

Utjecaj fenola ekstrahiranih iz kore mandarine mikrovalovima na kemijska i fizikalna svojstva pektinskih biofilmova

Orešković, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:176467>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivana Orešković

7083/BT

**UTJECAJ FENOLA EKSTRAHIRANIH IZ KORE MANDARINE
MIKROVALOVIMA NA KEMIJSKA I FIZIKALNA SVOJSTVA
PEKTINSKIH BIOFILMOVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj fenola ekstrahiranih iz kore mandarine mikrovalovima na kemijska i fizikalna svojstva pektinskih biofilmova

Ivana Orešković, 0058206739

Sažetak: S porastom problema zbrinjavanja otpada i razgradnje plastične ambalaže raste i interes današnjih istraživanja k upotrebi biorazgradivih materijala. Među njima jestivi biofilmovi s visokovrijednim funkcionalnim sastojcima izoliranim iz različitih nusproizvoda prehrambene industrije svakako zauzimaju značajno mjesto.

Sukladno današnjim trendovima u razvoju biorazgradivih materijala, i ovo istraživanje je pokazalo razvoj novih funkcionalnih pektinskih biofilmova s dodatkom ekstrakata kore mandarine. Njihova ugradnja u pektinske biofilme praćena je promjenama u kemijskim i fizikalnim svojstvima.

Rezultati su pokazali da biofilmovi s fenolnim ekstraktima kore mandarine pokazuju porast intenziteta boje, vlačne čvrstoće, te smanjenja modula elastičnosti u odnosu na biofilme bez ekstrakata. Time je pokazano da se ekstrakti kore mandarine mogu uspješno primijeniti za izradu ekoloških prihvatljivih funkcionalnih pektinskih biofilmova.

Ključne riječi: ekstrakt kore mandarine, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenoli, pektinski biofilmovi, karakterizacija biofilmova

Rad sadrži: 25 stranica, 9 slika, 2 tablice, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Datum obrane: 15. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

Influence of phenols extracted from tangerine peel on chemical and physical properties of pectin biofilms

Ivana Orešković, 0058206739

Abstract: With the increases of waste disposal problems and decomposition of plastic packaging, the interest of nowadays investigations for the use of biodegradable materials is growing. Among them, edible biofilms with high-value functional ingredients isolated from various by-products of the food industry certainly occupy a significant place.

In line with today's trends in the development of biodegradable materials, this research has also shown the development of new functional pectin biofilms with the addition of tangerine peel extracts. Their incorporation into pectin biofilms is accompanied by changes in chemical and physical properties.

The results showed that pectin biofilms with added phenolic extracts of tangerine peel have increased color intensity, tensile strength, but decreased the modulus of elasticity in comparison with biofilms without extracts. In this regard is showed that tangerine peel extracts could be successfully implement for production of environment friendly functional pectin biofilms.

Keywords: tangerine peel extract, microwave assisted extraction, phenols, pectin biofilms, characterisation of biofilms

Thesis contains: 25 pages, 9 pictures, 2 tables, 50 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Defence date: September 15th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kora mandarine	2
2.2. Fenoli	2
2.3. Pektin	3
2.4. Biofilmovi	4
2.5. Ekstrakcija	4
2.5.1. Ekstrakcija mikrovalovima	5
2.6. UV - VIS spektrofotometrija	6
2.7. Karakterizacija biofilmova	6
2.7.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	6
2.7.2. Određivanje boje	7
2.7.3. Određivanje teksture	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijal	9
3.2. Kemikalije	9
3.3. Pribor	9
3.4. Aparatura	10
3.5. Metode rada	10
3.5.1. Ekstrakcija fenola iz kore mandarine mikrovalovima	10
3.5.2. Priprema pektinskih biofilmova	11
3.5.3. Priprema pektinskih biofilmova s ekstraktom kore mandarine	11
3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	12
3.5.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola	12
3.5.4.2. Priprema standardnih otopina	13
3.5.4.3. Postupak određivanja ukupnih fenola	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktu kore mandarine i biofilmovima	15
4.2. Karakterizacija biofilmova	17
4.2.1. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom	17
4.2.2. Određivanje boje	18
4.2.3. Određivanje teksture	18

5. ZAKLJUČAK	20
6. POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

Proizvodnja plastike se u zadnjih 20-tak godina povećala za 25 puta dok se manje od 5 % reciklira (Sutherland i sur., 2010). Porastom svijesti o zbrinjavanju otpada raste i interes za nove biomaterijale koji su biorazgradivi. Tako se za izradu biorazgradivih filmova koriste različiti polisaharidi iz prirodnih izvora (Han i Song, 2020). Među njima, široku primjenu ima i pektin. Koristi se u proizvodnji hrane, a zbog formiranja gela i stabilizacijske sposobnosti (Piriyaarasarth i Sriamornsak, 2011) nalazi primjenu i pri izradi biorazgradivih jestivih biofilmova.

Osim plastike, u svijetu se sve više akumuliraju i različiti nusproizvodi nastali tijekom proizvodnje hrane. Njima pripada i kora mandarine. Danas se oko 30 % otpada mandarine koristi kao ljekovito bilje, a ostalih 70 % se odlaže u oceane što uzrokuje ekološke probleme (In Seong i sur., 2012). Međutim kora mandarine sadrži različite visoko vrijedne funkcionalne spojeve, a među njima treba istaknuti i fenole. Oni djeluju antialergijski, antimikrobno, protuupalno i antioksidacijski (Ya-Qin i sur., 2008). Zbog visokog sadržaja fenola i navedenih efekata ovaj prirodni antioksidans danas se nastoji što više iskoristiti. Fenoli iz kore mandarine mogu se izolirati različitim ekstrakcijskim metodama, a među njima i ekološki prihvatljivom ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima, koja u odnosu na konvencionalne metode smanjuje emisiju topline u atmosferu te koristi zelena otapala.

Zbog sve većeg interesa prehrambene industrije za zbrinjavanje nuspoizvoda i primjene biorazgradivih materijala, i u ovom radu je istražena mogućnost ugradnje ekstrakata kore mandarine u pektinske biofilmove kako bi im se poboljšala funkcionalna svojstva, te zadržala kvaliteta i sigurnost samog proizvoda. Stoga su u ovom radu:

- ekstrahirani fenoli iz kore mandarine pomoću mikrovalova,
- dobiveni ekstrakti ugrađeni u pektinske biofilmove, te
- opisana fizikalna i kemijska svojstva pektinskih biofilmova uz dodatak ekstrakta kore mandarine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kora mandarine

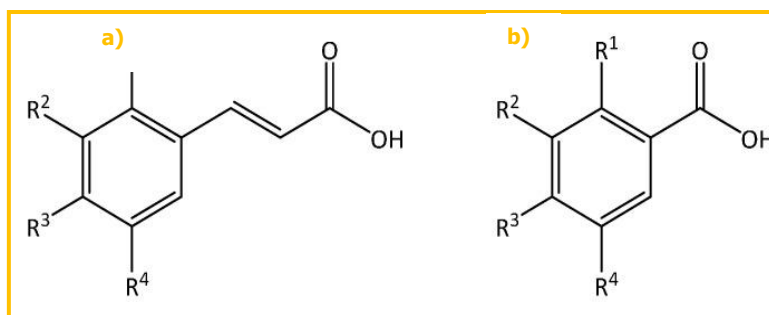
Mandarina, mandarinka je zimzelena agrum koji pripada rodu *Citrus*. Za njen rast pogodna je suptropska klima, i u odnosu na druge citrusne otpornija je na hladnoću. Plod je građen od mesnatog dijela ili endokarpa i kore ili perikarpa. Sadrži vitamin C, vitamine B skupine, minerale, vlakna, polisaharide i polifenole (Ferenčić i sur., 2016).

