0,03	8,11±0,02	0,82±0,01

„n.d.“- nije detektiran

#### 4. 6. Senzorska svojstva formuliranih filmova



**Slika 16.** Senzorska analiza formuliranih filmova žutog čaja: F1, F2, F3 i F4 (A) i F1, F5, F6 i F7 (B)

Senzorska svojstva filmova prikazana su pomoću "spider" dijagrama (Slika 16.). Najviše ocjene (9) za sve ispitivane parametre osim elastičnosti (8), dobio je čisti pektinski film te stoga je on najbolje ocijenjeni film. Svim formuliranim filmovima najlošije je ocijenjena elastičnost. Senzorski su najlošije ocijenjeni filmovi s dodatkom proteina graška (F4) i badema (F7), posebice uzimajući u obzir svojstva izgleda, boje, elastičnosti i prihvatljivosti u odnosu na ostale ispitivane filmove. Na svojstva proizvedenih filmova utječu interakcije između pektina i proteina.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Pektin izdvojen iz pulpe šećerne repe, kao i proteini izdvojeni iz piskavice, uspješno su primijenjeni u formulacijama funkcionalnih jestivih filmova, u kombinaciji s komercijalno dostupnim proteinima soje, riže, graška, sirutke i badema.
2. Najbolji kapacitet i stabilnost pjenjenja karakteriziraju proteine soje, dok najveću električnu provodljivost imaju proteini piskavice. Proteini sirutke imaju najbolji kapacitet vezanja vode i ulja te najveći indeks aktivnosti emulzifikacije. Proteini soje pokazali su nešto veći indeks razdvajanja emulzija u odnosu na ostale proteine.
3. Najveći udio polifenola određen je u filmovima pripremljenima kombinacijom pektina i proteina riže, u kojem je određen i najveći udio galne kiseline, kafeina i katehina.
4. Najveći antioksidacijski kapacitet karakterizira film pripremljen kombinacijom pektina i proteina badema, u kojem je također određen i najveći udio epigalokatehin galata, epigalokatehina i teobromina.
6. Uzimajući u obzir rezultate senzorske analize, fizikalno-kemijske i mehaničke karakteristike, najbolji je film pripremljen kombinacijom pektina i proteina riže, a potom slijede kombinacije sa proteinima sirutke, soje, piskavice, badema i graška.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1, <<https://www.edenbrothers.com/store/sugar-beet-seeds.html>>. Pristupljeno 10. ožujka 2018.

Anonymous 2, <<https://www.windsonindia.com>>. Pristupljeno 11. ožujka 2018.

Aina, V.O., Barau, M.M., Mamman, O.A., Zakari, A., Haruna, H., Hauwa Umar, M.S., Abba, Y.B. (2012) Extraction and Characterization of Pectin from Peels of Lemon (*Citrus limon*), Grape Fruit (*Citrus paradisi*) and Sweet Orange (*Citrus sinensis*). *British Journal of Pharmacology and Toxicology* **3**: 259-262.

Alam, A. (1992) A model for formulation of protein assay. *Analytical Biochemistry* **203(1)**: 121–126.

Amin, A., Alkaabi, A., Al-Falas, S., Daoud, S. A. (2005) Chemopreventive activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer. *Cell Biology International* **29(8)**: 687-694.

Andrade, A.M., Riberio-Santos, R., Costa Bonito, M.C., Saraiva, M., Sanches-Silva, A. (2018) Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Food Science and Technology* **92**: 46-85.

Atmodjo, M. A., Hao, Z., Mohnen, D. (2013) Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 747-779.

Balti, R., Mansour, M.B., Sayari, N., Yacoubi, L., Brodu, N., Masse, A. (2017) Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with Spirulina extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **105**: 1464-1472.

Barać, M., Čabrilo, S., Pešić, M., Stanojević, S., Pavličević, M., Maćej, O., Ristić, N. (2011) Functional Properties of Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolates Modified with Chymosin. *International Journal of Molecular Sciences* **12 (12)**: 8372-8387.

Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., Bauman, I. (2012) Innovative formulation of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. Leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International* **48**: 820-830.

Belščak-Cvitanović, A., Vojvodić, A., Bušić, A., Keppler, J., Steffen-Heins, A., Komes, D. (2018) Encapsulation templated approach to valorization of cocoa husk, poppy and hemp macrostructural and bioactive constituents. *Industrial Crops and Products* **112**: 402–411.

