

Razvoj, karakterizacija i primjena biorazgradivih i jestivih materijala za pakiranje hrane s dodatkom eteričnog ulja naranče i galne kiseline

Tankosić, Marija

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:159:887635>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Marija Tankosić

**RAZVOJ, KARAKTERIZACIJA I
PRIMJENA BIORAZGRADIVIH I
JESTIVIH MATERIJALA ZA
PAKIRANJE HRANE S DODATKOM
ETERIČNOG ULJA NARANČE I
GALNE KISELINE**

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. Mije Kurek, Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Miji Kurek koja je prihvatila biti zadnja stanica na mojem putovanju kroz ovaj fakultet. Zahvaljujem joj se na podršci, savjetima i velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada, bez Vas, vjerujem da ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana. Hvala svim prijateljima i kolegama koji su učinili da mi fakultetski dani budu nezaboravna uspomena za cijeli život. Hvala KR i TŽ na svim studentskim srijedama i zajedničkim neprospavanim noćima.

Najveća hvala mojoj obitelji iz Tomislavove 24, Strossmayerove 14 i s Rudeša koji su mi bili veliki vjetar u leđa i najveća podrška u kriznim situacijama. Ova kruna školovanja pripada i vama. Naposljetku, hvala Dominiku što je bio uz mene i ispratio svaku moju žutu minutu.

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: Upravljanje sigurnošću hrane

RAZVOJ, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA BIORAZGRADIVIH I JESTIVIH MATERIJALA ZA PAKIRANJE HRANE S DODATKOM ETERIČNOG ULJA NARANČE I GALNE KISELINE

Marija Tankosić, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058212689

Sažetak: Zbog sve zahtjevnijeg tržišta i napora da se uporaba plastične ambalaže svede na minimalne razine, znanstvenici su doskočili problemu razvojem alternativnih biorazgradivih i jestivih materijala za pakiranje. Cilj ovoga rada bio je odrediti utjecaj aktivnih tvari, galne kiseline i eteričnog ulja naranče na fizikalno- kemijska svojstva (boja, transparentnost, debljina, udio vode, topljivost i kapacitet bubrenja), barijerna svojstva (propusnost na kisik, ugljikov dioksid te vodenu paru), antioksidacijska svojstva (ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost i postotak inhibicije DPPH) te biorazgradivost filmova. Pripremljeni su filmovi na bazi kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i/ili eteričnog ulja naranče. Dodatkom galne kiseline ukupan udio fenola je značajnije porastao kao i antioksidacijski kapacitet. Najveći postotak biorazgradnje pokazao je film koji je sadržavao uz kitozan i želatinu, eterično ulje naranče, dok su filmovi koji su imali galnu kiselinu bili najviše očuvani nakon 2 mjeseca razgradnje u zemlji.

Ključne riječi: kitozan, želatina, eterično ulje naranče, biorazgradivost, jestivi materijali

Rad sadrži: 47 stranica, 15 slika, 5 tablica, 80 literaturnih navoda, 0 priloga

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. Mia Kurek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu: (Napomena: članovi povjerenstva se predlažu u obrascu OB-US-13-01, a u diplomski rad unose tek nakon sjednice Odbora)

1. izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Mia Kurek (mentorica)
3. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (član)*
4. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (zamjenski član)

Datum obrane: 19. rujna 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 Safety Management

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF BIODEGRADABLE
AND EDIBLE MATERIALS FOR FOOD PACKAGING WITH THE ADDITION OF ORANGE
ESSENTIAL OIL AND GALLIC ACID

Marija Tankosić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212689

Abstract: Due to the increasingly demanding market and efforts to reduce the use of plastic packaging to minimum levels, scientists have jumped to the problem of developing alternative biodegradable and edible packaging materials. The aim of this work was to determine the influence of active substances, gallic acid and orange essential oil on the physico-chemical properties (color, transparency, thickness, water content, solubility and swelling capacity), barrier properties (permeability to oxygen, carbon dioxide and water vapour), antioxidant properties (total phenols, antioxidant activity and percentage of DPPH inhibition) and biodegradability of the developed films. Films based on chitosan and gelatin with the addition of gallic acid and/or orange peel essential oil were prepared. With the addition of gallic acid, the total proportion of phenols significantly increased as well as the antioxidant capacity. The highest percentage of biodegradation was shown by the film that was in addition to chitosan and gelatin enriched with orange peel essential oil, while films with gallic acid were the most preserved after 2 months degradation in soil.