Prema Danielski i sur. (2008) glavne komponente eteričnog ulja kore mandarine čine limonen, i drugi terpeni, poput γ -terpinena. Oksidacijske komponente predstavljaju linalol, dekanal i citral. Ostale važne sastojke ulja čine seskviterpeni, voskovi i flavonoidi.

Kora mandarine smatra se važnim izvorom u proizvodnji bioetanola (Boluda-Aguilar i sur., 2010) i flavonoidnih glikozida koji se koriste u kozmetičkoj industriji (Bae i sur., 2012). Novi trendovi u biotehnologiji pokazuju primjenu ekstrakata kore mandarine u sintezi srebrnih nanočestica. Do njihova stvaranja dolazi nakon zagrijavanja (30 °C) i miješanja otopine srebrnog nitrata s ekstraktom kore mandarine uz redukciju srebrnih iona (Basavegowda i Lee, 2013).

2.2. Fenoli

Fenolne kiseline uz tanine, lignane, flavonoide i stilbene čine skupinu polifenola (D'Archivio i sur., 2007). Fenoli su sekundarni biljni metaboliti čiju osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koju je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Osim u kori mandarine, fenoli su zastupljeni i u drugim biljkama, njihovim sjemenkama, kori, pokožici i mezokarpu. U biljkama se nalaze u obliku derivata benzojeve kiseline i cimetine kiseline (Slika 1) (Kaushik i sur., 2015), no pojavljuju se i u formi slobodnih kiselina, estera i glikozida (Gruz i sur., 2008). Pripisuje im se sposobnost sparivanja elektrona slobodnog radikala, antioksidacijska aktivnost, kelatno vezanje iona metala i inhibiranje enzima oksidaza.



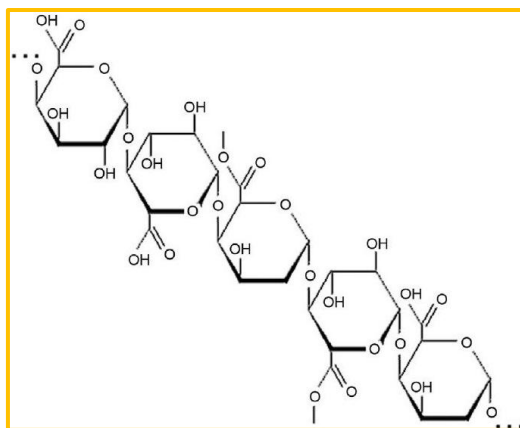
Slika 1. Strukturna formula cimetne (a) i benzojeve kiseline (b) (Kaushik i sur., 2015).

2.3. Pektin

Pektin je heteropolisaharid koji sadrži najmanje 65 % jedinica galakturonske kiseline (Galowska i sur., 2013), a čini dio stanične stijenke primarnih stanica i središnje lamele viših biljaka. Iako su na tržištu dostupni pektini izolirani iz kore citrusa, jabuka ili njihovog soka, današnji trendovi u izolaciji pektina pokazuju i druge izvore njegove proizvodnje, poput kore rajčice, nusproizvoda nastalog preradom rajčice (Ninčević Grassino i sur., 2016).

Osnovni lanac pektina (Slika 2) (Shendge i sur., 2015) nastaje stvaranjem α -1,4-glikozidne veze između piranoznih prstena D-galakturonske kiseline, osnovne strukturne jedinice svih pektinskih polisaharida. Oni su podijeljeni u 3 skupine, a čine ih homogalakturonan, ramnogalakturonan- I i II (Mikonnen i sur., 2007). Homogalakturonan ima modificiran glavni lanac pektina esterifikacijom metilinih ili acetilnih skupina. Demetilesterificirani homogalakturonan lako stvara vezu s kalcijevim ionima tvoreći poželjnu strukturu u izradi pektinskih gelova (Sénéchal i sur., 2014).

Pektin ima široku primjenu u prehrambenoj industriji kao sredstvo za emulgiranje i geliranje (Dranca i Oroian, 2018), a prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA, 2013) je prepoznat kao bezopasan i siguran za ljudsko zdravlje (*engl.* Generally Recognized As Safe, GRAS status). Također, koristi se za proizvodnju jestivih biofilmova, biorazgradivih folija, papira, ljepila, plastifikatora i biomedicinskih implantantnih materijala (Mohnen, 2008).



Slika 2. Strukturna formula glavnog lanca pektina (Shendge i sur., 2014).

2.4. Biofilmovi

Jestivi filmovi su materijali za pakiranje hrane, čiju strukturu čine proteini, lipidi ili polisaharidi poput pektina, kitozana, celuloze i škroba (Jolie, 2010). Primjenjuju se kao ambalaža zbog zaštite proizvoda od okoliša, produljenja roka trajanja uz održavanje kvalitete i svježine proizvoda (Vermeiren i sur., 1999).

Pektin se koristi za izradu jestivih biofilmova jer je zbog djelomične kristalne strukture pogodan za integraciju fitokemikalija, a u odnosu na druge materijale je jeftiniji (Nisar i sur., 2019.) Zbog umjerene mehaničke čvrstoće pektinu je potrebno dodati sredstva za umrežavanje i plastifikatore. Jedan od najčešće korištenih plastifikatora u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji je glicerol, alkohol s tri hidroksilne skupine, male molekulske mase. Zauzima intermolekularni prostor između lanaca pektina, smanjujući polimer-polimer interakcije, te na taj način povećava pokretnost lanca (Constanza i sur., 2019). Sredstva za umrežavanje kao što je kalcijev klorid dodaju se pektinu kako bi mu se smanjila topljivost u vodi.

2.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak izdvajanja i koncentriranja spojeva na osnovi njihovog otapanja u prikladnom otapalu. Ekstrakcija se provodi u tri stupnja, u prvom stupnju su uzorak i otapalo u kontaktu, zatim se odjeljuju faze, a u konačnici odjeljuje se i otapalo iz svake faze (Zhang i sur., 2018).