- Bourtoom, T. (2008) Edible films and coatings: characteristics and properties. *Food Research International* **15**: 237-248.
- Chatterjee, S., Variyar, P.S., Sharma, A. (2010) Bioactive lipid constituents of fenugreek. *Food Chemistry* **1**: 349–353.
- Chen, H., Fu, X., Luo, Z. (2015) Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chemistry* **168**: 302-310.
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quievy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., Blecker, C., Devaux, J., Paquot, M. (2013) Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules* **52**: 148-156.
- Concha, J., Weinstein, C., Zuniga, M.E. (2013) Production of pectic extracts from sugar beet pulp with antiproliferative activity on a breast cancer cell line. *Chemical Science* **7**: 482-489.
- Dangaran, K., Tomasula, P.M., Qi, P. (2009) Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. 25-56.
- Dettlaff, K., Stawny, M., Ogrodowczyk, M., Jelinska, A., Bednarski, W., Watrobska-Swietlikowska, D., Keck, R.W., Khan, O.A., Mostafa, I. H., Jankun, J. (2017) Formulation and characterization of EGCG for the treatment of superficial bladder cancer. *International Journal of Molecular Medicine* **40(2)**: 329-336.
- Dias, T. R., Tomás, G., Teixeira, N. F., Alves<sup>1</sup>, M. G., Oliveira, P. F., & Silva, B. M. (2013). White tea (*Camellia sinensis* L.): Antioxidant properties and beneficial health effect. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **2(2)**: 19-26.
- Feyzi, S., Varidi M., Zare, F., Javad Varidi, M. (2017) A comparison of chemical, structural and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolates produced using different defatting solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*. **105(1)**: 27-35.
- Flammang, A., Cifone, M., Erexson, G., Stankowski, L. (2004) Genotoxicity testing of a fenugreek extract. *Food Chemical Toxicology* **11**: 1769–1775.
- Gomez, B., Gullon, B., Yanez, R., Schols, H., Alonso, J.L. (2016) Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods* **20**: 108-121.



- Gramza-Michalowska, A., Sidor, A., Regula, J., Kulczynski, B. (2015) PCL assay application in superoxide anion-radical scavenging capacity of tea *Camellia sinensis* extracts. *Acta Scientiarum Polonorum -- Technologia Alimentaria* **14**: 331-341.
- Guo, X., Meng, H., Zhu, S., Tang, Q., Pan, R., Yu, S. (2016) Stepwise ethanolic precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract. *Carbohydrate Polymers* **136**: 316-321.
- Han, M., Zhao, G., Wang, Y., Wang, D., Sun, F., Ning, J., Wan, X., & Zhang, J. (2016). Safety and anti-hyperglycemic efficacy of various tea types in mice. *Scientific Reports* **6**: 31703
- Harel, P., Mignot, L., Sauvage, J.P., Junter, G. A. (1998) Cadmium removal from dilute aqueous solution by gel beads of sugar beet pectin. *Industrial Crop and Products* **7**: 239–247.
- Huang, X., Li, D., Wang, L. (2017) Characterization of pectin extracted from sugar beet pulp under different drying conditions. *Journal of Food Engineering* **211**: 1-6.
- Kakani, R.K., Anwer, M.M. (2012) 16 Fenugreek. Handbook of herbs and spices
- Kazazić, S.P. (2004) The antioxidant and antiradical activity of flavonoids (in Croatian). *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **55**: 279–290.
- Kempka, A.P., Horvath, F.J., Fagundes, P., Prestes, R.C. (2015) Foaming and emulsifying capacity, foam and emulsion stability of proteins of porcine blood: determination at different values of pH and concentrations. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* 1798-1800.
- Ketchum, L. (2004) It's a Wrap!. *Oregon's Agricultural Progress*
- Kopjar, M., Tadić, M., Piližota, V. (2015) Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2:1
- Kujawska, M., Ewertowska, M., Adamska, T., Jodynys-Liebert, J., Ignatowicz, E., & Gramza-Michalowska, A. (2016). Protective effect of yellow tea extract on N-nitrosodiethylamine-induced liver carcinogenesis. *Pharmaceutical Biology* **54(9)**: 1891-1900.
- Leclere, L., Van Cutsem, P., Michiels, C. (2013) Anti-cancer activities of pH- or heatmodified pectin. *Front Pharmacol* **128**: 1-8.
- Li, D., Du, G., Jing, W., Li, J., Yan, J., Liu, Z. (2015) Combined effects of independent variables on yield and protein content of pectin extracted from sugar beet pulp by citric acid **129**: 108-114.
- Liu, Y. (2011). Studies on quality formation mechanism and processing of Mengding Huangya. Sichuan Agriculture University, Sichuan. (In Chinese)

Ma, S., Yu, S., Zheng, X., Wang, X., Bao, Q., Guo, X. (2013) Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* **98 (1)**: 750-753.

Ma, W., Tang, C.H., Yin, S.W., Yang, X.Q., Wang, Q., Liu, F., Wei, Z.H. (2012) Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Research International* **49**: 572-579.

Mabrouki, S., Omri, B., Abdouli H. (2015) Chemical, Functional and Nutritional Characteristics of raw, autoclaved and germinated fenugreek seeds. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology* **16 (1)**: 541-551.

Melton, D.L., Smith, B.G. (2001) Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 736-739.

Mihelj, T., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Cvrtila, I., & Tomašić, V. (2014). Effect of multiple extractions and water-ethanol ratio on the bioactive composition and antioxidant capacity of Yinzen tea. . In Proceedings of the 2014 International Conference on Food Properties. 24-26.