Keywords: chitosan, gelatine, orange essential oil, biodegradable, edible materials

Thesis contains: 47 pages, 15 figures, 5 tables, 80 references, 0 supplements

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: Mia Kurek, PhD, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 19th, 2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BIOMATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE	3
2.1.1. Kitozan	5
2.1.2. Želatina.....	7
2.1.3. Galna kiselina	10
2.1.4. Eterično ulje naranče (OEO)	10
2.2. KOMBINIRANI MATERIJALI	11
2.3. ZAKONSKA REGULATIVA	12
2.4. KARAKTERIZACIJA BIOPOLIMERA ZA PAKIRANJE	13
2.4.1. Debljina filma	14
2.4.2. Barijerna svojstva	14
2.4.3. Topljivost i udio vode	15
2.4.4. Mehanička svojstva.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2. PRIPREMA FILMOVA	16
3.3. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA	17
3.3.1. Određivanje debljine filmova	17
3.3.2. Određivanje boje filma	17
3.3.3. Određivanje transparentnosti filmova.....	18
3.3.4. Određivanje udjela vode i topljivosti filmova u vodi	18
3.3.5. Bubrenje filmova	19
3.3.6. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film.....	20
3.3.7. Mjerenje propusnosti na plinove	21
3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	21
3.3.9. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	22
3.3.10. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	22
3.3.11. Biorazgradivost filmova.....	23
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. PARAMETRI BOJE I TRANSPARENTNOST	24

4.2. UDIO VODE, SUHE TVARI, TOPLJIVOST I BUBRENJE	26
4.3. DEBLJINA, PROPUSNOST NA VODENU PARU (WVP) I BRZINA PRIJENOSA VODENE PARE (WVTR) FILMOVA.....	27
4.4. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O₂ I CO₂)	28
4.5. UDIO UKUPNIH FENOĀA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	30
4.6. BIORAZGRADIVOST FILMOVA	33
5. ZAKLJUČCI.....	35
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

Pakiranje je završna točka proizvodnje u prehrambenoj industriji i kao takvo predstavlja značajan čimbenik s gledišta kako zdravstvene tako i senzorske kvalitete upakiranog prehrambenog proizvoda. Nadalje, zahtjevi kupaca za kvalitetnim proizvodom s dužim rokom trajnosti sve su veći. Zbog modernog i ubrzanog načina života, razvoja industrija i mnogih drugih nepovoljnih čimbenika, sve je veća količina zagađivača okoliša, a plastika, kao učestali i široko rasprostranjen ambalažni materijal predstavlja veliki problem. Istovremeno, povećanjem upotrebe polimernih sintetičkih materijala porasla je i svijest o posljedicama koje takav način pakiranja može imati na ekološki sustav i u krajnjem slučaju zdravlje ljudi. Stoga su industrija pakiranja i suvremena znanstvena dostignuća doskočili problemu biorazgradivim materijalima.

Osnovna klasifikacija biorazgradivih materijala osmišljena je u nekoliko smjerova, a jednu od skupina čini jestiva ambalaža. Ona se pokazala kao dobra alternativa dosadašnjem načinu pakiranja u smislu smanjenja otpada, sigurnosti proizvoda, povećanja kvalitete i raznolikosti prehrambenih proizvoda pa i razvoj biorazgradivih jestivih polimera dobiva na sve većoj važnosti (Janjarasskul i Krochta, 2010).

Kod dobrog gospodarenja otpadom, bitno je uočiti važnost recikliranja, ali i koncepta održivosti pa se u tu svrhu stvaraju materijali od biorazgradivih komponenti koje se razgrađuju uz pomoć živih mikroorganizama koje su istodobno i jestive i ni na koji način ne štete ekološkom sustavu (Tokić i sur., 2011).