Metode ekstrakcije se dijele na konvencionalne i nekonvencionalne (Zhang i sur., 2018). U konvencionalne metode ubrajaju se: Sohlet ekstrakcija, maceracija, destilacija i refluksiranje (Azmir i sur., 2013). Nekonvencionalne metode ekstrakcije su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, superkričnim fluidima, ultrazvukom, hladnom plazmom, visokim tlakom, pulsirajućim električnim poljem i ekstrakcija uz pomoć enzima (Bursać Kovačević i sur., 2018).

2.5.1. Ekstrakcija mikrovalovima

Ekstrakcija mikrovalovima (*engl.* microwave-assisted extraction, MAE) je metoda u kojoj se mikrovalna energija koristi za zagrijavanje polarnog otapala koje je u kontaktu sa čvrstim uzorkom (Pérez-Serradilla i Castro, 2011). Zbog jednostavne primjene, brzine i mogućnosti ekstrakcije pri nižim temperaturama pogodna je metoda za ekstrakciju termolabilnih spojeva iz biljnih materijala kao što su fenoli.

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja u rasponu frekvencije od 1 do 300 GHz. Mikrovalovi se odbijaju se od metala, prolaze kroz papir, staklo i plastiku te u hrani zagrijavaju vodu (Blekić i sur., 2011). Ekstrakcija mikrovalovima se provodi polarnim otapalom koje apsorbira energiju mikrovalova zbog trajnog dipolnog momenta. Generirana toplina reagira s molekulama otapala uzrokujući ionsku kondukciju i rotaciju dipola (Wang i sur., 2016; Marić i sur., 2018). Do povišenja temperature otapala dolazi uslijed rotacije dipola koji se nastoji uskladiti s električnim poljem. Ukoliko se provodi ekstrakcija s nepolarnim otapalom potrebno je dodati malu količinu polarnog otapala kako bi se oslobođena energija zagrijavanjem polarnog otapala prenijela na nepolarno otapalo (Zhou i Liu, 2006; Ibrahim i Zaini, 2017).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima najčešće se koristi u ekstrakciji listova, sjemenki ili kore voća i povrća u kojima je voda vezana u stanicama. Ovisno o frekvenciji mikrovalova molekule vode se rotiraju i stvaraju pritisak na stanične stijenke što uzrokuje lizu stanice. Posljedično se oslobađaju ulja, ekstrakti biljnog materijala sa molekulama vode. Za uspješnu ekstrakciju mikrovalovima potrebno je odabrati optimalne parametre a čine ih: snaga mikrovalova, temperatura i vrijeme, te otapalo. Osim što je poželjno da otapalo ima visoku dielektričnu konstantu, dodatnu važnu prednost kod izbora otapala za MAE daje se i primjeni tzv. zelenih biootapala. Oni se mogu proizvesti iz lako dostupnih izvora, poput ostataka kore, banane, jabuke, manga i citrusa (Hossain i sur.,2008). Toj skupini otapala svakako pripada etanol koji se može proizvesti alkoholnim vrenjem spomenutih nusproizvoda.

2.6. UV - VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija je instrumentalna, analitička metoda koja služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Bazira se na interakciji elektromagnetskog zračenja sa uzorkom na valnim duljinama od 200-400 nm za ultraljubičasto (UV) područje i 400-800 nm za vidljivo (VIS) područje. Mjerena tvar emitira ili apsorbira određenu količinu zračenja koja se mjeri spektrofotometrom i interpretira. Spektrofotometar skenira UV-VIS spektar i na detektoru registrira valnu duljinu pri kojoj se pojavljuje maksimalna apsorbanacija. Ako analiti ne mogu apsorbirati UV ili VIS zračenje potrebno ih je dodatkom kromogenih reagensa prevesti u one oblike koji apsorbiraju u UV-VIS području. Kvantitativno određivanje analita se temelji na Lambert-Beerovom zakonu (1):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b = \log(I_0/I) \quad (1)$$

gdje A označava apsorbanaciju, ε molarni apsorpcijski koeficijent, c koncentraciju, b duljinu puta svjetlosti kroz uzorak, odnosno debljinu kivete, I_0 intenzitet ulazne zrake, a I intenzitet zrake nakon prolaska kroz analit. Iz formule slijedi da je apsorbanacija pri valnoj duljini mjerenja (λ) proporcionalna koncentraciji analita. Zakon vrijedi za razrijeđene otopine u kojima nema interakcija među tvarima. Metoda je pogodna za izvođenje mjerenja pri vrlo niskim koncentracijama analita, a da pri tome uzorak ostaje sačuvan.

2.7. Karakterizacija biofilmova

2.7.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje organskih spojeva na osnovi vibracija grupe atoma koje uzrokuju pojavu karakterističnih vrpca u infracrvenom spektru specifične frekvencije (Vlachos i sur., 2006).

Infracrveno područje spektra odgovara frekvencijama nižim od vidljivog spektra do najviše mikrovalne i radarske frekvencije, tj. valnih duljina od $8 \cdot 10^{-5}$ do $1 \cdot 10^{-2}$ cm (Wade, 2013). Infracrveni fotoni nemaju dovoljnu energiju da izazovu elektronske prijelaze, ali uzrokuju vibracije skupine atoma s obzirom na veze koje ih spajaju. Vibracije veza koje imaju

dipolni moment rezultiraju apsorpcijom infracrvenog zračenja, dok simetrične veze ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje. Kada je električno polje u istom usmjerenju kao i dipolni moment manja je udaljenost između parcijalnih naboja i dipolni moment opada, a kada su u suprotnom smjeru povećava se udaljenost i raste dipolni moment.

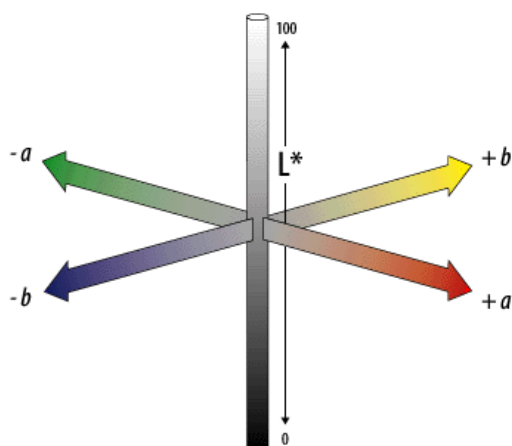
Infracrveni spektar je graf ovisnosti postotka transmitancije i valnog broja. Sastoji se od dva područja: područje funkcijskih skupina koje obuhvaća regiju od 4000 do 1400 cm^{-1} i područje otiska prsta od 1400 do 600 cm^{-1} . U području funkcijskih skupina većina funkcionalnih grupa organskih spojeva apsorpira zračenje, a u području otiska prsta svaki spoj pokazuje jedinstveni oblik apsorpcijskih vrsti.

