

Fizikalna svojstva jestivih filmova od kitozana i konoplje

Jelenić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:664020>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Luka Jelenić

**FIZIKALNA SVOJSTVA JESTIVIH
FILMOVA OD KITOZANA I
KONOPLJE**

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

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Mariju Ščetar na prihvaćenom mentorstvu te stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade rada.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Miji Kurek na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela.

Hvala roditeljima na nesebičnoj podršci tijekom cijelog studija, a majci Ivani posebno i na tehničkim savjetima pri pisanju ovoga rada. I na kraju, hvala djevojci Luciji što vjeruje u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

FIZIKALNA SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA OD KITOZANA I KONOPLJE

Luka Jelenić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211057

Sažetak: Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka s identificiranih više od 500 različitih prirodnih spojeva, uključujući i mnoge bioaktivne spojeve (terpeni, polifenoli, alkaloidi) od kojih mnogi imaju ljekovita, antimikrobna, antifungalna svojstva dok su njena vlakna najčvršća prirodna vlakna. Zbog tih karakteristika pogodna je za istraživanja u svrhu pronalaska alternativnih pakiranja u vidu jestivih filmova koji su dobra alternativa plastici. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem karakterizacije jestivih filmova s kitozanom (K), usitnjenim suhim listom konoplje (LK) i proteinom konoplje (PK) te su ispitana i uspoređena njihova fizikalno-kemijska (pH, debljina, topljivost, relativna vlažnost, viskoznost, obojenost, propusnost za svjetlost), mehanička (vlačna čvrstoća, produljenje prije pucanja, Youngov modul) i barijerna (propusnost za vodenu paru, O₂ i CO₂) svojstva te mikroskopski izgled. Filmovi s LK i PK pokazuju slabiju viskoznost, nižu propusnost za O₂ i CO₂, veću propusnost za vodenu paru, manju čvrstoću i veću elastičnost, a film LK najveću nepropusnost za svjetlost.

Ključne riječi: *jestivi film, kitozan, proteini konoplje, suhi list konoplje*

Rad sadrži: 47 stranica, 12 slika, 6 tablica, 69 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Mia Kurek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mia Kurek (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (zamjenski član)

Datum obrane: 4. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

PHYSICAL PROPERTIES OF EDIBLE FILMS FROM CHITOSAN AND HEMP

Luka Jelenić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211057

Abstract: Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a plant with more than 500 different natural compounds identified, including bioactive compounds (terpenes, polyphenols, alkaloids), many of which have medicinal, antimicrobial, antifungal properties, while its fibers are the strongest natural fibers. Due to these characteristics, hemp is suitable for research in order to find alternative packaging in the form of edible films, as good alternative to plastics. This research was conducted with the aim of characterizing edible films with chitosan (K), shredded dry hemp leaf (LK) and hemp protein (PK). Their physico-chemical (pH, thickness, solubility, relative humidity, viscosity, color, light transmittance), mechanical (tensile strength, elongation before cracking, Young's modulus) and barrier (water vapor permeability, O₂ and CO₂ transmission rates) properties were tested and compared, as well as microscopic appearance. Films with LK and PK showed lower viscosity, lower permeability for O₂ and CO₂, higher permeability for water vapor, lower strength and higher elasticity, and the film LK had the highest impermeability to light.

Keywords: *edible film, chitosan, hemp proteins, dry hemp leaf*

Thesis contains: 47 pages, 12 figures, 6 tables, 69 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Mario Ščetar, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Mia Kurek, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Mia Kurek, PhD, Associate professor (president)
2. Mario Ščetar, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marko Obranović, PhD, Associate professor (member)
4. Dubravka Novotni, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: 4th December 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. JESTIVI PREMAZI I FILMOVI	3
2.1.1. Kitozan	5
2.1.2. Glicerol kao plastifikator.....	7
2.1.3. Jestivi filmovi pripremljeni od kitozana i glicerola.....	8
2.2. AKTIVNO PAKIRANJE I UGRADNJA BIOAKTIVNIH TVARI U JESTIVE FILMOVE	8
2.2.1. Konoplja (<i>Canabis sativa</i> L.) kao izvor bioaktivnih tvari	10
2.3. FIZIKALNO–KEMIJSKA, BARIJERNA, MEHANIČKA I OPTIČKA SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA 12	
2.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva	12
2.3.1.1. Debljina jestivih filmova.....	12
2.3.1.2. Topljivost i udio vode (relativna vlažnost) jestivih filmova	13
2.3.1.3. pH jestivih filmova.....	13
2.3.1.4. Viskoznost	13
2.3.2. Barijerna svojstva.....	13
2.3.2.1. Propusnost jestivih filmova za vodenu paru	14
2.3.2.2. Propusnost jestivih filmova za kisik i ugljični dioksid	14
2.3.3. Mehanička svojstva	15
2.3.4. Optička svojstva	15
2.4. ZAKONSKA REGULACIJA PODRUČJA JESTIVIH FILMOVA I PREMAZA	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.2. PRIPREMA FILMOVA.....	18
3.3. METODE.....	20
3.3.1. Mjerenje pH vrijednosti filmogenih otopina	20
3.3.2. Mjerenje viskoznosti filmogenih otopina	20
3.3.3. Mjerenje debljine filmova	20
3.3.4. Određivanje boje jestivih filmova	21
3.3.5. Mjerenje nepropusnosti za svjetlost jestivih filmova	22
3.3.6. Određivanje topljivosti jestivog filma	22
3.3.7. Mikroskopski pregled jestivih filmova.....	23
3.3.8. Određivanje mehaničkih svojstava jestivih filmova.....	23
3.3.9. Mjerenje propusnosti jestivih filmova za kisik i ugljični dioksid.....	24
3.3.10. Mjerenje propusnosti jestivih filmova za vodenu paru.....	25
3.3.11. Mjerenje relativne vlažnosti jestivih filmova	25
3.4. OBRADA PODATAKA	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. pH VRIJEDNOST FILMOGENIH OTOPINA	26

4.2. VISKOZNOST FILMOGENIH OTOPIHA	27
4.3. DEBLJINA JESTIVIH FILMOVA	28
4.4. BOJA JESTIVIH FILMOVA	29
4.5. TRANSPARENTNOST JESTIVIH FILMOVA.....	30
4.6. TOPLJIVOST JESTIVIH FILMOVA	31
4.7. RELATIVNA VLAŽNOST JESTIVIH FILMOVA.....	32
4.8. PROPUSNOST NA VODENU PARU, KISIK I UGLJIČNI DIOKSID	33
4.9. MEHANIČKA SVOJSTAVA JESTIVIH FILMOVA	36
4.10. MIKROSKOPSKI PREGLED FILMOVA.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40

1. UVOD

Danas svjedočimo sve većoj čovjekovoj potrebi za održivom proizvodnjom hrane koja, od proizvodnje sirovine preko prerade, pakiranja, distribucije i odlaganja otpada, ima manje štetan učinak na sastavnice okoliša (vodu, zrak, tlo, bioraznolikost itd.) kao i na ljudsko zdravlje.

Pakiranje hrane, iako dolazi na samom kraju procesa proizvodnje vrlo je važan korak kojim se osigurava zaštita hrane od mikrobiološkog zagađenja i mehaničkih oštećenja, nepoželjnog utjecaja vlage, kisika i svjetlosti. Time se produljuje rok trajnosti te osigurava da do krajnjeg potrošača stigne samo zdravstveno sigurna i senzorski ispravna hrana.

Zbog potrebe zaštite različitih vrsta hrane koriste se vrlo različiti ambalažni materijali kao što su staklo, plastika, metal, papir, keramika i kombinirani materijali. Plastika je zbog svojih svojstava najrašireniji ambalažni materijal, a danas na tržištu postoji više od 900 vrsta plastičnih masa (Fuk, 2019). No, zbog vrlo raširene uporabe, otpornosti i neodgovarajućeg upravljanja plastičnim otpadom (Wagner i sur., 2014), plastika je postala jedan od najznačajnijih okolišnih zagađivača koji se konstantno akumulira u okolišu predstavljajući tako još uvijek nerješivi i akutni ekološki problem (Thew i sur., 2023). Procjenjuje se da čak 11 % plastike na globalnoj razini godišnje završi u posebno osjetljivim vodenim ekosustavima (Borrelle i sur., 2020). Plastika se proizvodi iz nafte koja je fosilno gorivo, stoga već i sama njezina proizvodnja negativno utječe na okoliš i doprinosi globalnom zatopljenju (Shiung Lam i sur., 2022). Pored toga, kad plastika dospije u okoliš, zbog svoje nerazgradivosti u njemu se zadržava stotinama godina (Thew i sur., 2023). Tijekom procesa degradacije dolazi do njezinog usitnjavanja, čime nastaje mikroplastika, koja putem slatkovodnih i morski organizama, ponovno ulazi u prehrambeni lanac te završava u tijelu čovjeka (Bule i sur., 2020). Stoga je potrebno pronaći odgovarajuću alternativu za plastičnu ambalažu, što se može ostvariti primjenom jestive ambalaže koja je i sigurna za konzumaciju i biorazgradiva te tako ne šteti okolišu.

Istraživanja o jestivim filmovima i premazima provode se upravo zbog istovremenog povećanja svijesti o očuvanju okoliša i potrebe za većom kvalitetom hrane, a tome su doprinijela otkrića funkcionalnih spojeva i novih tehnologija u proizvodnji hrane (Zhao i McDaniel, 2005). Novi materijali za pakiranje dobiveni od razgradivih biopolimera (Azeredo i sur., 2009) nisu univerzalni za sve prehrambene proizvode i ta činjenica predstavlja izazov za razvoj odgovarajućih filmova za sve vrste hrane. Cilj je upotreba jeftinijih, lako dostupnih i funkcionalnijih biopolimera (Aguirre-Joya i sur., 2018).

Ciljevi ovog diplomskog rada bili su:

- ❖ Priprema kompozitnih jestivih filmova s kitozanom i glicerolom;
- ❖ Dodatak 100 %-tnog praha proteina konoplje i praha suhog lista konoplje u jestive filmove;
- ❖ Karakterizacija i usporedba fizikalno–kemijskih te barijernih svojstva pripremljenih jestivih filmova s i bez 100 %-tnog proteina konoplje, odnosno usitnjenog suhog lista konoplje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JESTIVI PREMAZI I FILMOVI

Jestivi premazi stoljećima se koriste za zaštitu hrane i sprječavanje gubitka vlage. Prva takva uporaba zabilježena je u Kini u dvanaestom stoljeću, a kasnije u Engleskoj korištenjem svinjske masti ili masnoće za produljenje roka trajanja mesnih proizvoda. Početkom i sredinom dvadesetog stoljeća jestivi premazi koriste se za zadržavanje vlage i sjaj povrća i voća, za zaštitu mesnih prerađevina poput kobasica (kolagen), ali i za sprečavanje topljenja bombona u ruci (šelak, proteini) (Baldwin i sur., 2012).

Biopolimeri su postali predmet istraživanja kao zamjena za tradicionalne ambalažne materijale koji se temelje na naftnim derivatima, zbog njihovog svojstva formiranja premaza i filmova koji su i biorazgradivi i jestivi (Aguirre-Joya i sur., 2018).

Jestivi premaz i jestivi film mogu se definirati kao primarna ambalaža izrađena od jestivih komponenti. Razlika između premaza i filma je u tome što se premaz nanosi na prehrambeni proizvod u tekućem obliku postupkom uranjanja, prskanja ili premazivanja, te se zatim suši pri čemu nastaje njegov tanki sloj na površini proizvoda, dok je film tanki, čvrsti i suhi sloj koji nastaje sušenjem otopine na supstratu koji se nakon sušenja odvaja od supstrata i nanosi na prehrambeni proizvod.

Strukturni materijali od kojih se pripremaju jestivi premazi i filmovi temelje se na proteinima (soja, kolagen, želatina), polisaharidima (derivati celuloze, škrob, alginati, kitozan) i lipidima (esteri glicerola i voskovi), a mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinacijama (Quirós-Sauceda i sur., 2014). Pored strukturnih materijala, u pripremi jestivih premaza i filmova koriste se i plastifikatori (glicerol, sorbitol, monogliceridi, polietilen glikol, glukoza) radi povećavanja njihove fleksibilnosti i elastičnosti (Galus i Kadzińska, 2015).

U posljednje vrijeme pozornost se pridaje upravo kompozitnim premazima i filmovima kako bi se istražile komplementarne prednosti svake pojedine komponente, odnosno smanjili njihovi pojedinačni nedostaci. Većinu kompozitnih premaza i filmova sačinjava hidrofilni strukturni matriks te hidrofobni lipidni sastojak što rezultira boljom funkcionalnošću od one koju pokazuju čisti hidrokolojni premazi ili filmovi, posebno s obzirom na njihova barijerna svojstva u odnosu na propusnost za vlagu. Kompozitni premazi i filmovi mogu se pripremiti kao dvoslojni kompoziti ili kao emulzije, a istraživanja prednost ipak daju emulzijskim kompozitima. Prednost emulzijskih kompozita je ta što se dobivaju tijekom samo jednog lijevanja kod stvaranja filma i jednog procesa sušenja, a njihova svojstva ovise o tehnikama

pripreme, vrsti i količini komponenti (hidrokolid i lipid) i njihovoj kompatibilnosti, kao i mikrostrukturnoj heterogenosti (Galus i Kadzińska, 2015).

Idealan premaz ili film treba biti siguran, proziran, bez okusa i mirisa, adekvatne mehaničke čvrstoće te poželjnih barijernih svojstava u odnosu na propusnost za vlagu i plinove. Teoretski, upotreba jestivih premaza i filmova može poboljšati kvalitetu hrane jer:

1. formiranjem barijere sprječava gubitak vlage čime se prevenira dehidracija
2. zbog selektivne propusnosti plinova, odgađa se proces zrenja
3. kontrolira se migracija u vodi topljivih tvari (zadržavanje prirodne boje, nutrijenata)
4. sadrže funkcionalne sastojke (Zhao i McDaniel, 2005).

U tablici 1 dan je prikaz nekih primjera načina primjene jestivih premaza i filmova na voću, povrću, mliječnim proizvodima, jajima i ribi te njihov utjecaj na proizvod.