Muller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, B., Elst K., Sforza, S. (2016) Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry* **201**: 37-45.

Naidu, M.M., Shyamala, B., Naik, J.P., Sulochanamma, G., Srinivas, P. (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT – Food Science and Technology* **2**: 451–456

Oregon State University < <http://oregonstate.edu/foodsci/foodweb/its-wrap-0>>. Pristupljeno 10. travnja 2018.

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.

Petrović, V., Milković, M., Valdec, D. (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solventnim i UV bojilima. *Tehnički glasnik* **7**: 191-197.

Poverenov, E., Zaitsev, Y., Arnon, H., Granit, R., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Weinberg, T., Fallik, E. (2014) Effects of a composite chitosan–gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. *Postharvest Biology and Technology* **96**: 106-109.

Prandi, B., Baldassarre, S., Babbar, N., Bancalari, E., Vandezande, P., Hermans, D., Bruggeman, G., Gatti, M., Elst, K. (2018) Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp:

molecular characterization and potential prebiotic activity. *Food and Function* **9 (3)**: 1557-1569.

Rastall R.A., Gibson G.R., Gill H.S., Guarner F., Klaenhammer T.R., Pot B., Reid G., Rowland I.R., Sanders M.E. (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 145–152.

Reddy, N., Han, S., Zhao, Y., Yang, Y. (2013) Antimicrobial activity of cotton fabrics treated with curcumin. *Journal of Applied Polymer Science* **127**: 2698–2702.

Rejaili, M., Salehi, E.A. (2016) Properties of sugar beet pulp pectin: A systemic review. *International Journal of Pharm Tech Research* **9 (7)**: 364- 368.

Rodsamran, P., Sothornvit, R. (2018) Bioactive coconut protein concentrate films incorporated with antioxidant extract of mature coconut water. *Food Hydrocolloids* **79**: 243- 252.

Rubilar, J.F., Cruz, M.S., Silva, D. H., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C. (2013) Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering* **115**: 466- 474.

Siripatrawan, U., Harte, B. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* **24**: 770-775.

Sen, M., Shu Y., Xue-ling, Z., Xiao-xi, W., Qing, B., Xiao-ming, G. (2013) Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* **98**: 750-753.

Song, H.Y., Skin, Y.J., Song, K.B. (2012) Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering* **113**: 541-547.

Sricharoen P., Techawongstein S., Chantai S. (2015) Determination of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Activities in the Crude Extracts of Ten Varieties of Tomatoes. *AsiaPacific Journal of Science and Technology* **20 (1)**: 66 - 74.

Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., Nickerson, M. D. (2015) Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International* **76**: 31–38.

- Suliman, A.M.E., Ali, A.O., Hemavathy, J.(2000) Lipid content and fatty acid composition of fenugreek (*Trogonella foenumgraceum* L.) seeds grown in Sudan. *International Journal of Food Science and Technology* **43**: 380–382.
- Teng, Y., Li, D., Guruwaiah, P., Xu, N., Zhongwen, X. (2018) Dietary Supplement of Large Yellow Tea Ameliorates Metabolic Syndrome and Attenuates Hepatic Steatosis in db/db Mice. *Nutrients* **10(1): 75**, 1-17.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. (1997) Chemistry and uses of pectin-a review. *Food Science and Nutrition* **37**: 47-73.
- Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A.A., Poos,M. (2002) Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association* **102 (11)**: 1621-1630.
- U.S. Department of Health and Human Services 2012. National Institutes of Health Web site: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entre](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entre)>
- Wang, T., Wang, L., Wang, R., Chen, Z. (2016) Effects of freeze-milling on the physicochemical properties of rice protein isolates. *LWT - Food Science and Technology* **65**: 832-839.
- Wang, Y., Zhao, X., Qian, Y., Wang, R. (2013) In vitro antioxidative activity of yellow tea and its in vivo preventive effect on gastric injury. *Experimental and Therapeutic Medicine* **6(2)**: 423-426.
- Xu, J., Wang, M., Zhao, J., Wang, Y.-H., Tang, Q., & Khan, I. A. (2018). Yellow tea ( *Camellia sinensis* L . ), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits. *Food Research International* **107**: 567–577.
- Zhao, W. (2009) In vitro anticancer effect of yellow tea in HT - 29 human colon cancer cells. *Beijing Lianhe Daxue Xuebao* **23(3)**: 11-13.
- Zhao, W., Deng, Y. F., & Xie, L. Y. (2008) In vitro anticancer effect of yellow tea in MTT assay. *Journal of Chongqing College of Education* **21(6)**: 23-24.
- Zicari S., Zhang R., Kaffka S. (2019) Sugar Beet. Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products, 331-351.
- Żuk-Gołaszewska K., Wierzbowska J. 2017. Fenugreek: productivity, nutritional value and uses. *Journal of Elementology* **22(3)**: 1067-1080.

Izjava o izvornosti

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

---