FT-IR-spektrometar (*engl.* Fourier Transform Infrared Spectrometer) je najčešće korišten infracrveni spektrometar jer u odnosu na disperzijske infracrvene spektrofotometre ima veću osjetljivost, mjeri sve frekvencije istodobno u kratkom vremenskom intervalu, koristi manje energije iz izvora, a za analizu je potrebna je mala količina uzorka (Wade, 2013). Pomoću algoritma Fourierovih transformacija frekvencije koje su iz interferograma prošle kroz uzorak na detektor pretvaraju se iz vremenske domene u infracrveni spektar frekvencijske domene.

2.7.2. Određivanje boje

Boja je važno svojstvo proizvoda i za proizvođača i potrošača. Intenzitet boje može se odrediti pomoću kolorimetara, uređaja namijenjena za apsorpcijska i refleksiona mjerenja. Prema Escuredo i sur. (2019) CIELab sustav boja (Slika 3) koji se preporuča za mjerenja u prehrambenoj industriji pokriva čitav vidljivi spektar ljudskog oka. Boju možemo prikazati točkom u trodimenzionalnom prostoru i jednoznačno odrediti trima koordinatama, dvije kromatske a^* i b^* osi, te akromatskom L^* osi koja predstavlja svjetlinu. Kromatska a^* os ima orijentaciju $+a^*$ (crveno) $-a^*$ (zeleno), dok b^* os ima orijentaciju $+b^*$ (žuto) i $-b^*$ (plavo). Ukupna razlika obojenosti (ΔE) se izračunava iz svih triju dimenzija boje u odnosu prema standardu (2) (Špalj, 2020):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (2)$$



Slika 3. CIELab sustav boja (Petrović i sur., 2013).

2.7.3. Određivanje teksture

Tekstura je glavni parametar kvalitete u prehrambenoj industriji kako bi proizvodi bili organoleptički prihvatljivi potrošaču. Iako nisu još razvijeni mehanički testovi koji mogu prepoznati kombinaciju osjetilnih podražaja koji kod ljudi stvaraju percepciju teksture, pokušava se pridonijeti instrumentalnom analizom teksture, odnosno mjerenje sile i deformacije koje odgovaraju zagrizu pri konzumaciji na prihvaćanje proizvoda od strane potrošača (Karlović i sur., 2009).

Mehaničke karakteristike teksture dijele se u pet osnovnih parametara: a) tvrdoća, definirana kao sila potrebna za postizanje određene deformacije, b) kohezivnost, snaga unutarnjih veza koje čine tijelo produkta, c) viskoznost, brzinu protoka fluida po jedinici sile, d) elastičnost, brzina kod koje se deformirano tijelo vraća u početno stanje nakon uklanjanja sile deformacije i e) adhezivnost (Nishinari i Fang, 2018).

Mehaničke metode mjere funkciju sile, deformacije u ovisnosti o vremenu. Kada se materijal podvrgne vanjskoj sili mijenja svoj oblik i položaj. Kolika će biti ta promjena ovisi o unutarnjim svojstvima materijala. Ukoliko se biljni ili prehrambeni materijal nakon djelovanja sile deformacije vraća u prvobitan oblik onda je viskoelastičan, a ako nakon djelovanja sile zadrži deformirani oblik definira se kao viskoplastičan materijal (Lu i sur., 2004.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Kora mandarine (Trogir, Hrvatska), oguljena, usitnjena ručnim blenderom i skladištena u zamrzivaču do upotrebe.

3.2. Kemikalije

- Etanol 96 % (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu (FC) reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Glicerol (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Pektin (Sigma aldrich, St. Louis, USA)

3.3. Pribor

- Automatska pipeta 100 - 1000 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Boce za čuvanje otopina
- Cjedilo
- Filter papir
- Gaza
- Graduirane pipete od 1, 2 i 10 mL
- Laboratorijske čaše od 5 i 150 mL
- Magneti
- Menzure od 100 i 200 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25, 50 i 100 mL
- Petrijeve zdjelice s poklopcem
- Pinceta
- Propipeta
- Skalpel
- Staklene kapalice

- Stakleni lijevak
- Stakleni štapići
- Tikvice s okruglim dnom od 250 i 500 mL
- Žličice

3.4. Aparatura

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Magnetna miješalica (IKA, RH Basic 2, Boutersem, Belgija)
- Magnetna miješalica (MM 510, Tehnica - Želeniki, Bosna i Hercegovina)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, Bergamo, Italija)
- Ručna miješalica
- UV/Vis spektrofotometar (Perkin - Elmer, Massachusetts, USA)

3.5. Metode rada

U ovom radu su:

- ekstrahirani fenoli iz uzoraka kore mandarine pomoću mikrovalova
- pripremljeni pektinski biofilmovi sa i bez dodatka fenolnih ekstrakata kore mandarine metodom lijevanja (*engl.* casting method)
- određeni ukupni fenoli u polaznom ekstraktu kore mandarine i u biofilmovima UV/Vis spektrofotometrijom

3.5.1. Ekstrakcija fenola iz kore mandarine mikrovalovima

Točno 50 grama usitnjenje kore mandarine izvagano je na analitičkoj vagi i preneseno u tikvicu s okruglim dnom od 500 mL. Nakon dodatka 200 mL 96 % etanola uzorci se ekstrahiraju u mikrovalnom reaktoru pri temperaturi 50 °C, snagom 600 W, tijekom 11 minuta. Ekstrahirani uzorci se filtriraju (filter papir i stakleni lijevak), a zatim se dobiveni filtrat upari do suhog u rotacionom vakuum uparivaču. Upareni filtrat se otopi u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL, a zatim se pohrani u hladnjaku do analize i pripreme biofilмова. Maseni udio uparenog ostatka otopljenog u vodi iznosio je 0,8 % ($m V^{-1}$).

Postupkom filtracije zaostala biomasa kore mandarine (Slika 4) se osuši na sobnoj temperaturi i još jednom ekstrahira pomoću mikrovalova primjenom identičnih ekstrakcijskih

parametara kao i kod prve ekstrakcije. Maseni udio uparenog ostatka otopljenog u vodi nakon druge ekstrakcije iznosio je 0,1 % ($m V^{-1}$).



Slika 4. Kora mandarine nakon prve ekstrakcije¹.

3.5.2. Priprema pektinskih biofilmova

Za pripremu 2 % pektinskih biofilmova odvažuje se na analitičkoj vagi 1,0000 g pektina, otopi u 50 mL deionizirane vode, te miješa na magnetnoj mješalici oko 2 sata. Potom se otopljenom pektinu doda 0,02 g kalcijevog klorida i 0,5 mL glicerola, te nastavi miješati 2-3 minute uz povišenu temperaturu (60 °C). Ovako priređena homogena otopina izlije se u Petrijeve zdjelice i suši na sobnoj temperaturi.