Materijali na bazi biopolimera imaju sposobnost zaštite proizvoda od mehaničkih oštećenja, također predstavljaju dobru barijeru od propusnosti na vodenu paru, zrak, plinove i masti, funkciju otpuštanja komponenti koje mogu utjecati na sam proizvod i prevenciju rasta nepoželjnih mikroorganizama (Beikzadeh1 i sur., 2020). Jestivi polimeri mogu se nanositi na površinu proizvoda kako bi se očuvala kvaliteta i stabilnost proizvoda (Shit i Shah, 2014), a samo neki od biopolimera koji se koriste u industriji pakiranja bili bi škrob, celuloza, kitozan, hitin i želatina.

Zanimljivost razvoja jestivih filmova leži u konceptualnoj proizvodnji i ugradnji bioaktivnih agenasa kao što su antioksidansi, vitamini, antimikrobne tvari, eterična ulja i tvari arome i boje koje obogaćuju proizvod možda netipičnim svojstvima za određeni proizvod. U ovom diplomskom radu za izradu filmova korišteni su kitozan i želatina, te eterično ulje naranče i galna kiselina kao bioaktivne komponente. Ispitivana formulacija predstavlja zanimljiv materijal u razvoju jestivih filmova zbog svojih svojstava stvaranja filma, jestivosti i biorazgradivosti (Wang i sur., 2021).

Predloženi ciljevi ovog diplomskog rada su:

1. Priprema jestivih biopolimera na bazi kitozana i želatine;
2. Utjecaj dodatka galne kiseline i eteričnog ulja naranče na svojstva filmova;
3. Karakterizacija i usporedba fizikalno kemijskih i barijernih svojstava različitih kombinacija filmova te biorazgradivost istih.

2. TEORIJSKI DIO

Iako su jednostavni i praktični za svakodnevnu upotrebu, svi proizvodi, ubrajajući i ambalažu od sintetskih polimera predstavljaju velik problem kako u svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj. Stoga je 2021. godine donesena odluka na razini Europske unije o zabrani upotrebe plastike za jednokratnu upotrebu (EU 2019/904). Zbog relativno niske cijene proizvodnje i kratkog roka trajnosti, velika količina otpadne plastike odbacuje se tijekom cijele godine i time predstavlja direktnu opasnost za ekološki sustav (Pan i sur., 2020). Svjesni nepovoljnih situacija prekomjernog gomilanja otpada, znanstvenici i stručnjaci s područja prehrambene industrije i industrije pakiranja hrane pokušavaju doskočiti tom problemu kreirajući nove vrste materijala koji će svojim svojstvima pokazivati dvojako djelovanje: poboljšati kvalitetu proizvoda i imati mogućnost biorazgradnje. Još uvijek ne postoji mogućnost potpune zamjene polimernih materijala biorazgradivim materijalima, ali se sve više teži ka tome (Siracusa i sur., 2008).

2.1. BIOMATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE

Povećana upotreba biopolimera, umjesto sintetičkih nerazgradivih/teško zabrinjavajućih plastičnih materijala uvelike bi pomogla smanjiti količinu ukupnog otpada i njegovih posljedica. Biorazgradivi materijali imaju ključnu ulogu održivosti okoliša jer “dolaze iz prirode i vraćaju se nazad u prirodu” (Wróblewska-Krepsztul i sur., 2018). Ambalaža za hranu postala je središnji fokus napora za smanjenje otpada i pravilno gospodarenje otpadom zbog izrazito nepovoljnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš (Tang i sur., 2012).