Tablica 1. Primjeri načina primjene jestivih ambalažnih premaza i filmova na različitim prehrambenim proizvodima

Namirnica	Komponente premaza ili filma	Rezultati	Referenca
Borovnica	Kitozan i ekstrakt Aloa vere	Produljen rok trajanja za 5 dana	Vieira i sur., 2016
Citrusi	Karboksimetilceluloza i kitozan	Poboljšani svi ispitivani parametri kvalitete voća	Arnon i sur., 2015
Mrkva	Škrob, glicerol, kitozan (1,5 % m/m), ledena octena kiselina (0,4 % m/m)	Inhibicija rasta bakterija mliječne kiseline i koliformnih bakterija	Durango i sur., 2006
Brokula	Kitozan, octena kiselina	Redukcija rasta mezofilnih i psihrotrofnih bakterija	Alvarez i sur. 2013

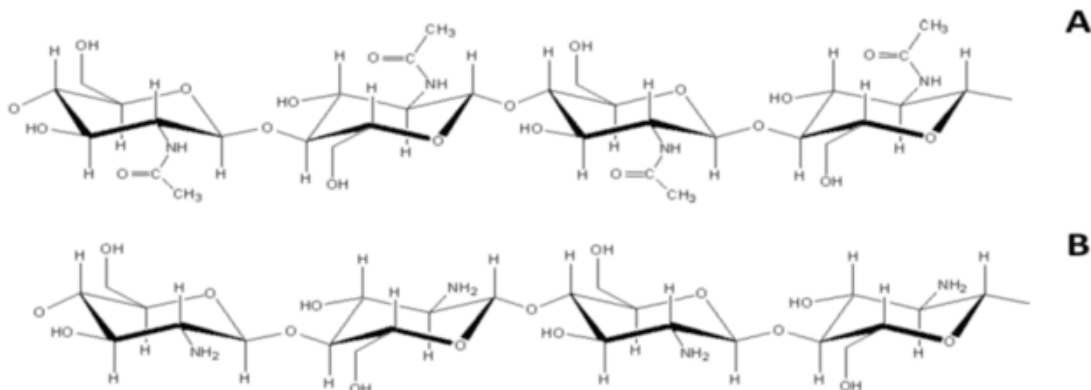
Tablica 1. Primjeri načina primjene jestivih ambalažnih premaza i filmova na različitim prehrambenim proizvodima - *nastavak*

Ricotta sir	Kitozan i protein sirutke	Odgodjen razvoj neželjene kiselosti, bolje održanje teksture, nepromijenjena osjetilna svojstva	Di Pierro i sur., 2011
Svježa jaja	Kitozan, octena kiselina	Smanjen gubitak vlage	Bhale i sur., 2003
Fileti odmrznutog oslića (<i>Merluccius capensis</i>)	Agar, glicerol, glukoza, ekstrakt zelenog čaja (<i>Camellia sinensis</i>)	Redukcija bakterija koje proizvode H ₂ S, kvaliteta održiva unutar granica prihvatljivosti	Lopez de Lacey i sur., 2014
Fileti pastreve (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Kitozan (1 % m/v), octena kiselina (1 % v/v), želatina (3 % m/v), glicerol 0,75 mL g ⁻¹	Zadržana kvaliteta i rok trajanja tijekom hladnog skladištenja, postignut antioksidacijski efekt	Nowzari i sur., 2013

Kao što je spomenuto, polisaharidi su prepoznati kao jedan od važnih strukturnih biopolimera za izradu jestivih filmova te su često istraživani (Espitia i sur., 2014). Jedan od takvih primjera je i kitozan kojeg karakteriziraju izvrsna filmogena svojstva te je vrlo često korišten kao biopolimer u proizvodnji jestivih filmova (van den Broek i sur., 2015; Dutta i sur., 2009).

2.1.1. Kitozan

Kitozan je polisaharid, sastavljen od N-acetil-D-glukoza-aminskih jedinica povezanih β- (1,4) vezom i uglavnom se dobiva djelomičnom decetilacijom hitina (slika 1).



Slika 1. Kemijska struktura hitina (A) i kitozana (B) (prema Muñoz-Tebar i sur., 2023)

Hitin je poznat kao ključni strukturni polimer koji čini veliki dio egzoskeleta kukaca i rakova. Zbog toga je hitin, nakon celuloze, najzastupljeniji polisaharid u prirodi te je lako dostupan, a može se pribaviti i kao nusproizvod u industrijskoj proizvodnji morske hrane ili u akvakulturi morskih račića (Gomes i sur., 2019). Dok je hitin netopljiv u većini otapala, kitozan je lako topiv u kiselim otopinama i stoga je prikladniji za industrijsku primjenu. Poznato je da kitozan veće molekularne težine ima pogodnija svojstva za stvaranje jestivih filmova kao rezultat stvaranja vodikovih veza unutar i između molekula (Balau i sur, 2004).

Zbog svoje visoke antimikrobne aktivnosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i netoksičnosti kitozan je najpoznatiji i najrašireniji polisaharid koji se koristi u izradi jestivih filmova i premaza. Prednost kitozana je ta da je on prirodni kationski polimer, dok je većina polisaharida ili neutralna ili ima anionski naboj. Ovo svojstvo dopušta proizvodnju višeslojnih struktura ili elektrostatskih kompleksa s drugim sintetskim polimerima ili negativno nabijenim prirodnim polimerima. Za formulaciju jestivih filmova ili premaza od kitozana, koristi se u koncentracijama od 1 do 3 % (m/v) otopljen u vodenoj otopini octene kiseline ili mliječne kiseline koncentracija od 1 % do 3 % (v/v). Čisti kitozanski filmovi su prozirni ili blago žućkasti, glatke površine, fleksibilni i kohezivni, visoke mehaničke otpornosti (u usporedbi s mnogim komercijalnim polimerima) i hidrofilni (Muñoz-Tebar i sur., 2023). Također, pokazuju i selektivnu propusnost za plinove i imaju slabu propusnost za vodenu paru (Skurtys i sur., 2010). Kako bi se poboljšala zaštitna svojstva u kitozanske filmove se često ugrađuju različite hidrofobne komponente (Bourbon i sur., 2011).

Osim toga, polikationski karakter kitozana omogućuje stvaranje kompleksa s prirodnim antibioticima ili antioksidansima, poboljšavajući tako njegovu primjenjivost u konzerviranju hrane (Gomes i sur., 2019).

Kitozan ima i dokazana antimikrobna i antifungalna svojstva (Muñoz-Tebar i sur., 2023; Alvarez i sur., 2013; Durango i sur., 2006). Mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana može se objasniti na više načina. Najprihvaćenija teorija upućuje na elektrostatsku interakciju između protonskih amino grupa (NH^+) glukozamina na okosnici kitozana i stanične membrane mikroorganizama koja ima negativni naboj zbog fosfatnih skupina u fosfolipidima, aminokiselina i različitih lipopolisaharida (Mousavi Khaneghah i sur., 2018; Elsabee i Abdou, 2013). Ova interakcija dovodi do promjene u propusnosti membrane što za posljedicu ima poremećaj u transportu nutrijenata i proteina, a to u konačnici uzrokuje smrti stanice mikroorganizma. Pored navedene, postoji i teorija po kojoj kitozan reagira sa staničnom DNA mikroorganizma i na taj način sprječava transkripciju DNA, translaciju RNA i sintezu proteina (Sharif i sur., 2018; Verlee i sur., 2017; Raafat i Shal, 2009).

Trenutno se provode brojna istraživanja koja imaju za svrhu poboljšati funkcionalnost filmova na bazi kitozana, uključujući i njihovu mehaničku otpornost i nisku elastičnost. Kako bi se ta svojstva poboljšala opisane su kombinacije s proteinima ili drugim polisaharidima. Tako Nowzari i sur. (2013), navode da filmovi s kitozansom i želatinom imaju poboljšana mehanička, transportna i fizička svojstva u usporedbi s onima izrađenih od pojedinačnih komponenti. Navedeno se pripisuje formiranju polielektrolitnih kompleksa kroz elektrostatske interakcije koje djeluju između protoniranih amino skupina kitozana i negativno nabijenih skupina bočnih lanaca u želatini ili kolagenu (tj. karboksilatne skupine). Dvoslojni kitozan-želatinski filmovi pokazuju bolje performanse u pogledu propusnosti vodene pare i mehaničkih svojstva nego kompozitni pandani.

2.1.2. Glicerol kao plastifikator

Pored karakteristika samog kitozana, proučavana je i uporaba plastifikatora u formulaciji kitozanskog filma. Utvrđeno je da su glicerol i polietilen glikol prikladniji kao plastifikatori za kitozanske filmove od primjerice etilen glikola i propilen glikola, uzimajući u obzir njihovu učinkovitost plastificiranja i stabilnost (Suyatma i sur., 2005). Koncentracija glicerola od 20 % (m/m) bila je dovoljna za dobivanje fleksibilnih kitozanskih filmova stabilnih svojstava tijekom čak 5 mjeseci skladištenja. Međutim, neka istraživanja su pokazala da se sposobnost vodene barijere i mehanička svojstva kitozanskih filmova plastificiranih glicerolom mijenjaju tijekom skladištenja što može biti posljedica isparavanja vode i gubitak plastifikatora iz matrice filma. Također pokazano je da prisutnost glicerola u formulaciji jestivog filma s kitozansom ne proizvodi učinak u infracrvenom spektru, pa kemijsku strukturu kitozana

možemo smatrati nepromijenjenom dodavanjem glicerola (Ziani i sur., 2008).

2.1.3. Jestivi filmovi pripremljeni od kitozana i glicerola

Kako bi se smanjili nedostaci filmova napravljenih od pojedinačnih komponenti, razvijeni su kompozitni filmovi.

Prirodne polimere poput kitozana, karakterizira krhkost i slabija mehanička čvrstoća u usporedbi sa sintetičkim polimerima, kao i visoka nepropusnost za vlagu zbog njihove hidrofilne prirode. Stoga su provedena brojna istraživanja kako bi se poboljšale karakteristike jestivih filmova baziranih na kitozanu. Navedeno uključuje dodavanje plastifikatora, poput glicerola koji povećava fleksibilnost konačnog proizvoda (Elsabee i Abdou, 2013).

Krhkost prirodnih biopolimera posljedica je njihove složene i razgranate primarne strukture i slabih međumolekularnih sila. Plastifikatori smanjuju međumolekularne sile i omekšavaju krutost strukture te tako povećavaju pokretljivost biopolimernih lanaca, odnosno poboljšavaju mehaničkih svojstava filma. Glicerol smanjuje propusnost za vodenu paru, što može biti posljedica stvaranje vodikovih veza između pukotina unutar lanca kitozana, čime se utječe na usporavanje vode i njeno zadržavanje. Isto tako dodavanjem glicerola postiže se povećana propusnost za kisik što se može objasniti time da glicerol, kao plastifikator, povećava pokretljivost polimernih lanaca i time smanjuje otpor filma na prijenos plina (Srinivasa i sur., 2007).

2.2. AKTIVNO PAKIRANJE I UGRADNJA BIOAKTIVNIH TVARI U JESTIVE FILMOVE

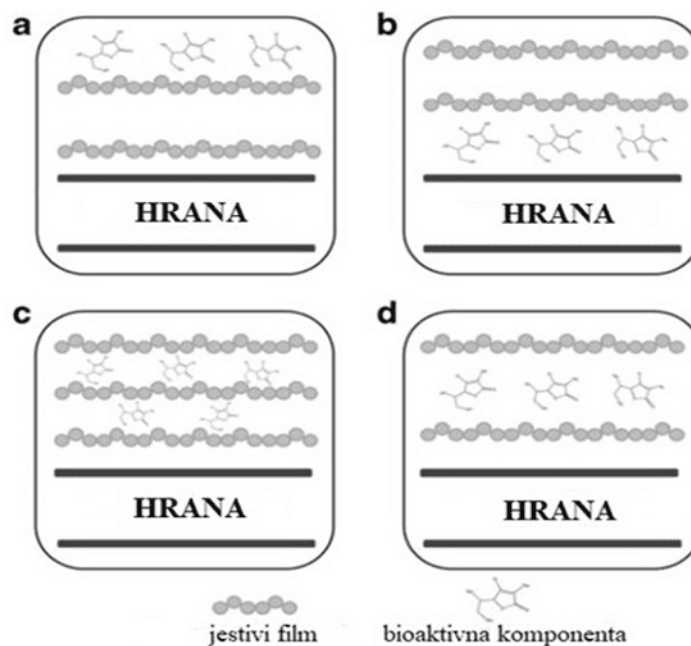
Pojam aktivnog pakiranja poznat je od 80-tih godina dvadesetog stoljeća, a podrazumijeva ambalažni materijal koji otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbira u cilju produljenja roka trajnosti ili održavanja i poboljšavanja uvjeta pakiranja. Aktivna ambalaža, uz inteligentnu, pripada pametnoj ambalaži. Aktivna tvar može biti umiješana u polimerni materijal, nanesena kao premaz na polimerni materijal ili se može nalaziti u posebnom spremniku unutar pakiranja (npr. vrećici). Ovisno o funkciji koju aktivna tvar obavlja razlikujemo: apsorbere kisika, apsorbere ili izračivače ugljikovog dioksida, adsorbere i regulatore vlage, apsorbere etilena, apsorbere UV zračenja, izračivače etanola i antimikrobne tvari. Aktivno pakiranje ne smije sadržavati tvari koje maskiraju proces kvarenja hrane, već ga trebaju spriječiti u nastajanju (Jakupić i sur., 2019).

Jedna od glavnih prednosti kitozanskih filmova i premaza je ta što omogućavaju

polaganu i kontroliranu migraciju bioaktivnih spojeva (kao što su polifenolni spojevi, bakteriocini, eterična ulja ili biljni ekstrakti) na zapakirani proizvod te su pogodni za razvoj nove aktivne ambalaže s antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima (Muñoz-Tebar i sur., 2023).

Bioaktivni spojevi su esencijalni i neesencijalni spojevi (npr. vitamini ili polifenoli) koji se pojavljuju u prirodi, dio su hranidbenog lanca i može se dokazati da imaju učinak na ljudsko zdravlje (Biesalski i sur., 2009).

Kako bi se umanjili nedostaci bioaktivnih spojeva kao što su manjkavost okusa, brza razgradnja i interakcija s drugim sastojcima hrane, što može dovesti do gubitka njihovih funkcionalnih svojstava, oni se mogu ugraditi u jestive filmove. Ovisno o prirodi i svrsi bioaktivnih spojeva, moguća su četiri načina ugradnje pa se tako oni mogu ugraditi s vanjske strane jestivog filma, na granici sustava hrana - jestivi film, između više slojeva filma ili raspršeno između različitih slojeva filma (Bionda, 2021). Prikaz ugradnje bioaktivnih spojeva prikazan je na slici 2.