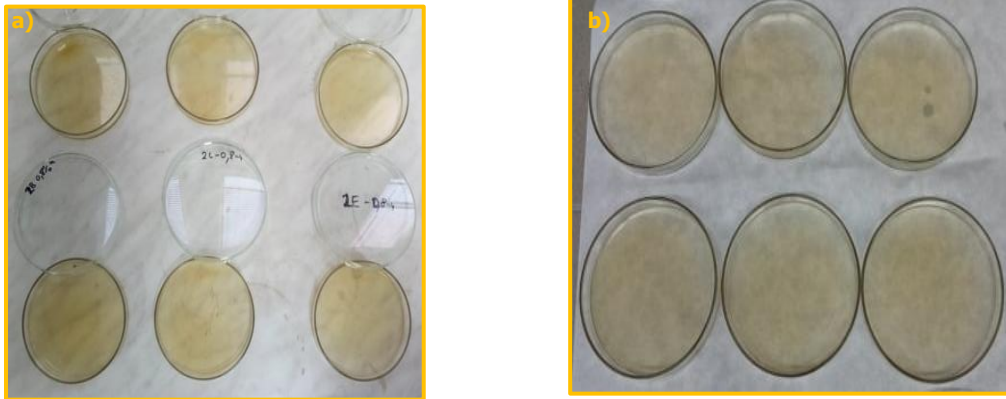
3.5.3. Priprema pektinskih biofilmova s ekstraktom kore mandarine

Postupak pripreme pektinskih biofilmova s dodatkom ekstrakta kore mandarine (Slika 5) je identičan postupku pripreme biofilmova bez dodatka ekstrakta (poglavlje 3.5.2.), no umjesto 50 mL deionizirane vode korišteno je 50 mL razrijeđenog ekstrakta kore mandarine (Ekstrakt 1 i 2).

Za pripremu razrijeđenog ekstrakta kore mandarine 1 otpipetirano je 4,7 mL alikvota 0,8 % ekstrakta kore mandarine dobivenog nakon prve ekstrakcije (poglavlje 3.5.1.) i nadopunjeno deioniziranom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL.

¹ Slika nastala u Laboratoriju za analitičku kemiju

Za pripremu razrijeđenog ekstrakta kore mandarine 2 otpipetirano je 10 mL alikvota 0,1 % ekstrakta kore mandarine (poglavlje 3.5.1.) i razrijeđeno deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 50 mL.



Slika 5. Pektinski biofilmovi s ekstraktima kore mandarine: ekstrakt 1 (a) i 2 (b).¹

3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

3.5.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Priprema Folin-Ciocalteu (FC) reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$): Otpipetira se 2,5 mL FC reagensa ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- Priprema natrijevog karbonata ($w = 20 \text{ \%}$, $w V^{-1}$): 200 g natrijevog karbonata se otopi u 800 g ključale deionizirane vode i nakon hlađenja se doda nekoliko kristalića natrijevog karbonata. Nakon 24 sata sadržaj se profiltrira.

3.5.4.2. Priprema standardnih otopina

Za izradu baždarnog dijagrama i određivanje nepoznatih koncentracija ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima kore mandarine pripremljene su pojedinačne standardne otopine galne kiseline (Slika 6) masenih koncentracija od 30, 50, 100 i 130 mg L⁻¹. U tu svrhu pripremljena je ishodna standardna otopina galne kiseline vaganjem 0,5 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon otapanja odvagane mase dodatkom 10 mL etanola odmjerne tikvica je nadopunjena deioniziranom vodom. Zatim je točno 0,2; 0,6; 1,0; 2,0 i ishodne otopine galne kiseline otpipetirano u odmjerne tikvice od 100 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline.

3.5.4.3. Postupak određivanja ukupnih fenola

- Postupak određivanja ukupnih fenola za izradu baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama otpipetiran je 1 mL pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline u odmjerne tikvice od 25 mL. Zatim se doda 10 mL deionizirane vode i 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Nakon 5 minuta doda se 3,75 mL 20 % otopine natrijevog karbonata, te se odmjerne tikvica nadopuni deioniziranom vodom. Za pripremu slijepe probe postupak je isti, no umjesto 1 mL standarda dodaje se 1 mL deionizirane vode. Priređene tikvice (Slika 6) čuvaju se na tamnom mjestu 2 sata na sobnoj temperaturi, te im se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 760 nm.

- Postupak određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine

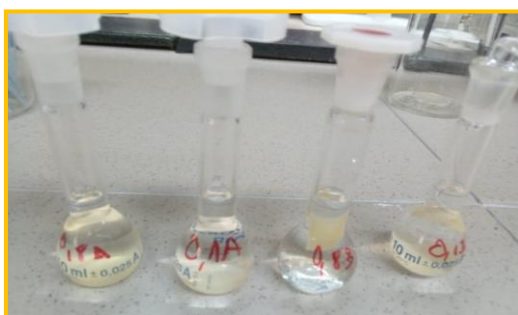
Za određivanje fenola u 0,8 % ekstraktu kore mandarine otpipetirano je 2,5 mL alikvota polaznog ekstrakta dobivenog prvom ekstrakcijom u odmjernu tikvicu od 25 mL. Nakon što je tikvica nadopunjena deioniziranom vodom do oznake, razrijeđenom alikvotu od 0,4 mL dodani su isti volumeni otopina kao i kod prethodno opisanog postupka izrade baždarnog dijagrama.



Slika 6. Priprema standardnih otopina za određivanje ukupnih fenola.¹

- Postupak određivanja ukupnih fenola u pektinskim biofilmovima s ekstraktom kore mandarine

50 mg pektinskog biofilma s ekstraktom kore mandarine (1 i 2) je odvagano na analitičkoj vagi. Pomoću pincete se prenese odvagana masa u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake (Slika 7). Potom se 1 mL alikvota otpipetira u odmjernu tikvicu od 25 mL, doda 2 mL deionizirane vode i 200 μ L FC reagensa. Nakon 5 minuta doda se 1 mL 20 % natrijevog karbonata. Ovako priređene otopine čuvaju se 2 sata na tamnom mjestu, na sobnoj temperaturi, a zatim im se izmjeri apsorbancija na 760 nm.