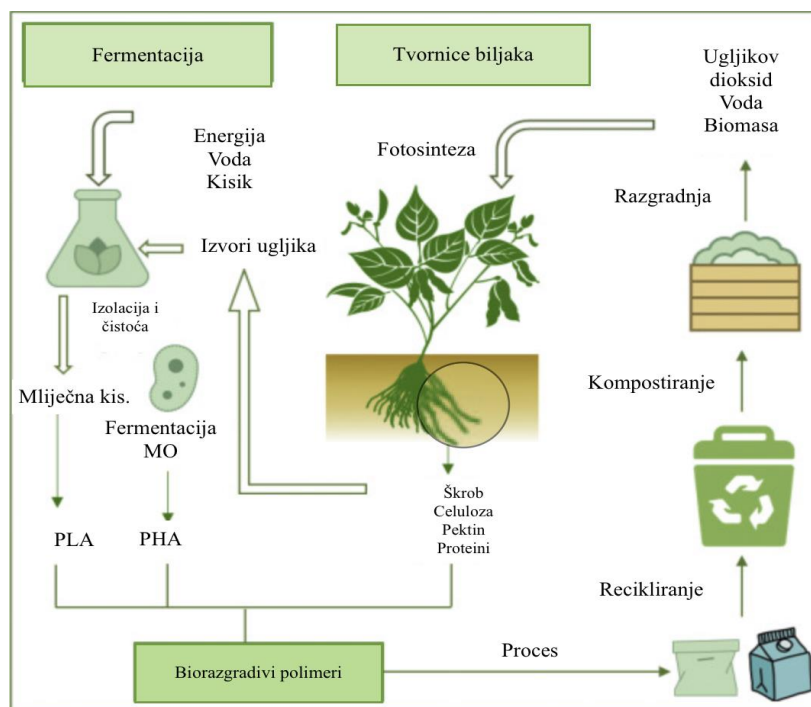
Biopolimeri su biološke makromolekule koje potječu iz obnovljivih izvora energije i koje se nalaze u sastavu svakog biljnog ili životinjskog tkiva. Prema Andričić (2009), biomaterijali se mogu svrstati u nekoliko kategorija:

1. Polisaharidi;
2. Lignin ili polimerni materijali na bazi koniferil alkohola;
3. Proteini (bjelančevine);
4. Prirodne smole;
5. Prirodni kaučuk.

Za bolju mogućnost primjene i procesiranje prirodnih polimera u sastav im se ugrađuju ili dodaju razni aditivi poput stabilizatora, plastifikatora, punila i pigmenta kako bi se prilagodili

širokoj primjeni u raznim industrijama (prehrambena, tekstilno-tehnološka, farmaceutska, industrija boja i lakova itd.).

Biopolimeri, odnosno biomaterijali imaju sposobnost biorazgradnje što znači da se razgrađuju uz pomoć mikroorganizama (npr. gljivica) i na taj način neće godinama biti deponirani u zemlji i štetiti okolišu. Sam proces biorazgradnje ovisi o okolišnim čimbenicima (temperatura, vlaga, klima) u kojima se materijal nalazi, broju i vrsti mikroorganizama koji pospješuju razgradnju, i na kraju o karakteristikama samog materijala. Moraju se poklopiti svi parametri, odnosno postići idealno stanje kako bi se ambalažni materijal u potpunosti razgradio (Siracusa i sur., 2008). Posljednjih se godina stavlja fokus na razvoj biorazgradivih polimera iz obnovljivih izvora energije (Zhong i sur., 2019). Završni produkti koji nastaju razgradnjom su ugljikov dioksid, voda, metan, biomasa i druge tvari prirodnog podrijetla koje su od značaja za ravnotežu stakleničkih plinova i utjecaja na sam okoliš.



Slika 1. Reciklirajući biološki proces razgradnje biopolimera (prema Zhong i sur., 2019)

Zbog sve veće svjesnosti ljudi o količinama otpada od hrane znanstvenici pokušavaju pronaći nove metode pakiranja naglašavajući značaj jestivih materijala jer je i to jedan od načina na koji bi se količina otpada mogla smanjiti. Jestivi ambalažni materijali mogu biti u obliku jednoslojnih, dvoslojnih i višeslojnih filmova, premaza, folija ili vrećica, a sama funkcija jestive ambalaže je omogućiti selektivnost kod migracije plinova, ulja i masti; omogućiti stabilnost hlapivih