Slika 2. Načini ugradnje bioaktivne komponente u film: a) ugradnja na vanjsku površinu filma, b) u međuprostor između filma i hrane, c) između više slojeva jestivog filma, d) raspršena između različitih dijelova filma (*prema* Quirós-Sauceda i sur., 2014)

2.2.1. Konoplja (*Cannabis sativa* L.) kao izvor bioaktivnih tvari

Konoplja *Cannabis sativa* L. je jednogodišnja, dvodomna biljka koja pripada obitelji Cannabaceae. Sada se smatra jedinom vrstom roda *Cannabis*, ali je podijeljena u nekoliko fenotipova koji se mogu opisati kao podvrste ili varijeteti. Konoplja je brzorastuća biljka sa žljebastom stabljikom koja može narast 1 do 4 m, a varijacija visine i promjera ovisi o podvrsti, okolišu, tlu i klimatskim uvjetima. Sjemenke konoplje su glatke, sivkasto jajolikog ili sferičnog oblika. Svaka sjemenka sadrži dva kotiledona bogata rezervama proteina i ulja. Muške i ženske biljke moguće je razlikovati tek u vrijeme cvatnje. Ženski cvjetovi pojavljuju se u parovima u pazušcima malih listova zvanih brakteje, a te brakteje sadrže brojne žljezdane trihome u kojima se nalaze kanabinoidi, uglavnom Δ 9-tetrahidrokanabinol (Δ 9-THC). Listovi su nasuprotni, dlanastog oblika s 5 do 7 do sedam nejednakih, izduženih i bodljikavih režnjeva (Hourfane i sur., 2023). Prikaz biljke i njezinih dijelova dan je na slici 3.



Slika 3. *Cannabis sativa* L. – prikaz cijele biljke (a), cvat (b), sjeme (c), list (d) i stablo (e)
(prema Hourfane i sur., 2023)

Ovo je jedna od najstarijih poznatih biljaka koja se uzgaja za hranu, tkaninu i lijekove. Rasprostranjena je na raznolikim staništima, od područja uz more preko umjerenog pojasa do predplaninskih područja. Biljka potječe iz zapadne Azije i uvedena je u zapadnu medicinu početkom 19. stoljeća. Konoplja ima dugu povijest korištenja kao lijek za liječenje raznih

bolesti i stanja, kao što su astma, epilepsija, vrtoglavica, glaukom, nesanic, mučnina, bol i reumatizam.

Sa kemijskog stajališta, radi se o vrlo kompleksnoj biljci iz koje je identificirano više od 500 različitih prirodnih spojeva, od čega čak 125 kanabinoida. Kanabinoidi se sintetiziraju u žljezdastim trihomima biljke. Glavni psihoaktivni sastojak biljke je kanabinoid Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC), koji je prirodno prisutan u obliku kiseline (Δ^9 -tetrahidrokanabinolna kiselina, Δ^9 -THCA). Dekarboksilacijom kiseline s vremenom ili pod utjecajem topline nastaje farmakološki aktivan Δ^9 -tetrahidrokanabinol. Kanabidiol (CBD), je još jedan kanabinoid, poznat kao antiepileptik i koristi se kod liječenje epilepsije. Pored Δ^9 -THC-a i CBD-a, identificirana su još četiri važna kanabinoida: tetrahidrokanabivarin (THCV), kanabinol (CBN), kanabigerol (CBG) i kanabikromen (CBC). Nekanabinoidni sastojci uključuju nekanabinoidne fenole, flavonoide, terpene, alkaloidne i druge (Radwan i sur., 2021).

Listovi konoplje sadrže terpene, polifenole, kanabinoide i alkaloidne. Eterična ulja u listu konoplje karakterizira prisutnost (e)-kariofilena, α -humulena, β -selinena, kariofilen oksida, α -selinena i α -trans-bergamotena. Ovo su hlapljivi terpeni koji se nalaze u lišću fotosintetskih biljaka i štite ju od parazita i gubitka vode. Od polifenola u listu konoplje nalazimo uglavnom flavonoide i glikozide zastupljene s apigeninom i luteolinom (Hourfane i sur., 2023).

Sjemenke konoplje, osim lipida, sadrže proteine (20-30 %), ugljikohidrate (10-15 %) i netopiva vlakna, vitamine i razne minerale, kao što su fosfor, kalij, magnezij, sumpor, kalcij, željezo i cink. Glavni proteinski sadržaj sjemenki konoplje sastoji se od albumina i globulina (edestina), polipeptida s visokim udjelom arginina, glutaminske kiseline, kao i aminokiselina koje sadrže sumpor. No, filmovi na bazi proteina, općenito pokazuju loša mehanička svojstva i barijerna svojstva za vodenu paru, tako da je njihova primjena još uvijek prilično ograničena. Njihova svojstva mogu se poboljšati miješanjem proteina s drugim biopolimerima ili aditivima (Mirpoor i sur., 2021).

Vlakna konoplje u najvećem postotku sačinjavaju celuloza (52-72 %), hemiceluloza (8-19 %) i lignin (2-5 %) te imaju najviše vrijednosti Young-ovog modula od svih prirodnih vlakana (Promhuad i sur., 2022). Provedena su istraživanja biorazgradivih kompozita pripremljenih od polimljične kiseline (engl. *polylactic acid* – PLA) i praha stabljike konoplje (5, 10 i 15 wt %) te su ispitana njihova mehanička i toplinska svojstva. Young-ov modul biokompozita izrađen od PLA i 15 % praha konoplje pokazao je povećanje od 9,3 % u odnosu na Young-ov modul bez praha konoplje. Također, biokompoziti s konopljom pokazali su poboljšanu toplinsku stabilnost u temperaturnom rasponu obrade od 130 do 180 °C. Ovi rezultati pokazuju da vlakna konoplje imaju veliki potencijal za proizvodnju biokompozita i

pakiranja na bazi prirodnih materijala (Promhuad i sur., 2022).

Istraživanja pokazuju da *C. sativa* ima antimikrobna svojstva. Provedena su istraživanja antimikrobne aktivnosti ulja sjemenki, te ekstrakata cijele biljke u petroleteru i metanolu na Gram pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), Gram negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), kao i na dvije vrste gljivica (*Aspergillus niger* i *Candida albicans*). Rezultati su pokazali izraženo antibakterijsko djelovanje protiv većine upotrijebljenih mikroorganizama (Ali i sur., 2012).

U svom radu Saleemi i sur. (2022), daju prikaz niza učinaka kanabinoida na patogene organizme s popisa prioritetnih patogena Svjetske zdravstvene organizacije, koji potvrđuju njihovo antimikrobno djelovanje, a također daju prikaz niza studija koje ukazuju na potencijal kanabidiola za liječenje malignih bolesti, odnosno njihov antioksidativni učinak. Niz radova posebice ukazuje na pozitivan antimikrobni učinak esencijalnih ulja konoplje (Gomes i Steinberg, 2022).

Provedena su i istraživanja materijala za pakiranje hrane koja se baziraju na nanocelulozi iz konoplje, bioplastici i polilizin. Primjena nanoceluloze iz konoplje u razvoju biorazgradivog kompozitnog filma demonstrirana je s različitim matriksima te se pokazalo da su takvi filmovi biorazgradivi, održivi i imaju veliki potencijal za korištenje kao antimikrobna ambalaža koja poboljšava kvalitetu i sigurnost hrane (Liao, 2022).

2.3. FIZIKALNO–KEMIJSKA, BARIJERNA, MEHANIČKA I OPTIČKA SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA

2.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva

2.3.1.1. Debljina jestivih filmova

Parametar koji direktno utječe na barijerna i mehanička svojstva jestivih filmova je njihova debljina. Debljina filmova koji se pripremaju izlivanjem u Petrijeve posude, ovisiti će o volumenu i viskoznosti otopine te o promjeru posudice. Vrlo viskozne otopine teško se razlijevaju po podlozi što dovodi do neravnomjerne raspodjele, a time i do veće debljine jestivog filma. Poželjno je da debljine filma iznosi do 0,25 mm. Debljina filma može se mjeriti kontaktnom i ne-kontaktnom metodom. Kontaktna metoda najčešće podrazumijeva mjerenje filma pomoću mikrometra, no iako je jednostavnija može dovesti do oštećenja filma. Ne-kontaktna metoda je složenija, ali i djelotvornija, jer njenom primjenom ne može doći do oštećenja filma.

2.3.1.2. Topljivost i udio vode (relativna vlažnost) jestivih filmova

Važna karakteristika filmova je i njihova topljivost u vodi. Prema topljivosti filmove možemo podijeliti na hidrofilne (topive u vodi) i hidrofobne (netopive u vodi), što je bitna karakteristika koja govori kako će se filmovi ponašati u vodenom okruženju, a time i o tome za koju vrstu namirnica će biti primjenjivi. Za namirnice koje su osjetljive na vlagu, treba koristiti hidrofobne jestive filmove kako bi se spriječilo isušivanje i održao integritet proizvoda. Za razliku od toga, hidrofilne filmove je preporučljivo koristiti onda kada je cilj da se oni otope tijekom upotrebe.

Količina vode prisutna u jestivim filmovima daje indicaciju njihove hidrofilnosti budući da su hidrofilniji oni filmovi koji imaju višu vrijednosti sadržaja vlage. Smatra se da ugradnja bioaktivnih spojeva u kitozanske filmove dovodi do povećanja sadržaja vlage. Povećanje sadržaja vlage u kitozanskim filmovima s bioaktivnim spojevima može se objasniti s porastom broja nabijenih molekula, koje imaju veću sposobnost adsorpcije vode (Bourbon i sur., 2011).

2.3.1.3. pH jestivih filmova

pH jestivih filmova može bitno utjecati na njihova svojstva poput propusnosti za vodenu paru, vlačnu čvrstoću i postotak produljenja prije pucanja. Jestivi filmovi pripremljeni samo od kitozana sa pH 4 i 5, pokazali su veću propusnost za vodenu paru nego filmovi sa pH 3. Vlačna čvrstoća i postotak produljenja prije pucanja značajno ovise o stupnju deacetilacije (prilikom prevođenja hitina u kitozan), kiseline koja se koristi pri izradi filma i pH vrijednosti (van den Broek i sur., 2015).

2.3.1.4. Viskoznost

Prema nekim istraživanjima, utvrđeno je da uporaba glicerola i sorbitola koji se pri izradi jestivih filmova koriste kao plastifikatori može imati značajan pozitivan učinak na viskoznost otopine filma (Sancakli i sur., 2021). Peng i sur. (2013) navode da filmovi s kitozanom kojima je dodan ekstrakt zelenog čaja, odnosno ekstrakt crnog čaja pokazuju niže vrijednosti viskoznosti u odnosu na kontrolni uzorak s kitozanom.

2.3.2. Barijerna svojstva

Barijerna svojstva jestivih filmova, odnosno propusnost na plinove (kisik i ugljični

dioksid), vodenu paru i ostale tvari utječu na kvalitetu i rok trajanja namirnice, a ovise o kemijskom sastavu i strukturi filma, kao i svojstvima same namirnice (zrelost, sadržaj vlage, sadržaj lipida) (Zhao i McDaniel, 2005). Neke namirnice (npr. sol i šećer) ne zahtijevaju prisutnost kisika ili njegova prisutnost ne utječe na njihova svojstva, dok primjerice meso i mesni proizvodi te voće i povrće zahtijevaju ambalažu koja će biti propusna za kisik. Stoga pri odabiru jestivog filma valja uzeti u obzir svojstva proizvoda te tako odabrati više ili manje propustan film (Bionda, 2021).

2.3.2.1. Propusnost jestivih filmova za vodenu paru

Propusnost za vodenu paru (engl. *water vapour permeability* - WVP) važan je parametar koji se uobičajeno uzima u obzir kod pakiranja hrane, a uključuje sorpciju, difuziju i adsorpciju. Propusnost za vodenu paru bi trebala biti što niža, jer je jedan od glavnih ciljeva korištenja jestivog filma usporavanje prijenos vlage između hrane i okoliša. Interakcije između molekula biopolimera od kojeg je izgrađen jestivi film i molekula vode osnova su za procjenu permeacije vode kroz film, koja se obično dešava kroz hidrofilni dio filma (Bourbon i sur., 2011).

Dodatak plastifikatora utječe na povećanu propusnost za vodu i plinove kao posljedica slabljenja intermolekularnih sila u polimeru (Aguirre-Joya i sur., 2018). S druge pak strane, uočeno je da dodatak bioaktivnih spojeva u kitozanski film smanjuje propusnost za vodenu paru, a posebice dodatak proteina visoke molekularne mase (poput laktoferina) (Bourbon i sur., 2011).

2.3.2.2. Propusnost jestivih filmova za kisik i ugljični dioksid

Propusnost materijala za pakiranje hrane za kisik vrlo je važna za očuvanje hrane. Kisik je ključni čimbenik koji može izazvati oksidaciju koja pokreće nekoliko reakcija kvarenja. Polisaharidni filmovi po svojoj prirodi, predstavljaju dobru barijeru za kisik jer je njihova mreža vodikovih veza čvrsto zbijena i raspoređena (Bourbon i sur., 2011). Također, mjerenje propusnost jestivih filmova za ugljični dioksid daje važnu informacije za daljnji razvoj jestivih filmova, posebice za razvoj procesa pakiranja u modificiranoj atmosferi (McMillin, 2008). Polisaharidi i proteini su polimeri koji mogu formirati snažne međumolekulske veze što posljedično stvara dobru barijeru za plinove (CO₂ i O₂) (Andrade i sur., 2012).

2.3.3. Mehanička svojstva

Mehanička otpornost jestivih filmova mora se utvrditi kako bi se procijenila održivost integriteta filma tijekom rukovanja, pakiranja i ostalih daljnjih procesa (Debeaufort i sur., 1998). Mehanička su svojstva posljedica strukturnog stanja materijala odnosno tehnološkog postupka pripreme, a obzirom da jestivi filmovi imaju slabija mehanička svojstva u odnosu na sintetičke materijale, dodatkom stabilizatora, aditiva, plastifikatora i/ili emulgatora se može utjecati na njihovo poboljšanje (Bionda, 2021).