Slika 7. Otopine pektinskih biofilmova s ekstraktom kore mandarine.¹

4. REZULTATI I RASPRAVA

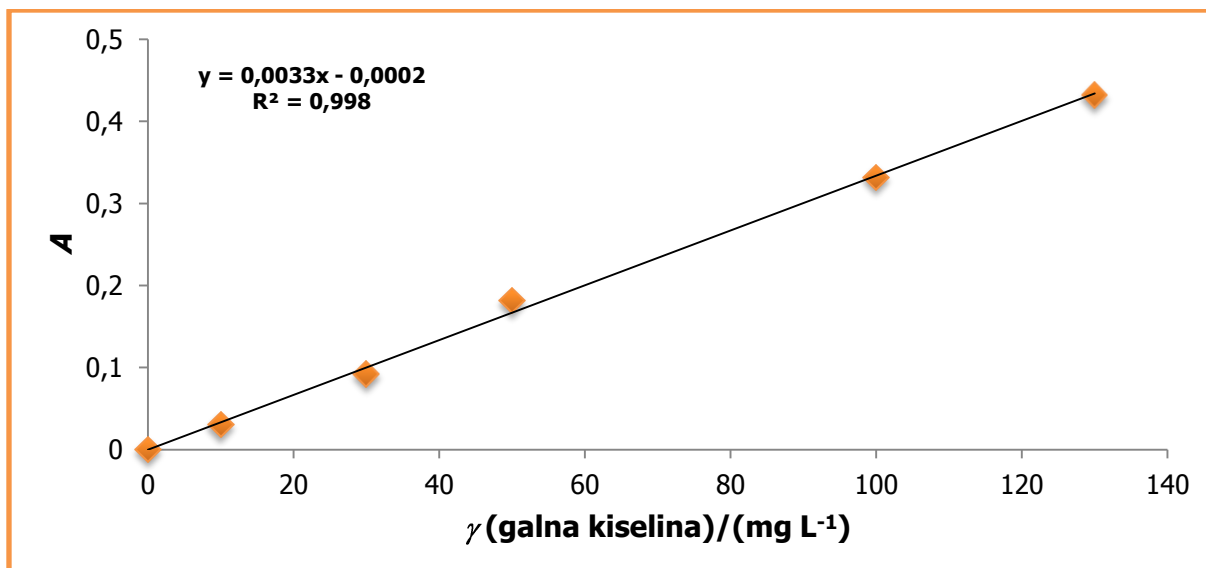
U ovom radu su provedene dvije ekstrakcije fenola iz kore mandarine pomoću mikrovalova, a dobiveni ekstrakti su ugrađeni u 2 % pektinske biofilmove. Utjecaj ugradnje ekstrakata u biofilmove uspoređen je s onima bez ekstrakata.

4.1. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktu kore mandarine i biofilmovima

U Tablici 1 su prikazane izmjerene vrijednosti apsorbancija s pripadajućim masenim koncentracijama pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline potrebnim za konstruiranje baždarnog dijagrama (Slika 8). Iz dobivene jednadžbe pravca ($y = 0,0033x - 0,0002$) su izračunate masene koncentracije ukupnih fenola u polaznom ekstraktu kore mandarine te biofilmovima s dodatkom ekstrakta (1 i 2). Zatim su dobivene vrijednosti masenih koncentracija izražene u mg galne kiseline po g kore mandarine.

Tablica 1. Vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline.

$\gamma(\text{galna kiselina})/(\text{mg L}^{-1})$	A_1	A_2	$\bar{A} \pm SD$
0	0,000	0,000	0,000 \pm 0,000
10	0,030	0,031	0,031 \pm 0,001
30	0,091	0,093	0,092 \pm 0,001
50	0,182	0,181	0,182 \pm 0,001
100	0,332	0,331	0,332 \pm 0,001
130	0,431	0,433	0,432 \pm 0,001



Slika 8. Baždarni dijagram standardnih otopina galne kiseline.

Početni ekstrakt kore mandarine (0,8 %) sadrži 97,05 mg g⁻¹ ukupnih fenola. U usporedbi s rezultatima Li i sur. (2006) nakon ekstrakcije kore limuna s 95 % etanolom dobiveno je 0,85 mg g⁻¹ ukupnih fenola. S obzirom na dobivene razlike može se zaključiti da ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju osigurava veći prinos fenola u vremenu od svega 11 minuta. Efikasnost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima potvrđena je i u radu Špalj (2020) gdje je najviša izmjerena vrijednost ukupnih fenola u ekstraktima otpada kave (talog nastao nakon pripreve napitka kave) iznosila 12,95 mg g⁻¹, pri temperaturi od 50 °C, uz 50 % etanol i vrijeme od 5 minuta. Istom ekstrakcijskom metodom u kori mandarine je nađeno znatno više ukupnih fenola, što upućuje na zaključak da vrsta sirovine kao i odabrani ekstrakcijski uvjeti utječu na učinkovitost ekstrakcije fenola.

U biofilmovima priređenim s ekstraktom 1 udio ukupnih fenola za dva paralelna određivanja iznosi 0,099, odnosno 0,101 mg g⁻¹ (Tablica 2). Kod biofilmova priređenih s ekstraktom 2 dobivene vrijednosti su znatno niže i iznose 0,053 i 0,051 mg g⁻¹ (Tablica 2).

Istraživanje Go i sur. (2020) je pokazalo da s povećanjem udjela fenola u pektinskim biofilmovima raste i antioksidacijski efekt, pa se može pretpostaviti da će i u biofilmovima dobivenim i u ovom radu nakon prve ekstrakcije biti veća antioksidacijska aktivnost u odnosu na one dobivene drugom ekstrakcijom.

Tablica 2. Vrijednosti ukupnih fenola u pektinskim biofilmovima s dodatkom ekstrakta kore mandarine (1 i 2).

Biofilmovi	A_1	A_2	$\bar{A} \pm SD$	$w(UF)/(mg\ g^{-1})$
Ekstrakt 1	0,066	0,067	$0,067 \pm 0,001$	$0,099 \pm 0,010$
	0,069	0,062	$0,066 \pm 0,005$	$0,101 \pm 0,001$
Ekstrakt 2	0,034	0,036	$0,035 \pm 0,001$	$0,053 \pm 0,003$
	0,031	0,036	$0,034 \pm 0,004$	$0,051 \pm 0,007$

Ekstrakt 1 = razrijeđeni ekstrakt nakon prve ekstrakcije (0,8 %)

Ekstrakt 2 = razrijeđeni ekstrakt nakon druge ekstrakcije (0,1 %)

4.2. Karakterizacija biofilmova

4.2.1. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom

Prema istraživanju Nisar i sur. (2018) spektri dobiveni infracrvenom spektrofotometrijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) pokazali su da signali (pikovi) karakteristični za pektin jesu: 2993 cm^{-1} , a odnose se na vibracije C-H metilnih skupina u polimernim lancima, 1760 do 1730 cm^{-1} odgovaraju C=O i C-O grupama, te 1100 do 1040 cm^{-1} odgovaraju -C-O-C vibraciji istezanja. Široko područje apsorpcije između 3400 i 2500 cm^{-1} odnosi se na vibracije istezanja zbog intermolekularnih interakcija -O-H- veze između monomera pektina, no mogu se i pripisati polifenolima (Nisar i sur., 2018).

Iako u ovom radu nije provedena karakterizacija biofilmova FTIR-om istraživanje Hasanbegović (2018) je pokazalo da se pektinski biofilmovi pripremljeni bez i uz dodatak ekstrakta kore mandarine razlikuju prema intenzitetu apsorpcijskih vrpca te rastu proporcionalno masenim udjelima ukupnih fenola iz ekstrakata. S obzirom na navedeno istraživanje može se pretpostaviti da će i kod 2 % pektinskih biofilmova s 0,8 % ekstraktom

kore mandarine biti intenzivnije vrpce nego kod 2 % biofilmova s nižim udjelom ekstrakta (0,1 %).