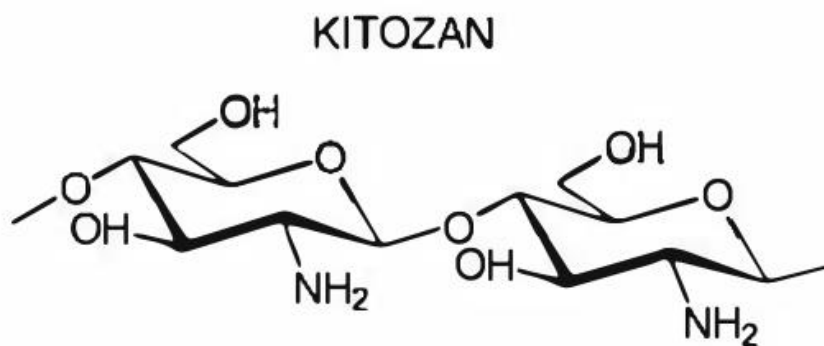
komponenti; poboljšati svojstva proizvoda dodatkom antimikrobnih tvari i antioksidansa (Gujinović, 2021). Prema Petkoska i sur. (2021), neke od prednosti jestive ambalaže su:

1. Produljenje roka trajnosti proizvoda,
2. Ekološka prihvatljivost,
3. Pogodnost za konzumaciju,
4. Fizička, kemijska i mehanička zaštita,
5. Poboljšana senzorska svojstva proizvoda,
6. Sastavni je dio prehrambenog proizvoda.

Biopolimeri korišteni u ovom diplomskom radu su polisaharid kitozan i protein želatina s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Stoga će se u idućih nekoliko potpoglavlja dati literaturni pregled svojstva navedenih komponenti.

2.1.1. Kitozan

Kitozan je alkalni hidrolitički derivat hitina, polisaharida kojeg se može pronaći u strukturi beskralješnjaka i nižih biljaka. Odličan je primjer za stvaranje ekološki prihvatljive ambalaže jer ga odlikuju netoksičnost, biorazgradivost i biokompatibilnost. Uz te karakteristike, bitno je napomenuti da je dobar inhibitor rasta raznih mikroorganizama (kvasaca, gljivica i bakterija), lako stvara filmove i pokazuje dobra barijerna svojstva na plinove i mirise. Drugi je po redu najzastupljeniji polisaharid pronađen u prirodi nakon celuloze (Mitelut i sur., 2015). Prema kemijskoj strukturi, kitozan se sastoji od N - acetil - D - glukozaminskih jedinica povezanih β - (1,4) vezom (Aguirre - Joya i sur., 2018).



Slika 2. Struktura kitozana (prema Martinac i Filipović - Grčić, 2002).

Prema Martinac i Filipović - Grčić (2002), kitozan se dobiva izolacijom iz oklopa rakova na način da se ponajprije dekalificira u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini, zatim deprotonira u

razrijeđenom natrijevom hidroksidu te na samom kraju kuha u otopini natrijeva hidroksida. Tako dobiven hitin podliježe deacetilaciji u koncentriranoj natrijevoj lužini. Da bi se dobio što čišći proizvod, kitozan prolazi nekoliko koraka obrade: otapa se u kiselini, filtrira, ponovno taloži, ispire i suši. Svi deacetilirani oblici mogu se nazivati kitozanom koji se samo razlikuju po stupnju deacetilacije. Usporedbe radi, kitozan koji se primjenjuje u prehrambene svrhe je 75 – 85 % deacetiliran, a onaj u farmaceutske svrhe 90 % - 95 %.

U prehrambenoj industriji kitozan nudi širok raspon primjena (Zemljić i sur., 2013):

1. Očuvanje hrane od mikrobiološkog kvarenja;
2. Koagulacija proteina i lipida iz otpadnih voda;
3. Pojačavanje geliranja u surimiju i ribljim proizvodima;
4. Bistrenje / deacidifikacija voćnog soka;
5. Stvaranje jestivo biorazgradivih filmova.