Mehanička svojstva filmova čine tri parametra: vlačna čvrstoća (otpor materijala na pucanje pod napetošću), Young-ov modul te postotak produljenja prije pucanja (Skurtys i sur., 2010). Namjeravana upotreba jestivih premaza ili filmova zahtijeva jasno poznavanje i razumijevanje njihovih mehaničkih svojstava kao što su vlačna čvrstoća i postotak produljenja prije pucanja. Ovi parametri povezuju mehanička svojstva filmova s njihovom kemijskom strukturom i jako ovise o samom sastavu filma. Međudjelovanje proteina, hidrokoloida i drugih aditiva uključujući vodu, plastifikatore i bioaktivne spojeve vrlo su važni i utječu na vrijednost vlačne čvrstoće i postotak produljenja prije pucanja. Vlačna čvrstoća predstavlja najveću napetost koju film može izdržati, dok postotak produljenja prije pucanja predstavlja najveću promjenu u duljini ispitnog uzorka prije nego što pukne. Neka istraživanja pokazuju da dodatak bioaktivnih spojeva u kitozanski film smanjuje vlačnu čvrstoću te povećava vrijednost deformacije na granici elastičnosti, a posebice se to tiče dodatka proteina visoke molekularne mase (poput laktoferina) (Bourbon i sur., 2011).

2.3.4. Optička svojstva

Optička svojstva jestivog filma kao što su sjaj, boja i prozirnost ovise o sastavu filma i postupku izrade. Obzirom da je vizualni izgled proizvoda, uključujući i njegovo pakiranje, ono što će privući ili odbiti kupca, poželjno je da jestivi film ima sjaj te da ga karakterizira prozirnost, a ne mutnoća (Bionda, 2021). Intenzitet obojenja filma ovisit će o koncentraciji prisutnih pigmenata. Zaštita od svjetla koju nude jestivi filmovi ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući: prirodne apsorpcijske osobine materijala koji sačinjava film, debljinu filma, uvjete obrade filma i obojenje konačnog filma (Singh i Singh, 2005).

2.4. ZAKONSKA REGULACIJA PODRUČJA JESTIVIH FILMOVA I PREMAZA

U pogledu načina kako se klasificiraju jestivi filmovi u zakonodavstvu koje uređuje područje hrane i sigurnosti hrane možemo za njih reći da su: prehrambeni proizvod, dodatak hrani, sastojci hrane, tvari u dodiru s hranom ili materijali u dodiru s hranom (Galić, 2009). U Republici Hrvatskoj kao članici Europske unije, svi prehrambeni proizvodi, pa tako i jestivi filmovi koji se stavljaju na tržište, moraju biti u skladu sa odredbama Uredbe (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane (Uredba, 2002).

Uredba (2002) predviđa osnovu za osiguranje visoke razine zaštite zdravlja ljudi i interesa potrošača u vezi s hranom, posebno uzimajući u obzir razlike u opskrbi hranom, uključujući tradicionalne proizvode te pritom osiguravajući učinkovito funkcioniranje unutarnjega tržišta Europske unije. Njome se uspostavljaju osnovna načela i zadaće, sredstva za stvaranje jake znanstvene osnove, učinkoviti organizacijski mehanizmi i postupci koji podupiru donošenje odluka u vezi sa zdravstvenom ispravnošću hrane i hrane za životinje.

Također, Uredbom (2002) osnovana je Europska agencija za sigurnost hrane te su utvrđeni postupci u područjima sigurnosti hrane.

U svibnju 2020. godine Europska komisija donijela je novi višegodišnji strateški dokument naziva „Strategija „od polja do stola” - za pravedan, zdrav i ekološki prihvatljiv prehrambeni sustav“ (Strategija, 2020). Ova strategija pruža sveobuhvatni pristup vrednovanju održivosti hrane u Europi te nudi priliku za poboljšanje načina života, očuvanje zdravlja i okoliša. Stvaranje povoljnog prehrambenog okruženja koje olakšava odabir zdrave i održive prehrane pridonijet će poboljšanju zdravlja i kvalitete života potrošača te društvu pomoći da smanji troškove povezane sa zdravljem. Strategija prepoznaje potrebu za svježom, manje prerađenom hranom iz održivih izvora i nužnost za što kraćim lancima opskrbe hranom.

Obzirom da je hrana nužna svim ljudima, zakonodavstvo u području hrane mora osigurati da sva dostupna hrana bude u prvom redu odobrena i zdravstveno sigurna za ljudsku konzumaciju. U tu svrhu primjenjuje se sustav kontrole i kvalitete hrane HACCP (engl. *Hazard analysis and critical control point*) i preduvjetni programi: dobra proizvođačka praksa GMP (engl. *Good manufacturing practices*), dobra higijenska praksa GHP (engl. *Good hygiene practices*), standardni operativni postupci SOP, kao i sanitacijski standardni operativni postupci SSOP.

Svi materijali ili predmeti koji dolaze u dodir s hranom, a koji se stavljaju na tržište EU

trebaju ispunjavati zahtjeve Uredbe (EZ) br. 1935/2004 o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom, uključujući aktivne i inteligentne materijale (Uredba, 2004). Nadalje, Uredba Komisije (EK) br. 450/2009 o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom, navodi popis tvari koje se smiju koristiti u aktivnim i inteligentnim materijalima, a isključene su kancerogene, mutagene i toksične tvari te tvari u nano obliku (Uredba, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovome radu za potrebe izrade jestivih filmova upotrijebljen je prirodni biopolimer kitozan (Francuska Chitin, tip 652, molekulske mase 165 kDa, stupanj deacetiliranja iznad 85 %), 100 %-tni protein konoplje dobiven iz hladnih organskih sjemenki konoplje (Bonatura, Boštjan Rudolf s.p., Makedonska ulica 45, Maribor, Slovenija) i usitnjeni suhi list konoplje. Sirovina za usitnjeni suhi list konoplje je ostatak nakon ekstrakcije kanabinoida putem ultrazvuka u etanolu iz dijelova usitnjene industrijske konoplje (nadzemni dio, listovi i cvjetovi) s područja Slavonije, sorta Finola (žetva 2021. godine). Nakon ekstrakcije u etanolu, ostatak je osušen u termostatu do uklanjanja alkohola. Za otapalo je korištena destilirana voda i octena kiselina (ledena octena kiselina 100 %, Merck, Darmstad, Njemačka), a kao plastifikator korišten je biljni glicerol (minimalne čistoće 99,5 %, Dekorativna točka d.d., Alojza Člekovića 17, Poznanovec, Hrvatska).

3.2. PRIPREMA FILMOVA

Za potrebe ovoga rada izrađena su tri jestiva filma, jedan iz octene kiseline, kitozana i glicerola (K) te ostala dva, na način da je jedan pripremljen uz dodatak praha proteina konoplje (PK), a drugi uz dodatak praha suhog lista konoplje (LK).

Pribor i aparatura:

- 1) Staklene čaše (250 mL)
- 2) Odmjerna tikvica (1000 mL)
- 3) Petrijeve zdjelice (promjer 11,8 cm)
- 4) Menzura (100 mL)
- 5) Pipeta i propipeta
- 6) Mala staklena pipeta (pipetman)
- 7) Papirnata lađica za vaganje
- 8) Špatula, pinceta, stakleni štapić
- 9) Parafinski film
- 10) Staničevina
- 11) Laboratorijske rukavice

- 12) Analitičko sito Ø 200 mm
- 13) Analitička vaga (KERN KB 2000-2N)
- 14) Magnetska miješalica i magneti (Witeg ms-mp8, Njemačka)
- 15) Ultra turrax (IKA T18 digital, Njemačka)
- 16) Mlin (Waring WSG30, Sprzet Laboratoryjny i Medyczny Labpartner KBS, Warszawa, Poljska)
- 17) Kriomlin (CryoMill, Retsch, Njemačka)
- 18) Ventilirana klima komora (HPP110, Memmert, Njemačka)
- 19) Eksikator

Postupak pripreme:

Pripremljena je 1 % otopina octene kiseline. Zatim su pripremljeni uzorci praha lista konoplje i praha proteina konoplje koji će se dodati u otopinu octene kiseline i kitozana. Masa od 5 g usitnjenog suhog lista konoplje samljeveno je mlinom (Waring WSG30, Sprzet Laboratoryjny i Medyczny Labpartner KBS, Warszawa, Poland) te je dobiveni prah prosijan sitom. Zatim je dodatno samljeven u kriomlinu (CryoMill, Retsch, Njemačka) dva puta po dvije minute na frekvenciji od 30 s^{-1} . 5 g proteina konoplje samljeveno je u prah u kriomlinu, također dva puta po dvije minute na frekvenciji od 30 s^{-1} .

Nakon toga pristupilo se izradi filmova. U tri čaše od 250 mL menzurom je dodano 100 mL 1 % otopine octene kiseline i odvagano je 2 g kitozana na analitičkoj vagi. Čaše su stavljene na magnetsku miješalicu koja je bila podešena na 485 rpm. Zatim je u svaku čašu postepeno dodano 2 g kitozana uz konstantno miješanje kako bi se omogućilo njegovo bolje otapanje. Čaše su pokrivene parafinskim filmom kako bi se zaštitile od nečistoća iz okoline te su ostavljene na magnetskoj miješalici 24 h na sobnoj temperaturi da se kitozan u potpunosti otopi. Zatim je izvagano 0,1 g praha suhog lista konoplje te 0,1 g praha proteina konoplje. Nakon toga je, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici, u jednu čašu s otopinom octene kiseline i kitozana postepeno dodano 0,1 g praha suhog lista konoplje, a u drugu čašu je dodan 0,1 g praha proteina konoplje. Miješanje je nastavljeno daljnjih 60 minuta. Kako bi se kitozan i prah suhog lista konoplje (LK), odnosno kitozan i prah proteina konoplje (PK) bolje sjedinili, otopine su dodatno promiješane Ultra-turrax miješalicom (IKA T18 digital, Njemačka) 3 puta po 1 minutu na $58 \times 1000 \text{ rpm}$. U trećoj čaši pripremljena je samo otopina octene kiseline i kitozana (K).

Zatim je u svaku otopinu malom staklenom pipetom dodano 0,4 g glicerola (20 % od suhe mase kitozana). Čaše su vraćene na magnetsku miješalicu par minuta radi homogeniziranja

otopina s glicerolom.

Filmovi su formirani izlivanjem po 30 grama svake otopine (LK, PK i K) u Petrijeve zdjelice promjera 11,8 cm pomoću analitičke vage. Filmovi su označeni s obzirom sadrže li prah suhog lista konoplje (LK), prah proteina konoplje (PK) ili samo kitozan (K). Zdjelice s filmovima stavljene su na sušenje u ventiliranu klima komoru (HPP110, Memmert Germany) u kontroliranim uvjetima temperature (25 °C) i relativne vlažnosti (50 % RH) u razdoblju od 48 sati.

Nakon sušenja, filmovi su pažljivo, odvojeni od površine Petrijevih zdjelica te stavljeni između filter papira. Tako pripremljeni filmovi su čuvani u eksikatoru do analize.

3.3. METODE

3.3.1. Mjerenje pH vrijednosti filmogenih otopina

pH vrijednost pripremljenih otopina LK, PK i K izmjerena je pomoću pH metra (Mettler Toledo, FiveGo™, Švicarska). Kombinirana elektroda pH metra uronjena je u homogeniziranu otopinu, a pH vrijednost očitana je na ekranu uređaja. Nakon svakog uzorka, elektroda je isprana destiliranom vodom. Provedena su tri mjerenja.

3.3.2. Mjerenje viskoznosti filmogenih otopina

Mjerena je viskoznost filmogenih otopina LK, PK i K. Viskoznost je mjerena pomoću viskozimetra (Lamy Rheology RM 100 Plus, Francuska). Za svako mjerenje su pripremljene svježije otopine. Dobivene su vrijednosti viskoznosti (Pa s) i obrtne sile (mN m^{-1}).

Postupak:

Po 20 mL uzorka svake od filmogenih otopina LK, PK i K stavljeno je u posudu za uzorak te je uronjeno mjerno tijelo. Na uređaju se odabere program mjerenja MS-C19-C. Za svaki uzorak mjerene su viskoznost (V) i obrtna sila (T) za 7 različitih vrijednosti brzine smicanja (5, 10, 15, 25, 50, 100 i 150 s^{-1}). Temperatura pri mjerenju iznosila je 20 °C. Kao rezultat uzima se srednja vrijednost mjerenja i standardna devijacija.

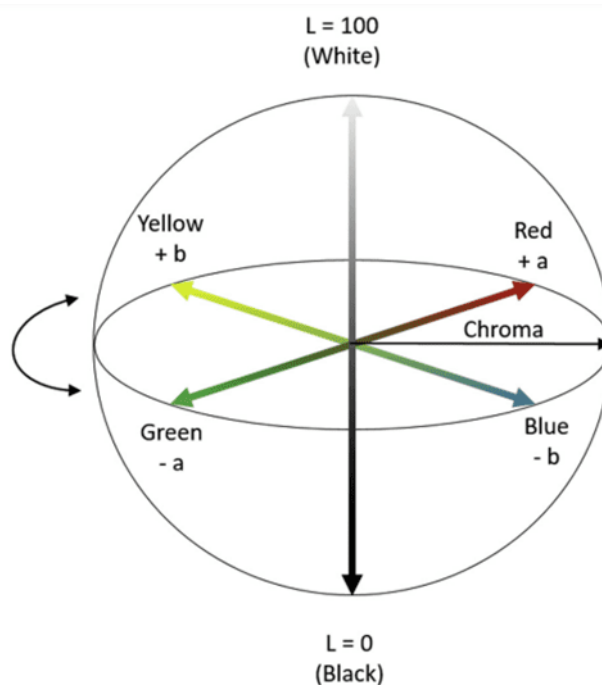
3.3.3. Mjerenje debljine filmova

Debljina svakog jestivog filma mjerena je na tri različita mjesta, a kao rezultat je uzeta srednja vrijednost tri mjerenja izražena u mikrometrima (μm) s pripadajućom standardnom

devijacijom. Za mjerenje debljine korišten je digitalni mikrometar (Helios Preisser DIGI-MET, Njemačka), preciznosti 0,001 mm.

3.3.4. Određivanje boje jestivih filmova

CIE $L^*a^*b^*$ prostorni model boja je trodimenzionalni sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja u kojima su sudjelovali ljudi dobrog vida bez deformacija viđenja boja. Koordinate CIELAB sustava boja zasnivaju se na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Raspon boja crveno-zeleno za os a , raspon boja žuto-plavo za os b , te kao treća akromatska os L sa vrijednosti u rasponu od 0 % (crna) do 100 % (bijela) (slika 4).