4.2.2. Određivanje boje

Istraživanje Ninčević Grassino i sur. (2020) je pokazalo da komercijalni jabučni pektin ima sljedeće vrijednosti parametara boje: $L = 69,55$, $a = 6,52$, $b = 19,13$, $C = 20,21$. Upotrebom istog komercijalnog pektina pri izradi 1 i 2 % pektinskih biofilmova pokazano je da su 2 % pektinski filmovi u odnosu na 1 % neznatno tamniji (Špalj, 2020). Također, istraživanje Špalj (2020) je pokazalo izraženiju žutu komponentu pektinskih biofilmovima s dodatkom ekstrakta otpada kave, te da je promjena boje povezana s udjelom fenola u ekstraktu.

Stoga se može se pretpostaviti da će udio ukupnih fenola, kao i pojedinačnih fenolnih spojeva u pektinskim biofilmovima s ekstraktom kore mandarine utjecati na ukupnu promjenu boje. Prema slikama prikazanim u poglavlju 3.5.3. veći intenzitet boje bi trebali očekivati kod biofilmova dobivenih prvom ekstrakcijom.

4.2.3. Određivanje teksture

Prema istraživanju Passini Cabello i sur. (2015) na mehanička svojstva pektinskih biofilmova utječe stupanj umreženosti koji se postiže dodavanjem različitih koncentracija plastifikatora i pektina.

Istraživanje Špalj (2020) je pokazalo kako dodatkom glicerola većeg masenog udjela, vrijednosti vlačne čvrstoće rastu u odnosu na biofilme s manjim udjelom glicerola. Prema Špalj (2020) dodatak ekstrakta taloga kave u biofilme s 2 % pektinom dovodi i do povećanja vlačne čvrstoće. Dakle, može se pretpostaviti da će vlačna čvrstoća rasti i kod 2 % pektinskim biofilmovima s 0,8 % ekstraktom kore mandarine u odnosu na one s 0,1 % ekstraktom. Smatra se da je mogući uzrok promjene vlačne čvrstoće biofilmova povezan s fenolnom komponentom ekstrakata jer one stupaju u interakciju sa pektinom i na taj način doprinose dodatnoj umreženosti, drugim riječima djeluju poput plastifikatora.

Osim vlačne čvrstoće udio ekstrakata utječe i modul elastičnosti. Dodatkom ekstrakta biljke yuzu (citrus, sličan limunu) u pektinske biofilme smanjuje se krutost i povećava sposobnost njihova istezanja jer molekule šećera prisutne u ekstraktu djeluju kao plastifikatori slabeći interakcije između polimera povećavajući slobodni volumen (Go i sur., 2020). Prema istraživanju Špalj (2020) porastom udjela fenolnih ekstrakata taloga kave

zmanjuje se modul elastičnosti i do 3,6 puta u odnosu na kontrolni film (pektin bez ekstrakta). Dakle može se pretpostaviti da će 2 % pektinski biofilmovi s 0,8 % ekstraktom kore mandarine imati smanjen modul elastičnosti.

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom je pokazano da se ekstrakti kore mandarine dobiveni ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima mogu uspješno primjeniti pri izradi pektinskih biofilmova kao novih biorazgradivih materijala. Na temelju dobivenog mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Upotrebom 95 % etanola uz vrijeme od 11 minuta, na temperaturi od 50 °C, te snazi mikrovalova od 600 W ekstrahirani su fenoli iz kore mandarine.
2. Ekstrakti dobiveni dvostupanjskom ekstrakcijom pomoću mikrovalova upotrebljeni su kod pripreme pektinskih biofilmova.
3. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu kore mandarine te pektinskim biofilmovima pripremljenim uz dodatak ekstrakta 1 i 2 iznosi 97,05 mg g⁻¹, 0,099 i 0,101 mg g⁻¹, te 0,053 i 0,051 mg g⁻¹.
4. Budući da porast intenziteta apsorpcijskih vrpca u istraživanjima potvrđuje ugradnju fenola u pektinskim filmovima, može se pretpostaviti da će FTIR spektroskopija potvrditi ugradnju i fenolnih ekstrakata kore mandarine u iste. Pri tome bi intenzitet apsorpcijskih vrpca trebao rasti s povećanjem sadržaja ukupnih fenola u biofilmovima.
5. Budući da je u istraživanjima utvrđeno da 2 % pektinski biofilmovi bez i uz dodatak fenolnih ekstrakata nusproizvoda pokazuju veću obojenost, čvrstoću i fleksibilnost u odnosu na 1 % pektinske biofilme, može se pretpostaviti da će 2 % pektinski biofilmovi s 0,8 % ekstraktom kore mandarine također pokazivati ista svojstva.

6. POPIS LITERATURE

1. Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426 - 436.
2. Bae, J. T., Ko, H. J., Kim, G. B., Pyo, H. B., Lee, G. S. (2012) Protective Effects of Fermented Citrus Unshiu Peel Extract against Ultraviolet-A-induced Photoageing in Human Dermal Fibroblasts. *Phytotherapy Research* **26**: 1851 - 1856.
3. Basavegowda N. i Rok Lee Y. (2013) Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (Citrus unshiu) peel extract: A novel approach towards waste utilization. *Materials Letters* **109**: 31 - 33.
4. Blekić M., Jambrak Režek A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3**: 32 - 47.
5. Boluda-Aguilar M., García-Vidal L., González-Castañeda F. P., López-Gómez (2010) A Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology* **101**: 3506 - 3513.
6. Bursać Kovačević D., Maras M., Barba F. J., Granato D., Roohinejad S., Mallikarjunan K., Montesano D., Lorenzo J. M., Putnik P. (2018) Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia rebaudiana Bertoni leaves: A review. *Food Chemistry* **268**: 513 - 521.
7. Costanza V., Bonanomi L., Moscato G., Wang L., Choi Y. S., Daraio C. (2019) Effect of glycerol on the mechanical and temperature-sensing properties of pectin films. *Applied Physics Letters* **115**: 1 - 4 .
8. Danielski L., Brunner G., Schwänke C., Zetzl C., Hense H., Donoso J. P. M. (2008) Deterpenation of mandarin (*Citrus reticulata*) peel oils by means of countercurrent multistage extraction and adsorption/desorption with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* **44**: 315 - 324.
9. D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell Istituto Superiore di Sanità* **43**: 348 - 361.
10. Dranca F., Oroian M. (2018) Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International* **113**: 327 - 350.