Provedena su brojna istraživanja na temelju kojih su proučavana različita svojstva kitozana i mješavina kitozana (fizikalna, reološka, mehanička svojstva, propusnost na vodenu paru i plinove, antimikrobnost) i čiji rezultati pokazuju da su kitozan i mješavine kitozana obećavajući materijal za pripremu aktivnih, jestivih i biorazgradivih filmova za pakiranje (Elsabee i Abdou, 2013).

Zbog prisustva amino skupina u polimernom lancu, filmovi na bazi kitozana pripremaju se na način da se kitozan otapa u otopini koja ima pH manji od 6,0, odnosno u kiselim vodenim otopinama poput vodene otopine limunske ili octene kiseline (Mitelut i sur., 2015). Nakon otapanja, ili bolje rečeno dispergiranja, moguće je dodavati razne aditive kako bi se poboljšala svojstva pripremanih filmova.

Tablica 1. Pregled znanstvenih istraživanja koja daju uvid u promjenu svojstava dodatkom aditiva u filmove na bazi kitozana

Sastav materijala/filma	Svojstva	Referenca
Kitozan i želatina	Bolja mehanička svojstva, toplinska stabilnost i manja propusnost	Liu i sur., 2012
Kitozan i glicerol	Fizička, barijerna i mehanička svojstva povezana sa samom koncentracijom kitozana	Pereda i sur., 2014
Kitozan i galna kiselina	Poboljšana antimikrobna i barijerna svojstva	Sun i sur., 2014

Tablica 1. Pregled znanstvenih istraživanja koja daju uvid u promjenu svojstava dodatkom aditiva u filmove na bazi kitozana - nastavak

Kitozan i esencijalna ulja	Poboljšana antimikrobna svojstva	Wu i sur., 2014
Kitozan i škrob	Poboljšana mehanička otpornost i smanjena propusnost vodene pare	Pelissari i sur., 2012

Postupak pripreme najčešće je direktnim izlivanjem filmogenih otopina na odgovarajuću podlogu (plastične, teflonske ili staklene podloge), te slijedi sušenje (isparavanje viška vode) u kontroliranim uvjetima temperature i vlage kroz određeni vremenski period. Nakon perioda sušenja, osušeni filmovi se odvajaju od podloge. Takvi samostojeći filmovi mogu se direktno aplicirati na razne namirnice (riba i riblje prerađevine, meso, voće i povrće) ili formirati u vrećice koje se zatim koriste za pakiranje (Priyadarshi i Rhim, 2020). O sve većoj korištenosti kitozana u svrhu pakiranja, govori i grafički prikaz o objavljenim znanstvenim publikacijama na temu kitozana posljednjih godina, gdje možemo vidjeti značajan porast.



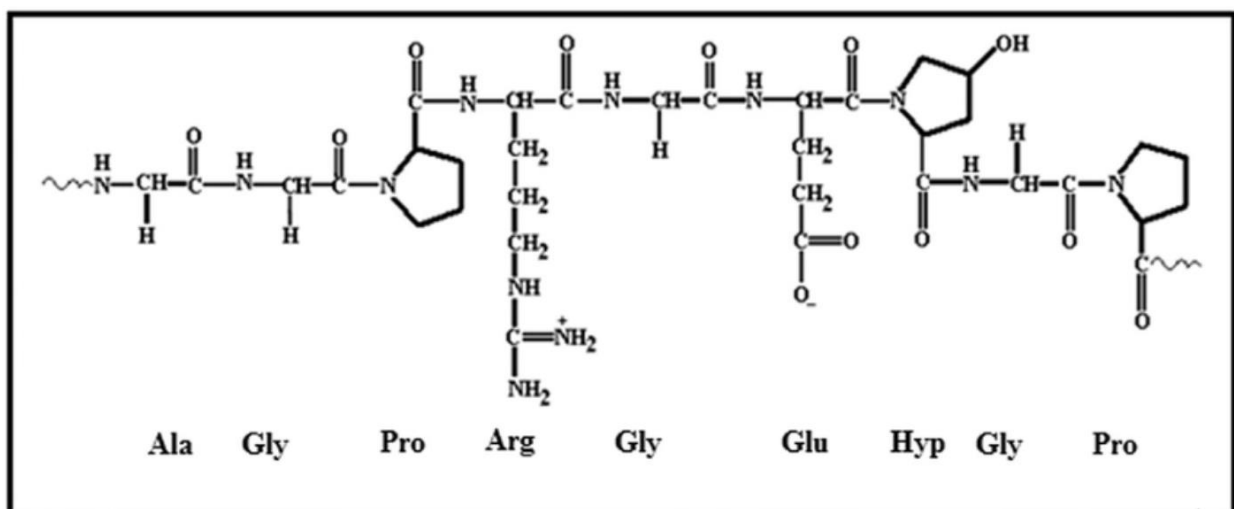
Slika 3. Publikacije vezane za primjenu kitozana u pakiranju hrane i indeksirane u Scopus bazama podataka te publicirane posljednjih 20 godina