Slika 4. CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja (prema Ly, 2020)

Brojčane vrijednosti u CIE $L^*a^*b^*$ kolornom sustavu prikazuju sve boje koje ljudsko oko može primijetiti (Petrović i sur., 2013). Kolorimetrijska razlika prikazuje odstupanje reflektirane boje od kontrole, a računa se prema izrazu [1]:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} , \quad [1]$$

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

gdje su:

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

L_1, a_1, b_1 - vrijednosti ispitivanoga uzorka boje

Postupak:

Boja pripremljenih filmova LK, PK i K određena je pomoću kolorimetra (Konica Minolta Spectrophotometer CM700d, SAD). Za svaki pojedinačni film mjerenje je provedeno na tri različita mjesta na filmu pri čemu su dobivene L^* , a^* i b^* vrijednosti. Pri mjerenju uzorak filma namjesti se na površinu otvora kolorimetra te se mjeri reflektiranje u vidljivom području. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.3.5. Mjerenje nepropusnosti za svjetlost jestivih filmova

Nepropusnost jestivog filma za svjetlost (engl. *opacity*) utvrđena je na način da je pomoću UV/VIS spektrometra (Perkin Elmer Lambda 25, SAD) mjerena apsorbanacija uzoraka LK, PK i K pri valnim duljinama od 600 nm i 650 nm, prema Peng i sur. (2013). Iz podatka o apsorbanaciji, nepropusnost filma za svjetlost računa se prema jednadžbi [2]:

$$O = Abs_{(nm)} / l \quad [2]$$

gdje su:

O – nepropusnost

Abs – apsorbanacija (vrijednost kod 600 nm i 650 nm)

l - debljina (mm)

Spektrometar mjeri količinu svjetlosti koju uzorak apsorbira. Što je veća vrijednost apsorbanacije to je veća nepropusnost filma (O) za svjetlost, odnosno film je netransparentniji.

3.3.6. Određivanje topljivosti jestivog filma

Topljivost jestivog filma je količina suhe tvari tog filma otopljena u destiliranoj vodi. Topljivost filma (FS) računa se pomoću jednadžbe [3]:

$$FS(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

FS – topljivost filma (%)

W_i – početni sadržaj suhe tvari (g)

W_f – masa suhe tvari neotopljene u vodi (g)

Jestivi filmovi LK, PK i K čuvani su u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (50 % RH). Svaki od uzoraka filma LK, PK i K izrezan je na tri jednaka pravokutnika (1 cm x 2 cm) koji se svaki stavi u plastičnu čašu sa 30 mL destilirane vode. Posude se prekriju parafilmom i ostave 24 h na sobnoj temperaturi. Aluminijska posudice i njihovi poklopci stave se 24 h u sušionik na 105 °C do postizanja konstantne mase. Nakon 24 h, neotopljeni ostaci jestivih filmova pomoću sita se izvade iz vode i stavljaju u ohlađene aluminijske posudice te se zajedno izvažu. Nakon toga, aluminijske posudice sa ostatkom jestivog filma stave se djelomično poklopljene sušiti u sušionik na 105 °C do postizanja konstante mase. Na kraju izvagana je masa aluminijskih posudica s poklopcem i ostatkom suhe tvari jestivog filma u njima.

3.3.7. Mikroskopski pregled jestivih filmova

Mikroskopski pregled jestivih filmova proveden je korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Olympus CH20, Japan) primjenom povećanja 100x.

3.3.8. Određivanje mehaničkih svojstava jestivih filmova

Mehanička svojstva jestivih filmova LK, PK i K određena su pomoću analizatora teksture (Texture analyzer, TA.HDPlus, Stable Micro Systems, UK). Jestivi filmovi su prije mjerenja čuvani u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (50 % RH). Za potrebe mjerenja svaki od filmova izrezan je u tri trakice dimenzija 3 cm x 1 cm. Svaka trakica stavljena je u analizator strukture. Mjerenje se provodi do točke pucanja. Za svaki film, mjerenje je provedeno 3 puta.

Vlačna čvrstoća (TS) može se definirati kao naprezanje, odnosno omjer sile na površinu filma, a završno naprezanje predstavlja produljenje filma prije točke pucanja (postiže se F_{max}), što označava deformaciju na granici elastičnosti. Distanca, odnosno elastičnost do trenutka pucanja filma služi za računanje postotka produljenja prije pucanja, odnosno postotka deformacije (E) (distanca podijeljena s udaljenošću između dvije čeljusti, koja iznosi 10 mm). Vlačna čvrstoća (TS) računa se prema jednadžbi [4], dok se Youngov modul (YM) računa prema jednadžbi [5]:

$$TS = \frac{F_{max}}{A_i} \quad [4]$$

$$YM = \frac{TS}{E} \quad [5]$$

gdje je:

TS – vlačna čvrstoća ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$)

F_{max} – maksimalna sila u točki pucanja (N)

A_i – površina filma (mm^2)

YM – Youngov modul ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$)

E – postotak produljenja prije pucanja

3.3.9. Mjerenje propusnosti jestivih filmova za kisik i ugljični dioksid

Mjerenje propusnosti jestivih filmova LK, PK i K za kisik i ugljični dioksid provedene su manometrijskom A-metodom, pomoću uređaja za mjerenje propusnosti Brugger, GDP-C (Brugger Feinmechanik GmbH, Munich, Njemačka). Prvo je mjerena propusnost za kisik na sva tri filma, a zatim za ugljični dioksid.

Temperatura svakog uzorka podešena je pomoću vodene kupelji na vrijednost sobne temperature ($23\text{ }^\circ\text{C}$). Podešena je i brzina protoka plina ($80\text{ cm}^3 / \text{min}$). Uzorak filma stavi se na ploču koja je prethodno premazana protuvakumskom kremom. Prije svakog mjerenja provodi se vakumiranje 30 min, s tim da vrijeme trajanja ovisi o vrsti mjenog materijala. Metoda se zasniva na propuštanju plina kroz uzorak dok se atmosferski tlak ne izjednači s tlakom u komori. Zbog razlike tlakova plin difundira kroz uzorak što je vidljivo kao postepeni porast tlaka koji se registrira na računalu. Na računalu su podaci zabilježeni kao vrijednost permeance (izražena u $\text{cm}^3\text{ m}^{-2}\text{ d}^{-1}\text{ bar}^{-1}$). Brzina prijenosa kisika (engl. *Oxygen Transmission Rate* – OTR) i brzina prijenosa ugljičnog dioksida (engl. *Carbon Dioxide Transmission Rate* – COTR) izračunata je kao aritmetički produkt dobivene permeance i srednje vrijednosti debljine filma (izražena u $\text{cm}^3\text{ m}^{-1}\text{ d}^{-1}\text{ Pa}^{-1}$). Koeficijent propusnosti plina (P) dobije se koristeći jednadžbu [6]:

$$P = D \cdot S \quad [6]$$

gdje je:

D – koeficijent difuzije permeata

S – koeficijent topljivosti permeata

3.3.10. Mjerenje propusnosti jestivih filmova za vodenu paru

Propusnost jestivih filmova LK, PK i K za vodenu paru određena je gravimetrijski koristeći modificiranu ASTM E96-80 standardnu metodu. Prije mjerenja, uzorci su bili čuvani u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (50 % RH). Za svaki jestivi film provedena su 4 mjerenja te su izrezana 4 kruga promjera čašice. U čašicu se stavi 20 mL destilirane vode, rub se premaže se protuvakumskom kremom, a na vrh čašice se stavi neoštećeni uzorak filma koji se pričvrsti teflonskim prstenom i zaklopi.

Početna masa pripremljenih čašica izmjerena je na analitičkoj vagi, a zatim su pohranjene u ventiliranu klima komoru (Mettler HPP110, Mettler Njemačka) na 25 °C i 30 % RH. Masa čašica mjerena je kontinuirano kroz sljedećih 8 dana. WVP možemo izračunati pomoću formule [7]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [7]$$

gdje je:

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

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

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

x – debljina filma (m)

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

3.3.11. Mjerenje relativne vlažnosti jestivih filmova

Relativna vlažnost određena je žarenjem u uređaju za mjerenje vlage (PMB 53, Adam Equipment Co Ltd, UK). Po tri uzorka filmova K, PK i LK su usitnjeni i zasebno stavljeni u uređaj za mjerenje vlage na 100 °C. Za svaki uzorak zabilježen je postotak relativne vlage, nakon što je uređaj signalizirao završetak procesa žarenja.

3.4. OBRADA PODATAKA

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu su pripremljeni jestivi kompozitni filmovi na bazi prirodnog biopolimera kitozana i glicerola uz dodatak praha 100 % proteina konoplje (PK), odnosno praha suhog lista konoplje (LK). Radi usporedbe, a radi utvrđivanja utjecaja praha proteina konoplje i praha suhog lista konoplje na svojstva filma, pripremljen je i kompozitni jestivi film od kitozana i glicerola bez dodatka praha proteina konoplje, odnosno praha suhog lista konoplje (K).

Provedena je karakterizacija i ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstva (pH vrijednost, viskoznost, debljina, boja, transparentnost, topljivost, mehanička svojstva i relativna vlažnost) sve tri pripremljene vrste filmova, mikroskopski pregled filmova svjetlosnim mikroskopom, kao i određivanje barijernih svojstava filmova, konkretno njihova propusnost za kisik, ugljični dioksid i vodenu paru. Određivanje pH vrijednosti i mjerenje viskoznosti provedeno je na filmogenim otopinama, a ostala mjerenja provedena su na čvrstim filmovima. Dobiveni rezultati su prikazani grafički i tablično.

Izmjerene pH vrijednosti filmogenih otopina prikazane su u tablici 2, a vrijednosti viskoznosti ispitanih filmogenih otopina na slici 5. Dobivene vrijednosti debljine filmova prikazane su u tablici 3. Ispitivani parametri boje zabilježeni su u tablici 4, dok su rezultati mjerenja nepropusnosti za svjetlost pri 600 nm i 650 nm prikazane grafički na slici 6. Rezultati mjerenja topljivosti prikazani su na slici 7, rezultati relativne vlažnosti prikazani u tablici 5. Slike 8, 9 i 10 daju uvid u barijerna svojstva filmova (propusnost vodene pare/ propusnost kisika/ propusnost ugljičnog dioksida), dok su rezultati mjerenja mehaničkih svojstava prikazani u tablici 6 te na slici 11. Rezultat mikroskopskog pregleda filmova dan je na slici 12.

4.1. pH VRIJEDNOST FILMOGENIH OTOPINA

Sve filmogene otopine očekivano su kisele, s pH nižim od 7, obzirom da je u njihovoj pripremi korištena 1 % (v/v) otopina octene kiseline kako bi se omogućilo otapanje kitozana. Izmjerene pH vrijednosti filmogenih otopina K, LK i PK prikazane su u tablici 2. Filmogene otopine K i LK pokazuju slične vrijednosti pH (4,95 i 4,98) dok je filmogena otopina PK nešto nižeg pH (4,88). Razlog zbog kojeg filmogena otopina PK pokazuje pH koji je niži od druge dvije otopine može biti posljedica reakcije aminokiselina iz proteina konoplje (glutaminska

kiselina, arginin, metionin i cistein (Sun i sur., 2021)). Filmogena otopine K i LK pokazuju sličan pH jer u obje otopine dominiraju polisaharidi (kitozan, odnosno kitozan i celuloza).

Tablica 2. Prikaz izmjerenih pH vrijednosti filmogenih otopina kitozana, lista konoplje i proteina konoplje

Uzorak	pH
K	4,95 ± 0,02 ^a
LK	4,98 ± 0,01 ^a
PK	4,88 ± 0,04 ^b

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

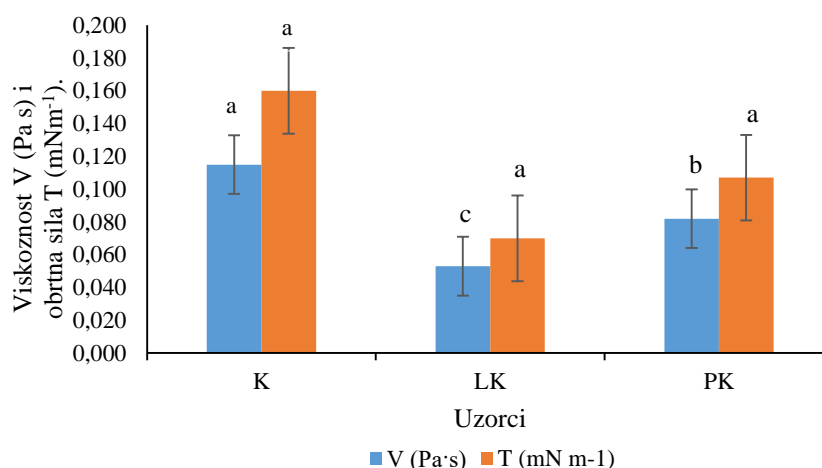
4.2. VISKOZNOST FILMOGENIH OTOPINA

Kod tekućina u mirovanju ne javljaju se nikakve sile trenja između različitih slojeva tekućine, odnosno tekućina u mirovanju predstavlja homogeno tijelo, kojemu su sva fizikalna svojstva jednaka u svim smjerovima u svakom djeliću tijela. Međutim, u tekućini koja se kreće javljaju se sile trenja između djelića koji su u dodiru, jer pojedini njeni slojevi klize jedni po drugima. Isto tako, sila trenja javlja se između djelića tekućine i zidova (stjenki) posude ili cijevi u kojoj se tekućina kreće. Taj otpor koji se javlja u unutrašnjosti tekućine uslijed trenja pri kretanju njihovih čestica zove se unutrašnje trenje ili viskoznost (Jerbić, 2014). Posljedica je djelovanja međumolekulskih sila kohezije u fluidu i sila adhezije između fluida i krutog tijela kroz koje se strujanje odvija.

Na slici 5 grafički su prikazane vrijednosti izmjerenih viskoznosti i obrtne sile ispitanih otopina iz koje se može vidjeti da filmogena otopina K koja sadrži samo kitozan i glicerol pokazuje najveću vrijednost viskoznosti i obrtne sile. Filmogene otopine LK i PK pokazuju niže vrijednosti i viskoznosti i obrtne sile. Veća vrijednost viskoznosti i obrtne sile za filmogenu otopinu K vjerojatno je posljedica djelovanja vodikovih veza unutar i između molekula kitozana (Balau i sur., 2004) zbog kojih su kohezivne sile unutar otopine jače izražene, što navode i Muñoz-Tebar i sur. (2023) ističući da je jedna od karakteristika filmova s kitozonom upravo kohezivnost.