11. Escuredo O., Shantal Rodríguez-Flores M., Sergio Rojo-Martínez S. R., Seijo M. C. (2019) Contribution to the Chromatic Characterization of Unifloral Honeys from Galicia. *Foods* 8: 233.
12. FDA (2013) Part 182-Substances generally recognized as safe. Subpart B Multiple purpose GRAS food substances, 182.1320-glycerin. <<http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c%3Decfr%26sid%3D786bafc6f6343634fbf79fcdca7061e1%26rgn%3Ddiv5%26view%3Dtext%26node%3D21:3.0.1.1.13%26idno%3D21#21:3.0.1.1.13.2.1.13>> Pristupljeno 13. rujna, 2020.
13. Ferencić D., Gluhic D, Dudaš S. (2016) Eterična ulja i nusproizvodi kore mandarine (*Citrus reticulata* Blanco). *Glasnik Zaštite Bilja* 39: 44 - 49.
14. Galkowska D., Dlugosz M., Juszczak L. (2013) Effect of high methoxy pectin and sucrose on pasting, rheological, and textural properties of modified starch systems. *Starch-Stärke*, **65**: 499 - 508.
15. Go E. J., Song K. B. (2020) Development and Characterization of Citrus Junos Pomace Pectin Films Incorporated With Rambutan (*Nephelium Lappaceum*) Peel Extract. *Coatings*, **10**: 1 - 15.
16. Gruz J, Novak O, Strnad M. (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **111**: 789 - 794.
17. Han H. S., Song K. B. (2020) Antioxidant activities of mandarin (*Citrus unshiu*) peel pectin films containing sage (*Salvia officinalis*) leaf extract. *International Journal of Food Science and Technology* **55**: 3173 - 3181.
18. Hasanbegović A. (2018) Primjena ekstrakata kore mandarine pri izradi biofilmova na bazi pektina. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
19. Hossain A. B. M. S., Aleissa M. S. (2016) Bio-ethanol Production as Bio-solvent (Antifermenter), Antiseptic and Bio-fuel from Date Fruit Waste and its Suitable Properties Identification. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology* **5**: 1 - 13.
20. Ibrahim N. A., Zaini M. A. A. (2017) Solvent selection in microwave- assisted extraction (MAE) of castor oil. *Chemical Engineering Transaction* **56**: 865 - 870.
21. In Seong C., Jae-Hoon K., Seung G. W., Kyoung Hyoun K., Hyeun-Jong B. (2012) Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *Applied Energy* **102**: 204 - 210.
22. Jolie R. P., Duvetter T., Van Loey A. M., Hendrickx M. E. (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345**: 2583 - 2595.

23. Karlović S., Šimunek M., Ježek D., Tripalo B., Bosiljkov T., Brnčić M., Blažić M. (2009) Određivanje teksturnih svojstava Gouda sira. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 98 - 103.
24. Kaushik P., Andújar I., Vilanova S., Plaza, M., Gramazio P., Herraiz F., Prohens J. (2015) Breeding Vegetables with Increased Content in Bioactive Phenolic Acids. *Molecules*. **20**: 18464 - 18481.
25. Li B. B., Smith B., Hossain M. M. (2006) Extraction of phenolics from citrus peels. *Separation and Purification Technology* **48**: 189 - 196.
26. Lu R., Abbott J.A. (2004) Force/Deformation Techniques for Measuring Texture. U: *Texture in Food: Volume 2: Solid Foods*, (Kilcast, D., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. Str. 109-145.
27. Marić M., Ninčević Grassino A., Zhu Z., Barba F. J., Brnčić M., Rimac Brnčić S. (2018) An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology* **76**: 28 - 37.
28. Mercado-Mercado G., De la Rosa-Carrillo, L. A. A., Alvarez-Parrilla E. (2019) Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal of Molecular Structure* **1199**: 2 - 9.
29. Mohnen D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266 - 277.
30. Mikkonen K. S., Rita H., Hele H., Talja R. A., Hyvonen L., Tenkanen M. (2007) Effect of Polysaccharide Structure on Mechanical and Thermal Properties of Galactomannan-Based films. *Biomacromolecules* **8**: 3198 - 3205.
31. Ninčević Grassino A., Brnčić M., Vikić-Topić D., Roca S., Dent M., Brnčić S. R. (2015) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chemistry* **198**: 93 - 100.
32. Ninčević Grassino A., Ostojić J., Miletić V., Djaković S., Bosiljkov T., Zorić Z., Ježek D., Brnčić Rimac S., Brnčić M. (2020) Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **64**: 1 - 42.
33. Nisar T., Wang Z. C., Alim A., Iqbal M., Yang X., Sun L., Guo Y. (2019) Citrus pectin films enriched with thinned young apple polyphenols for potential use as bio-based active packaging. *CyTA - Journal of Food* **17**: 695 - 705.

34. Nisar T., Wang Z. - C., Yang X., Tian Y., Iqbal M., Guo, Y. (2018) Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **106**: 670 - 680.
35. Nishinari K., Fang Y. (2018) Perception and measurement of food texture: Solid foods. *Journal of Texture Studies* **49**: 160 - 201.
36. Pasini Cabello, S. D., Takara, E. A., Marchese, J., Ochoa, N. A. (2015) Influence of plasticizers in pectin films: Microstructural changes. *Materials Chemistry and Physics* **162**: 491 - 497.
37. Pérez-Serradilla J. A. i Luque de Castro L. D. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry* **124**: 1652 - 1659.
38. Petrović V., Milković M., Valdec D. (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solvetnim i UV bojilima. *Tehnički glasnik* **2**: 191 - 197.
39. Piriyaarasarth, S., Sriamornsak, P. (2011) Flocculating and suspending properties of commercial citrus pectin and pectin extracted from pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Carbohydrate Polymers* **83**: 561 - 568.
40. Shendge R. S., Jamdhade A. A., Pande V. V. (2014.) Novel Strategy In Controlled Gastroretentive Drug Delivery: In-Situ Floating Gel. *International Journal of Drug Delivery* **6**: 230 - 243.
41. Sénéchal F., Wattier C., Rustérucci C., Pelloux J. (2014) Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5125 - 5160.
42. Sutherland W. J., Clout M., Côté I. M., Daszak P., Depledge M. H., Fellman L. (2010) A horizon scan of global conservation issues for 2010. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**: 1 - 7.
43. Špalj S. (2020) Pektinski biofilmovi s ugrađenim polifenolnim ekstraktima otpada espresso kave „Karoma“. Diplomski rad, Prehrambeno- biotehnološki fakultet.
44. Vlachos N., Skopelitis Y., M. Psaroudaki, Konstantinidou V., Chatzilazarou A., Tegou E. (2006) Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta* **573 - 574**: 459 - 465.
45. Vermeiren L., Devlieghere F., van Beest M., de Kruijf N., Debevere J. (1999) Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology* **10**: 77 - 86.

46. Wade, L. G. Jr. (2013) *Infrared Spectroscopy and Mass Spectrometry*. U: Organic Chemistry, 8. izd., Pearson Education, Inc, str. 513-563.
47. Wang H., Ding J., Ren N. (2016) Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **75**: 197 - 208.
48. Ya-Qin M., Xing-Qian Y., Zhong-Xiang F., Jian-Chu C., Gui-Hua X., Dong-Hong L.(2008) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 5682 - 5690.
49. Zhang Q., Lin L., Ye, W. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13**: 1 - 26.
50. Zhou H. Y., Liu C. Z. (2006) Microwave- assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A* **1129**: 135 - 139.

Izjava o izvornosti

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



Ivana Orešković