2.1.2. Želatina

Želatina je denaturirani protein, ireverzibilni hidrolizat kolagena, dobiven djelomičnom hidrolizom kolagena iz životinjskih dijelova tijela kao što su vezivna tkiva, koža i kosti, koji je

ujedno odgovoran za elastičnost, čvrstoću i normalnu funkciju istih. U krutom agregatnom stanju je u obliku malih zrna ili praha svjetlo žute boje, a dodatkom vode poprima strukturu gume. Ovisno o izvoru od kojih se dobivaju, želatine imaju različite točke tališta i temperature geliranja pa tako želatine dobivena od ribe ima nižu točku tališta u odnosu na želatinu dobivenu od govedine ili svinjetine.

Ovisno o načinu dobivanja razlikujemo dva tipa želatine, A i B. Tip A dobiva se kiselom obradom kolagenskih sirovina - svinjske kože, dok se tip B dobiva alkalnom obradom govede kože (Haug i Darget, 2009). Zbog visokog udjela aminokiselina glicina, hidroksiprolina i prolina želatina ima veliku sposobnost umrežavanja, odnosno stvaranja filmova (Wang i sur., 2021). Želatina iz morskih izvora, dobivena iz kože, peraja i kosti toplovodnih i hladnovodnih riba, moguća je alternativa goveđoj želatini. Filmovi riblje želatine proizvedeni su većinom od toplovodnih vrsta ribe jer ih odlikuje velika rastezljivost, istežanje pri lomljivosti i propusnost na vodenu paru (WVP) (Lv i sur., 2019). Iako želatina prema Agenciji za hranu i lijekove (FDA) i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) ima GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) status, postoje kontroverze oko korištenja životinjske želatine zbog etičkih i kulturoloških stajališta, ali i zabrinutosti potrošača zbog pojave bolesti stopala, šaka i govede spongiformne encefalopatije pa se predlaže upotreba riblje želatine kao alternative, što je dobro jer se na taj način smanjuje otpad od riblje industrije. Riblju želatinu karakterizira manji udio prolina i hidroksiprolina (17-25 % ukupnih aminokiselina) u odnosu na želatine sisavaca (30 % ukupnih aminokiselina) (Karim i Bhat, 2009) te zbog tih karakteristika ima različita fizikalno - kemijska svojstva, a jedno od njih je svakako slabija moć želiranja. Relativno niža cijena i veća dostupnost uvjetuju da je tržišni udio želatine proizvedene od sisavaca veći u odnosu na riblju želatinu (Karim i Bhat, 2009).