S druge strane, protein konoplje u filmogenoj otopini s kitozonom PK vrlo vjerojatno dovodi do stvaranja novog polisaharid-protein kompleksa, koji narušava vodikove veze između

molekula kitozana te uzrokuje slabljenje kohezionih sile u filmogenoj otopini što se manifestira nešto nižom vrijednosti viskoznosti i obrtne sile. Navedeno može biti posljedica sastava aminokiselina koje prevladavaju u proteinu konoplje, a to su arginin, glutaminska kiselina, glutamin i metionin (Sun i sur., 2021), a koje se kod izmjerene vrijednosti pH ove otopine od 4,88, ponašaju kao „zwitter ioni“ tj. bipolarne su te tako s kitozansom koji je pozitivno nabijen (NH^+) polisaharid, stvaraju strukturu unutar koje istovremeno postoje i privlačne i odbojne ionske sile. Što se tiče filmogene otopine LK, u kojoj nalazimo kitozan i list konoplje, izmjerena je najniža vrijednost viskoznosti i obrtne sile što se može objasniti stvaranjem kompleksa između kitozana i spojeva prisutnih u listu konoplje (polisaharid celuloza, terpeni, polifenoli, kanabinoidi i alkaloidi) zbog čega dolazi do narušavanja vodikovih veza između i unutar molekula kitozana te posljedično i slabljenja kohezione sile unutar otopine što rezultira i nižom vrijednošću viskoznosti i obrtne sile. Slično je pokazano i analizom svojstava filmova s kitozansom u odnosu na filmove s kitozansom i gumom arabikom te ekstraktima sjemenki grožđa koje je analizirala Bionda (2021).



Slika 5. Prikaz rezultata za viskoznost V ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) i obrtnu silu T (mN m^{-1}) filmogenih otopina

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje;

4.3. DEBLJINA JESTIVIH FILMOVA

Debljina filmova važna je za njihova mehanička i barijerna svojstva. Sva tri filma K, LK i PK pripremljena su na isti način, izlivanjem jednake količine filmogene otopine u Petrijeve zdjelice istog promjera. No unatoč tome, dobiveni filmovi imaju različitu debljinu koje su

prikazane u tablici 3. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da film koji sadrži samo kitozan ima izmjerenu najmanju debljinu od 73 μm , dok film s kitozansom i listom konoplje ima debljinu 87 μm , a film s kitozansom i proteinom konoplje najveću debljinu od 110 μm .

Jridi i sur. (2014) su ispitivali fizikalna, strukturna, antioksidativna i antimikrobna svojstva kompozitnih filmova na bazi kitozana i proteina želatine te su pokazali da veći postotak želatine u sastavu filma uzrokuje i veću debljinu tog filma. Iz navedenog je zaključeno da proteini doprinose povećanju debljine kompozitnog filma. Slično tome se mogu ponašati i proteini konoplje, što može biti razlog zašto je debljina PK filma najveća.

Tablica 3. Debljina pripremljenih kompozitnih filmova

Uzorak	Debljina filma (μm)
K	73,0 \pm 4,58 ^b
LK	87,0 \pm 13,0 ^{ab}
PK	110,3 \pm 10,69 ^a

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

4.4. BOJA JESTIVIH FILMOVA

Boja jestivih filmova određena je CIE $L^*a^*b^*$ prostornim modelom boja. Rezultati analize kolorimetrijskih parametara na uzorcima K, LK i PK prikazani su u tablici 4. Vrijednosti dobivenih kolorimetrijskih parametara se razlikuju ovisno o vrsti filma, odnosno prisutnosti proteina konoplje i lista konoplje u sastavu filma. Vrijednost za parametar L^* ukazuje na svjetlinu filma, pri čemu je vrijednost 0 tamno (crno), a 100 svjetlo (bijelo). U usporedbi s filmom koji sadrži samo kitozan K, filmovi s listom konoplje LK i proteinom konoplje PK su očekivano tamniji, jer su obojili film. Stoga su vrijednost za parametar L^* filma s listom konoplje LK koji iznosi 80,203, odnosno za film s proteinom konoplje PK koji iznosi 85,453 niže u odnosu na vrijednost za film koji sadrži samo kitozan K za koji ta vrijednost iznosi 96,007. Vrijednosti parametra L^* za film s kitozansom K odgovaraju vrijednostima koje su u svom radu opisali Gomes i sur. (2019).

Parametar a^* ukazuje na raspon boja crveno-zeleno. Dobivena vrijednost parametra a^* za sva tri filma je negativna što ukazuje na zelenkastu boju filma. Vrijednost za film s kitozansom K iznosi -0,72, a za film s kitozansom i proteinom konoplje PK -0,44 što znači da su ova dva filma vrlo slično obojena i to tek blago zelenkasto. Vrijednosti parametra a^* za film s listom

konoplje LK iznosi -2,523 što, očekivano, ukazuje na jače zeleno obojen film obzirom na njegov sastav i prisutnost lisnih bojila, među kojima je najzastupljeniji klorofil.

Parametar b^* ukazuje na raspon boja žuto-plavo. Vrijednosti parametara za sva tri filma su pozitivni što ukazuje na prisutnost žutih tonova u filmovima, s time da je, opet očekivano, vrijednost za film s listom konoplje LK najveća i iznosi 17,966 obzirom na prisutnost lisnih bojila koja osim klorofila uključuju i karoten te ksantofil.

Ukupna razlika boje za filmove s listom konoplje LK i proteinom konoplje PK računata je u odnosu na kontrolni uzorak tj. film s kitozonom K te ona za LK iznosi 20,455, a za PK 11,558.

Tablica 4. Parametri boje (L^* , a^* , b^* , ΔE) pripremljenih kompozitnih filmova

Uzorak	L^*	a^*	b^*	ΔE
K	$96,007 \pm 0,536^a$	$-0,720 \pm 1,248^{ab}$	$3,150 \pm 6,245^b$	0
LK	$80,203 \pm 0,536^b$	$-2,523 \pm 0,042^b$	$17,966 \pm 0,414^a$	$20,455 \pm 1,583^a$
PK	$85,453 \pm 1,778^b$	$-0,440 \pm 0,381^a$	$7,823 \pm 0,121^b$	$11,558 \pm 1,692^b$

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

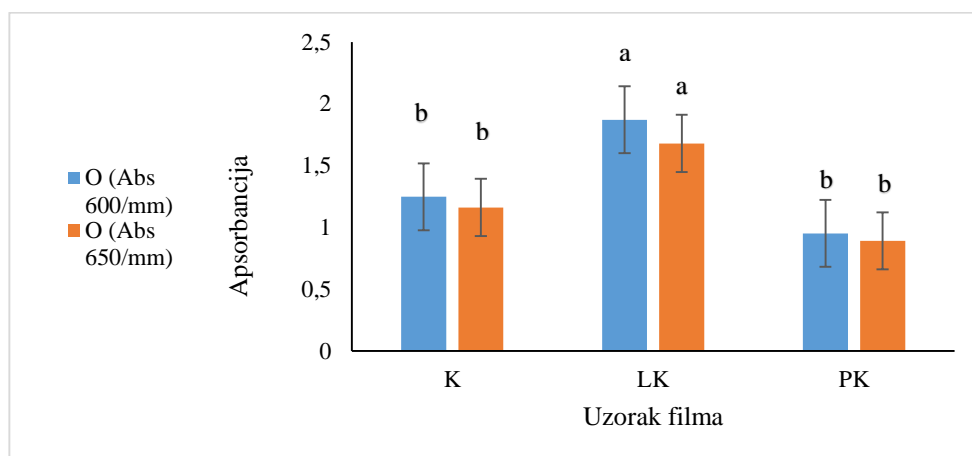
K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

4.5. TRANSPARENTNOST JESTIVIH FILMOVA

Propusnost filma za svjetlost važna je karakteristika koja određuje njegovu prikladnost kao ambalažnog materijala. Niska propusnost za svjetlost, odnosno veća neprozirnost jamči veću zaštitu proizvoda od negativnih učinaka svjetlosti te tako sprječava neželjene posljedice procesa fotooksidacije. Stoga je poželjno da su jestivi filmovi kao ambalažni materijali što nepropusniji za svjetlost. Što je vrijednost nepropusnosti (O) veća, to je manja transparentnost filma, odnosno film apsorbira više svjetlosti nego što je propušta prema proizvodu kojeg treba štititi. Dobiveni rezultati mjerenja nepropusnosti za svjetlost (O) prikazani su grafički na slici 6. Rezultati pokazuju da je za svjetlost najnepropusniji film s listom konoplje LK te njegova nepropusnost pri 600 nm iznosila 1,87, a pri 650 nm 1,679. Navedeno se može potkrijepiti i rezultatima do kojih su došli Friesen i sur. (2015) koji navode da dodatak aktivnih sastojaka dovodi do smanjenja transparentnosti filma. Također, navedeno potvrđuju i Peng i sur. (2013), prema kojima filmovi na bazi kitozana kojima je dodan ekstrakt čaja ili esencijalno ulje cimeta pokazuju povećane vrijednosti neprozirnosti u odnosu na film koji sadrži samo kitozan.

Film s kitozonom K pokazao se nepropusnijim za svjetlost od filma s kitozonom i proteinom konoplje PK, a na takvu mogućnost ukazuju Huang i Wang (2023) koji su istraživali propusnost

za svjetlost filmova sa kitozanom i proteinom želatinom te su utvrdili da veća koncentracija kitozana u odnosu na protein uzrokuje i veću nepropusnost za svjetlost.



Slika 6. Vrijednost nepropusnosti filmova K, LK i PK pri 600 nm i 650 nm

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

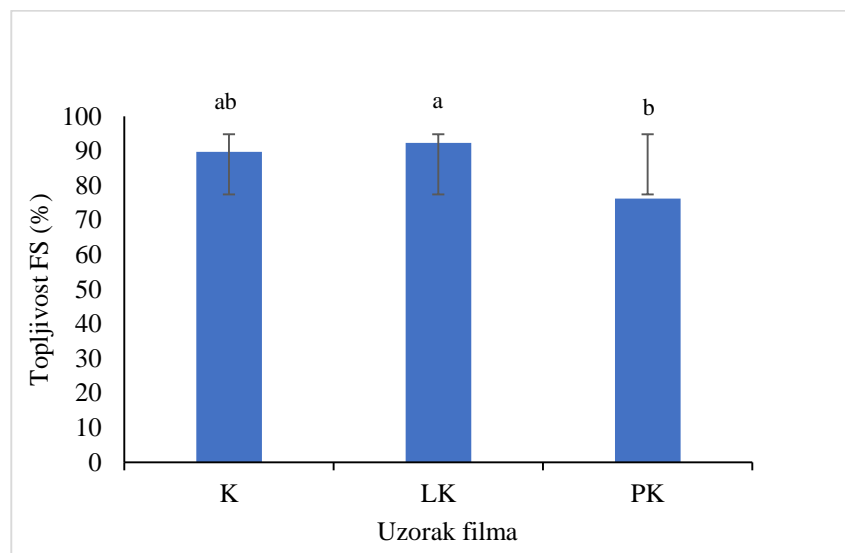
K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Prema dobivenim rezultatima film s listom konoplje LK pokazuje najveću nepropusnost za svjetlost, odnosno najmanju transparentnost što se može pripisati sastavu lista konoplje i njegovim biljnim bojilima kao što su klorofil te karotenoidi (karoten i ksantofil) koji snažno apsorbiraju svjetlost. Primjena neprozirnih filmova može spriječiti oksidacijske promjene u pakiranoj hrani uzrokovane utjecaju vidljive i ultraljubičaste svjetlosti (Sogut i Seydim, 2018).

4.6. TOPLJIVOST JESTIVIH FILMOVA

Topljivost jestivih filmova u vodi jedno je od važnih svojstava na koje treba obratiti pozornost. Topivost u vodi je važna, jer film treba zaštititi namirnicu, no ako je on topiv u vodi, a namirnica ima visoki sadržaj vode to može uzrokovati njegovo otapanje i gubitak zaštitne funkcije. Veća topljivost u vodi uzrokuje slabiju otpornost na vodu (Atef i sur., 2014). Rezultati određivanja topljivosti filmova K, LK i PK prikazani su na slici 7. Rezultat pokazuje da su film s kitozanom K i film s kitozanom i listom konoplje LK podjednako topivi u vodi odnosno film LK je nešto topiviji (K – 89,7 % i LK – 92,3 %), a oba filma pokazuju veću topivost od filma s kitozanom i proteinom konoplje PK (76,1 %). Nešto veća topivost filma s kitozanom i listom konoplje LK može biti posljedica utjecaja spojeva iz lista konoplje (poput fenola i terpena), jer

rezultati dobiveni u znanstvenom radu Wanga i suradnika (2013) pokazuju da se topljivost filma povećava s dodatkom ekstrakta koji sadrži polifenole.



Slika 7. Rezultati topljivost (FS, %) uzoraka filmova (K, LK i PK) u vodi

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Također, Jridi i sur. (2014) te Huang i Wang (2023) su pokazali da dodavanje kitozana u film s proteinom smanjuje topivost. Slabija topivost filma s kitozanom i proteinom konoplje PK od topivosti filma s kitozanom K može se objasniti specifičnim sastavom proteina konoplje, u čijem sastavu prevladavaju aminokiseline: glutaminska kiselina, arginin, metionin i cistein (Sun i sur., 2021). Obzirom da se u sastavu proteina nalazi i metionin koji ima hidrofobnu tioestersku bočnu skupinu, to može doprinijeti slabijoj topljivosti ovog filma u odnosu na kitozanski film K.

4.7. RELATIVNA VLAŽNOST JESTIVIH FILMOVA

Za potrebe utvrđivanja karakteristika filmova s kitozanom K, kitozanom i listom konoplje LK te kitozanom i proteinom konoplje PK, rađena je i analiza relativne vlažnosti filmova. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Relativna vlažnost filmova K, LK i PK

Uzorak	Relativna vlažnost (%)
K	22,40 ± 0,40 ^a
LK	20,85 ± 0,06 ^b
PK	20,66 ± 0,31 ^b

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Iz rezultata je vidljivo da nešto veću relativnu vlažnost ima film s kitozansom K (22,4 %) dok je relativna vlažnost filmova s listom konoplje LK i proteinom konoplje PK nešto niža i iznosi 20,85 %, odnosno 20,66 %. Dobiveni rezultati dosta dobro odgovaraju dobivenim rezultatima topljivosti filmova, gdje je pokazano da su film s kitozansom K i film s listom konoplje LK topiviji u vodi od filma s proteinom konoplje PK.

Bourbon i sur. (2011) navode da ugradnja bioaktivnih spojeva (poput polifenola) u kitozanske filmove dovodi do povećanja sadržaja vlage, što se može objasniti porastom broja nabijenih molekula, koje imaju veću sposobnost adsorpcije vode. Obzirom da je za film s kitozansom i listom konoplje LK izmjerena niža relativna vlažnost od filma s kitozansom K, moguće je da je dodavanjem praha suhog lista konoplje u film s kitozansom došlo do promjena u strukturi zbog kojih je dio vode izgubljen, a relativna vlažnost je nešto niža od očekivane.

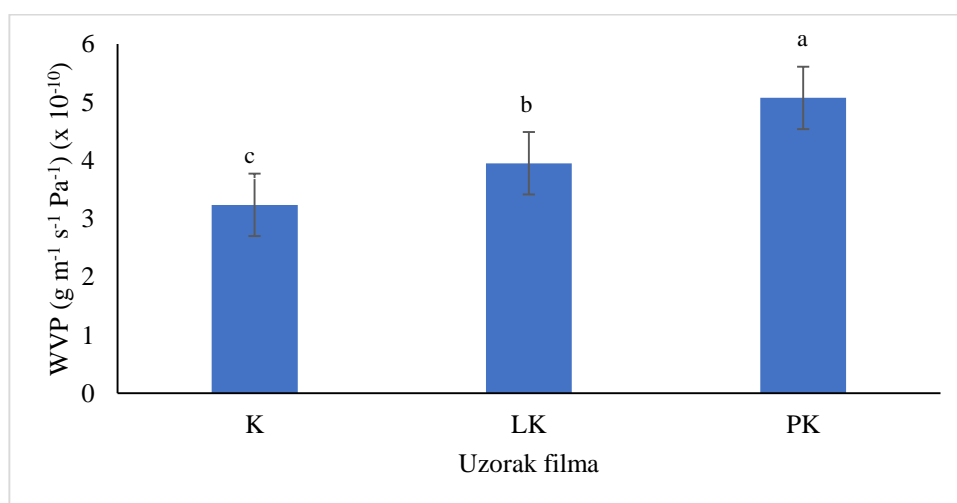
Također, prema Bourbonu i sur. (2011) hidrofilitnost je direktno povezana s udjelom vlage, odnosno hidrofilni filmovi imaju viši udio relativne vlažnosti. U skladu s time, za film s kitozansom i proteinom konoplje izmjerena je najniža vrijednost relativne vlažnosti, što se može povezati sa sastavom proteina konoplje koji sadrži aminokiselinu metionin koja ima hidrofobnu tioestersku bočnu skupinu.

4.8. PROPUSNOST NA VODENU PARU, KISIK I UGLJIČNI DIOKSID

Propusnost jestivih filmova za vodenu paru bi trebala biti što niža, jer je jedan od glavnih ciljeva korištenja jestivog filma kao ambalažnog materijala usporavanje prijenos vlage između

hrane i okoliša. Interakcije između molekula biopolimera od kojeg je izgrađen jestivi film i molekula vode osnova su za procjenu permeacije vode kroz film, koja se obično dešava kroz hidrofilni dio filma (Bourbon i sur., 2011). Niža vrijednost WVP znači bolja barijera filma na vodenu paru (Atef i sur., 2015). Također, propusnost jestivih filmova za kisik vrlo je važna za očuvanje hrane, budući da je kisik ključni čimbenik koji može izazvati oksidaciju koja pokreće nekoliko reakcija kvarenja. Polisaharidni filmovi po svojoj prirodi, predstavljaju dobru barijeru za kisik jer je njihova mreža vodikovih veza čvrsto zbijena i raspoređena (Bourbon i sur., 2011). Polisaharidi i proteini su polimeri koji mogu formirati snažne međumolekulske veze što posljedično stvara dobru barijeru za plinove (CO_2 i O_2) (Andrade i sur., 2012).

Rezultati mjerenja WVP filma s kitozonom K, filma s kitozonom i listom konoplje LK te filma s kitozonom i proteinom konoplje PK, prikazani su na slici 8. Iz rezultata je vidljivo da film s kitozonom K ima najmanju vrijednost WVP, film s kitozonom i listom konoplje LK ima nešto veću vrijednost, a film s kitozonom i proteinom konoplje najveću vrijednost propusnosti za vodenu paru. To znači da je od ova tri filma, film s kitozonom najbolja barijera za vlagu. Jridi i sur. (2014) te Huang i Wang (2023) su pokazali da filmovi sa visokim postotkom proteina želatine pokazuju i više vrijednosti WVP u odnosu na filmove s većim udjelom kitozana, odnosno da dodavanje kitozana u film smanjuje propusnost filma za vodenu paru. Navedeno se objašnjava prisutnošću hidrofilnih aminokiselina u sastavu želatine. Stoga, primjenjujući analogiju i film s kitozonom i proteinom konoplje, zbog složenog sastava proteina konoplje i prisutnosti hidrofilnih aminokiselina (cistein), ima višu vrijednost WVP u odnosu na film koji sadrži samo kitozan.

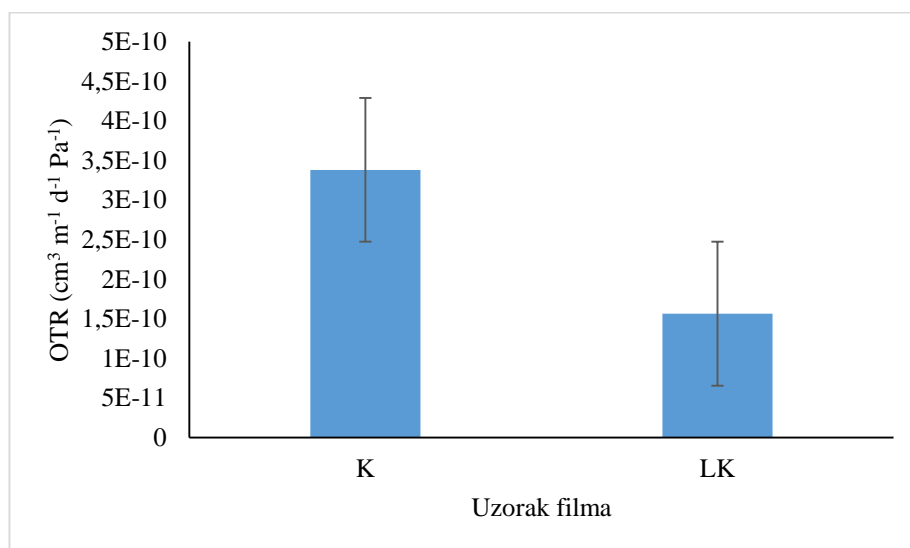


Slika 8. Propusnost vodene pare (WVP) uzoraka filmova K, LK i PK

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

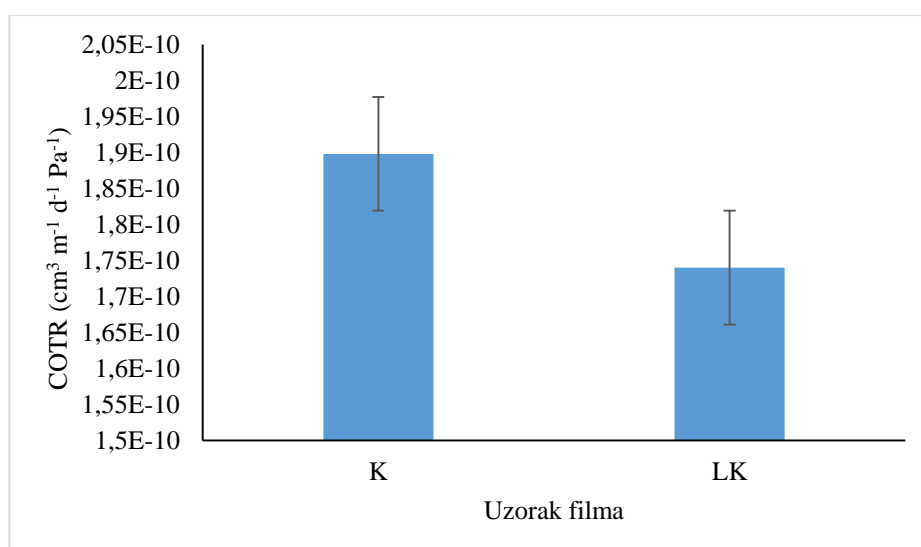
K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Rezultati mjerenja OTR filma s kitozonom K i filma s kitozonom i listom konoplje LK, prikazani su na slici 9, a rezultati mjerenja COTR filma s kitozonom K i filma s kitozonom i listom konoplje LK, prikazani su na slici 10. U oba slučaja nije bilo moguće analizirati propusnost za film s kitozonom i proteinom konoplje PK, jer je taj film pucao i nije se mogao iskoristiti.



Slika 9. Propusnost kisika (OTR) uzoraka filmova K i LK

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.



Slika 10. Propusnost ugljičnog dioksida (COTR) uzoraka filmova K i LK

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Obzirom da su rezultati mjerenja OTR i COTR za oba filma vrlo niski (reda veličine 10^{-10}

¹⁰⁾ to znači da su filmovi K i LK gotovo nepropusni za kisik i ugljični dioksid. Navedeno je u skladu s Bourbonom i sur. (2011) koji navode da polisaharidni filmovi po svojoj prirodi, predstavljaju dobru barijeru za kisik jer je njihova mreža vodikovih veza čvrsto zbijena i raspoređena.

Viša vrijednost OTR znači veću propusnost za kisik, a viša vrijednost COTR znači veću propusnost za ugljični dioksid. Rezultati mjerenja pokazuju da je film s kitozanom K ima više od dvostruko veću vrijednost OTR i vrijednost COTR, što znači i veću propusnost za kisik, odnosno veću propusnost za ugljični dioksid, u odnosu na film s kitozanom i listom konoplje LK.

Obzirom da neki autori navode da antioksidansi kao što su ferulična kiselina i ekstrakt propolisa dovode do smanjenja propusnosti kitozanskih filmova na kisik zbog interakcije između aktivne komponente i polimera (Aljawish i sur., 2016; Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016), moguće je da bioaktivne tvari u listu konoplje, među kojima su i neki antioksidansi, dovode do uočenog smanjenja OTR i COTR kod filma s kitozanom i listom konoplje LK u odnosu na film s kitozanom K.

Prilikom provođenja ANOVA testa na rezultate propusnosti za kisik (OTR) i propusnosti za ugljični dioksid (COTR), test je pokazao da su vrijednost srednjeg kvadrata pogreške te varijance parametara jednake nuli, stoga nije bilo moguće usporediti odstupanja. Iz navedenog se može zaključiti da model savršeno odgovara podacima, odnosno da nije utvrđena statistička pogreška.

4.9. MEHANIČKA SVOJSTAVA JESTIVIH FILMOVA

Mehanička svojstva jestivih filmova važna su karakteristika koja određuje njihovu otpornost i sposobnost čuvanja proizvoda. Promatran je učinak dodavanja usitnjenog lista konoplje, odnosno proteina konoplje na mehanička svojstva kitozanskog filma te su u tu svrhu za film s kitozanom K, film s kitozanom i listom konoplje LK te film s kitozanom i proteinom konoplje određena tri parametra: vlačna čvrstoća (TS) koja označava maksimalnu silu koja se može primijeniti na površinu filma, postotak produljenja prije pucanja (E) te Youngov modul (YM). Rezultati su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Vlačna čvrstoća (TS), postotak produljenja prije pucanja (E) i Youngov modul (YM) uzoraka filmova K, LK i PK

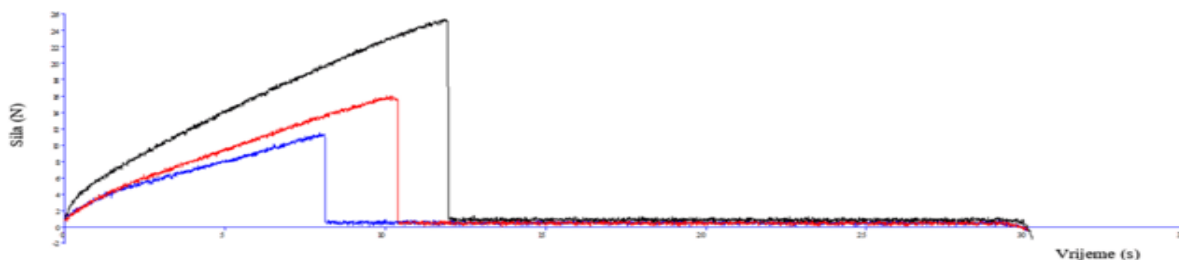
Uzorak filma	TS (MPa)	E (%)	YM (MPa)
K	23,656±11,124 ^a	92,10±44,99 ^a	27,073±6,631 ^a
LK	12,282±1,747 ^a	73,61±10,93 ^a	16,698±0,248 ^b
PK	13,974±1,105 ^a	98,98±17,41 ^a	14,297±1,563 ^b

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

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Prema dobivenim rezultatima, najveću vlačnu čvrstoću (TS) pokazao je film s kitozonom K (23,656 MPa), no istovremeno taj film pokazao je i najmanju elastičnost. U skladu s time, i vrijednost Youngovog modula (YM) je znatno veća kod filma s kitozonom K, nego kod druga dva ispitivana filma. Navedeno se u velikoj mjeri poklapa s nalazima Huanga i Wanga (2023) koji su pokazali da film samo s kitozonom pokazuje gotovo dvostruko veću vrijednost vlačne čvrstoće (TS) u odnosu na film koji sadrži samo protein želatinu, što se po analogiji može primijeniti i na rezultate u ovom istraživanju. Također, Bourbon i sur. (2011) su pokazali da dodatak bioaktivnih tvari u kitozanski film smanjuje vlačnu čvrstoću te povećava elastičnost. Navedeno objašnjava i najnižu izmjerenu vrijednost vlačne čvrstoće za film LK s kitozonom i listom konoplje, vjerojatno radi sadržaja bioaktivnih spojeva poput terpena i polifenola.

Na slici 11 prikazane su krivulje pucanja najreprezentativnijih uzoraka filma K, LK i PK iz kojih je vidljivo da filmovi pucaju u trenutku postizanja F_{max} što je upravo karakteristično za biomaterijale, a upućuje i na ravnomjernu raspodjelu čestica dodanih spojeva iz lista konoplje, odnosno proteina konoplje u strukturi kitozanskih filmova.



Slika 11. Krivulje pucanja filmova pri postizanju F_{max} za uzorke K (crna linija), LK (plava linija) i PK (crvena linija)

K – kitozan; LK – list konoplje; PK – protein konoplje.

Najveću vrijednost postotka produljenja prije pucanja (E) pokazao je film s kitozanom i proteinom konoplje PK (98,983 %) što se može potkrijepiti nalazima Nowzari i sur. (2013) koji navode da filmovi s kitozanom i želatinom pokazuju poboljšana mehanička svojstva u odnosu na filmove izrađene od pojedinačnih komponenti.

4.10. MIKROSKOPSKI PREGLED FILMOVA

Mikroskopski pregled jestivih filmova s kitozanom K, s kitozanom i listom konoplje LK te kitozanom i proteinom konoplje PK prikazan je na slici 12. Vidljivo je da su filmovi K i PK prozirniji i žućkasto obojeni, dok je film LK više zelenkasto obojen i manje proziran te su u njemu vidljivi intenzivnije zeleno obojeni dijelovi, vjerojatno nakupine kloroplasta.



Slika 12. Mikroskopski pregleda filmova s kitozanom (K), kitozanom i listom konoplje (LK) te kitozanom i proteinom konoplje (PK) (*vlastita fotografija*)

Mikroskopski vidljivo obojenje i prozirnosti filmova odgovaraju rezultatima dobivenim analizom obojenosti filmova i analizom apsorbancije.

5. ZAKLJUČCI

1. Izmjereni pH svih filmogenih otopina pokazuje da su otopine kisele, što je posljedica njihove pripreme s octenom kiselinom. Filmogena otopina PK je najkiselija zbog prisutnih aminokiselina iz proteina konoplje.
2. Dodavanje lista konoplje i proteina konoplje utječe na viskoznost te su filmogene otopine LK i PK značajno manje viskozne od filmogene otopine K, a također pokazuju i manju obrtnu silu.
3. Prisutnost lista konoplje i proteina konoplje u sastavu filma, povećava njegovu debljinu te one iznose 87,0 μm (LK) odnosno 110,3 μm (PK) u odnosu na 73,0 μm (K).
4. Film s listom konoplje LK je tamniji (niža vrijednost parametra L^*) u odnosu na filmove s kitozansom K te kitozansom i proteinom konoplje PK. Sva tri filma su zeleno-žute boje (negativna vrijednost parametra a^* i pozitivna vrijednost parametra b^*), a film LK pokazuje najveću vrijednost žutog parametra b^* .
5. Propusnost filma za svjetlost ovisi o sastojcima koji su dodani u kitozanski film. Dodatak lista konoplje značajno smanjuje propusnost za svjetlost (niže O_{600} i O_{650}), dok je dodatak proteina konoplje nešto povećao propusnost za svjetlost (više vrijednosti O).
6. Topljivost filma s kitozansom K (89,7 %) i filma s listom konoplje LK (92,3 %) je vrlo visoka te slična. Topljivost filma s proteinom konoplje (76,2 %) je niža što se može objasniti složenim sastavom proteina konoplje koji sadrži i hidrofobne aminokiseline (metionin) što može smanjiti topljivosti.
7. Najveću izmjerenu relativnu vlažnost pokazao je film s kitozansom.
8. Dodatak lista konoplje, odnosno proteina konoplje u kitozanski film povećava propusnost za vodenu paru, stoga je film s kitozansom najbolja barijera za gubitak vode.
9. Dodatak lista konoplje u kitozanski film dodatno je smanjio već vrlo nisku propusnost samog kitozanskog filma za kisik te ugljični dioksid.
10. Film s kitozansom pokazao je najveću vlačnu čvrstoću, ali ne i najveću elastičnost, dok su filmovi s listom konoplje i proteinom konoplje pokazali gotovo dvostruko manju vlačnu čvrstoću. Istovremeno, film s proteinom konoplje nešto je elastičniji od filma s kitozansom, dok je film s listom konoplje najmanje elastičan.
11. Mikroskopski pregled pokazao je da su filmovi s kitozansom i proteinom konoplje prozirniji i žućkasto obojeni, dok je film s listom konoplje više zelenkasto obojen i manje proziran.

6. LITERATURA

Aguirre-Joya JA, De Leon-Zapata MA, Alvarez-Perez OB., Torres-León C, Nieto-Oropeza DE, Ventura-Sobrevilla JM, i sur. (2018) Basic and Applied Concepts of Edible Packaging for Foods. U: Grumezescu A, Holban AM (ured.) Food Packaging and Preservation, Elsevier, London, str. 1–61.

Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA (2012) Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chin Med* **3**, 61-64. <http://dx.doi.org/10.4236/cm.2012.31010>

Aljawish A, Muniglia L, Klouj A, Jasniewski J, Scher J, Desobry S (2016) Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. *Food Hydrocoll* **60**, 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032>

Alvarez MV, Ponce AG, Moreire MR (2013) Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *Food Sci Technol* **50**, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.021>

Andrade RD, Skurtys O, Osorio FA (2012) Atomizing Spray Systems for Application of Edible Coatings. *Compr Rev Food Sci F* **11**, 323-327. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00186.x>

Arnon H, Granit R, Porat R, Poverenov E (2015) Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: a layer-by-layer approach. *Food Chem* **166**, 465 – 472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.061>

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

Azeredo HMC, Mattoso LHC, Wood D, Williams TG, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH (2009) Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *J Food Sci* **74**, 31–35. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01186.x>

Balau L, Lisa G, Popa MI, Tura V, Melnig V (2004) Physico-chemical properties of Chitosan films. *Cent Eur J Chem* **2**, 638–647. <https://doi.org/10.2478/BF02482727>

Baldwin EA, Nisperos M, Baker R (1995) Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Crit Rev Food Sci* **35**, 509–524. <https://doi.org/10.1080/10408399509527713>

Bhale S, No HK, Prinyawiwatkul W, Farr AJ, Nadarajah K, Meyers SP (2003) Chitosan Coating Improves Shelf Life of Eggs. *J Food Sci* **68**, 7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05776.x>

Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, i sur. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**, 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>

Bionda H (2021) Priprema jestivog biofilma od kitozana i gume arabike s dodatkom ekstrakta sjemenki grožđa (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Borrelle SB, Ringma J, Law KL, Monnahan CC, Lebreton L, McGivern A (2020) Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. *Science* **369**, 1515–1518. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA3656>

Bourbon AI, Pinheiro AC, Cerqueira MA, Rocha CMR, Avides MC, Quintas MAC, i sur. (2011) Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *J Food Eng* **106**, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.024>

Bule K, Zadro K, Tolić A, Radin E, Miloloža M (2020) Mikroplastika u morskom okolišu Jadrana. *Kemija u industriji* **69**, 303–310. <https://doi.org/10.15255/KUI.2019.063>

Debeaufort F, Quezada-Gallo JA, Voilley A (1998) Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Crit Rev Food Sci* **38**, 299-313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>

Di Pierro P, Sorrentino A, Mariniello L, Giosafatto CV, Porta R (2011) Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT— Food Sci Technol* **44**, 2324–2327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>

Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem* **114**, 1173-1182.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>

Elsabee MZ, Abdou ES (2013) Chitosan based edible films and coatings: a review. *Mater Sci Eng* **33**, 1819–1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>

Espitia PJP, Du WX, Avena-Bustillos RDJ, Soares NDF, Mc Hugh TH (2014) Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties - a review. *Food Hydrocol* **35**, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>

Friesen K, Chang C, Nikerson M (2015) Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: Mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chem* **172**, 18-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.128>

Fuk B (2019) Plastična ambalaža – nužno zlo. *Sigurnost* **61**, 165-170. <https://hrcaj.srce.hr/file/323843>

Galus S, Kadzińska J (2015) Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends Food Sci Technol* **45**, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>

Gomes LP, Souza HKS, Campiña JM, Andrade CT, Silva AF, Gonçalves MP, i sur. (2019) Edible Chitosan Films and Their Nanosized Counterparts Exhibit Antimicrobial Activity and Enhanced Mechanical and Barrier Properties. *Molecules* **24**, 127. <https://doi.org/10.3390/molecules24010127>

Hourfane S, Mechqoq H, Bekkali AY, Rocha JM, El Aouad NA (2023) Comprehensive Review on *Cannabis sativa* Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants* **12**, 1245. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>

Huang YL, Wang DM (2023) Characterization of Composite Film of Gelatin and Squid Pen Chitosan Obtained by High Hydrostatic Pressure. *Polymers* **15**, 1608. <https://doi.org/10.3390/polym15071608>

Jakupić M, Poljan M, Hajdek K (2019) Pametna ambalaža. *Polytechnic and design* **7**, 144-153. <https://doi.org/10.19279/TVZ.PD.2019-7-2-09>

Jerbić M (2014) Viskoznost tekućina (diplomski rad) Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Jridi M, Hajji S, Ben Ayed H, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, i sur. (2014) Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol* **67**, 373-379 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054>

Liao Z (2022) Development of hemp nanocellulose-based plastic films for food packaging (magistarski rad), Department of Food Science and Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, McGill University, Montreal.

Lopez de Lacey AM, López-Caballero ME, Montero P (2014) Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT - Food Sci Technol* **55**, 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.028>

Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL, Del Bino S (2020) Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. . *Invest Dermatol* **140**, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>

McMillin KW (2008) Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci* **80**, 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.028>

Mirpoor SF, Giosafatto CVL, Di Girolamo R, Famiglietti M, Porta R (2022) Hemp (*Cannabis sativa*) seed oilcake as a promising by-product for developing protein-based films: Effect of transglutaminase-induced crosslinking. *Food Packag Shelf Life* **31**, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100779>

Mousavi Khaneghah A, Hashemi SMB, Limbo S (2018) Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food Bioprod Process* **111**, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>

Muñoz-Tebar N, Pérez-Álvarez HA, Fernández-López J, Viuda-Martos M (2023) Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review. *Polymers* **15**, 396. <https://doi.org/10.3390/polym15020396>

Nowzari AM, Soares NFF, Andrade NJ (2006) Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control* **17**, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.024>

Nowzari F, Shábanpour B, Ojagh SM (2013) Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem* **141**, 1667-1672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.022>

Peng Y, Wu Y, Li Y (2013) Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *Int J Biol Macromol* **59**, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019>

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

Promhuad K, Srisa A, San H, Laurenza Y, Wongphan P, i sur. (2022) Applications of Hemp Polymers and Extracts in Food, Textile and Packaging: A Review. *Polymers* **14**, 4274. <https://doi.org/10.3390/polym14204274>

Quirós-Sauceda AE, Ayala-Zavala JF, Olivás GI, González-Aguilar GA (2014) Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *J Food Sci Technol* **51**, 1674-1685. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1246-x>

Raafat D, Sahl HG (2009) Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microb Biotechnol* **2**, 186-201. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>

Radwan MM, Chandra S, Gul S, ElSohly MA (2021) Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules* **26**, 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>

Saleemi MA, Yahaya N, Zain NNM, Raoov M, Yong YK, i sur. (2022) Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Cannabinoids: An Updated Review with Future Perspectives and Current Challenges. *Pharmaceuticals* **15**, 1228. <https://doi.org/10.3390/ph15101228>

Sancakli A, Basaran B, Arican F, Polat O (2021) Effects of bovine gelatin viscosity on gelatin-based edible film mechanical, physical and morphological properties. *SN Applied Sciences*, **3**. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04076-0>

Sharif R, Mujtaba M, Rahman MU, Shalmani A, Ahmad H, Anwar T, i sur. (2018) The multifunctional role of chitosan in horticultural crops: A review. *Molecules* **23**, 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>

Shiung Lam S, Xia C, Sonne C (2022) Plastic crisis underscores need for alternative

sustainable-renewable materials. *J Bioresour Bioprod.* **7**, 145-147.
<https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.06.001>

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

Sionov RV, Steinberg D (2022) Anti-Microbial Activity of Phytocannabinoids and Endocannabinoids in the Light of Their Physiological and Pathophysiological Roles. *Biomedicines* **10**, 631. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030631>

Siripatrawan U, Vitchayakitti W (2016) Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocol* **61**, 695-702.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>

Skurtys O, Acevedo C, Pedreschi F, Enrione J, Osorio F, Aguilera JM (2010) Food hydrocolloid edible films and coatings. U: Hollingworth CS (ured.) Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures, Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 1-34.

Sogut E, Seydim AC (2018) The effects of Chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. *Food Pack Shelf Life* **18**, 13–20.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.07.006>

Srinivasa PC, Ramesh MN, Tharanathan RN (2007) Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocol* **21**, 1113–1122.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.005>

Strategija (2020) Komunikacija Europskom parlamentu, Vijeću, Europskom gospodarskom i socijalnom odboru i Odboru regija „Strategija „od polja do stola” - za pravedan, zdrav i ekološki prihvatljiv prehrambeni sustav, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0381&from=EN>. Pristupljeno 5. lipnja 2023.

Sun X, Sun Y, Li Y, Wu Q, Wang L (2021) Identification and Characterization of the Seed Storage Proteins and Related Genes of *Cannabis sativa* L. *Fron Nutr* **8**, 678421.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.678421>

Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A (2005) Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *J Agric Food Chem* **53**, 3950–3957.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf048790+>

Thew CXE, Lee ZS, Srinophakun P, Ooi CW (2023) Recent advances and challenges in sustainable management of plastic waste using biodegradation approach. *Bioresource Technol* **374**, 128772. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128772>

Uredba (2002) Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32002R0178> Pristupljeno 5. lipnja 2023.

Uredba (2004) Uredba (EZ) br. 1935/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. listopada 2004. o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva 80/590/EEZ i 89/109/EEZ. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hr/TXT/?uri=CELEX%3A32004R1935> Pristupljeno 5. lipnja 2023.

Uredba (2009) Uredba Komisije (EZ) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0450> Pristupljeno 5. lipnja 2023.

van den Broek LAM, Knoop RJI, Kappen FHJ, Boeriu CG (2015) Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydr Polym* **116**, 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>

Verlee A, Mincke S, Stevens CV (2017) Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym* **164**, 268-283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>

Vieira JM, Florez-Lopez ML, De Rodriguez DJ, Sousa MC, Vicente AA, Martins JT (2016) Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *Postharv Biol Technol* **116**, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.01.011>

Wagner M, Scherer C, Alvarez-Muñoz D, Brennholt N, Bourrain X, Buchinger S, i sur. (2014) Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ Sci Eur* **26**, 12. <https://doi.org/10.1186%2Fs12302-014-0012-7>

Wang L, Dong Y, Men H, Tong J, Zhou J (2013) Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocol* **32**, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>

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

Ziani K, Osés J, Coma V, Mate JI (2008) Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Sci Technol* **41**, 2159-2165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.023>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Luka Jelenić