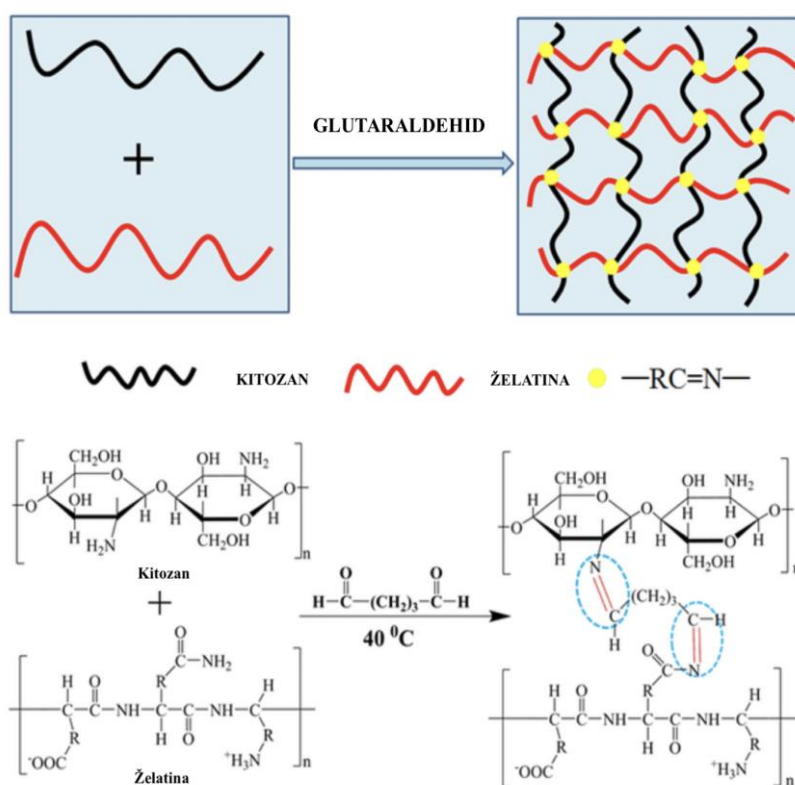


Slika 4. Struktura želatine (prema Devi i sur., 2016)

Danas se želatina upotrebljava zbog svojih karakterističnih svojstava (Keenan, 2003):

1. Reverzibilni prijelaz vodene otopine iz gel faze u stanje soli;
2. Dobra viskoznost u toplim otopinama;
3. Hidrofilni karakter;
4. Netopivost u hladnom mediju (vodi), a potpuna topivost u vrućoj vodi;
5. Hranjivost.

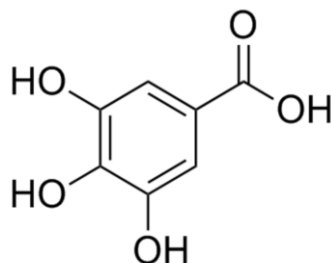
Zbog sposobnosti stvaranja čvrstih, ujednačenih, prozirnih prevlaka s velikom moći bubrenja pogodna je za korištenje u prehrambenoj industriji i to za proizvodnju jestivih filmova, farmaceutskoj industriji za proizvodnju kapsula te fotografskih filmova u svijetu fotografija. Nadalje, pogodna je za korištenje u konditorskoj industriji kao emulgator, stabilizator pjene i kontrola kristalizacije šećera. Od posebnog je interesa sinergija kitozana i želatine jer su brojna istraživanja pokazala benefite kod razvoja filmova na bazi te dvije komponente. Zunying i sur. (2012) su uočili da se kombinacijom želatine i kitozana dobivaju filmovi boljih mehaničkih svojstva i smanjene propusnosti na vodenu paru. Rezultati istraživanja koje su proveli Liu i sur. (2012) slični su rezultatima istraživanja Zunying i sur. (2012) uz dodatak da kombinacija kitozana i želatine ima veću toplinsku stabilnost. Snažne vodikove veze kojima se povezuju želatina i kitozan omogućavaju kompaktnu strukturu filma, kao što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Prikaz umrežavanja želatine i kitozana (prema Ren i sur., 2022)

2.1.3. Galna kiselina

Galna kiselina ili 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina je jedna od najčešće korištenih fenolnih kiselina jer ju odlikuje antimikrobno, antioksidativno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje. Hidroksilne skupine omogućuju antioksidativnu aktivnost, dok karboksilna grupa daje kiselinske osobine.



Slika 6. Struktura galne kiseline

Sekundarni je metabolit prisutan u većini biljaka (Fernandes i Salgado, 2016). Pokazuje dobra svojstva topivosti u eteru, vodi i alkoholu. Kako bi se sigurnost, a samim time i kvaliteta hrane povećala, u novije vrijeme javlja se sve veći interes za formuliranje jestivih premaza koji sadržavaju bioaktivne komponente (Aider, 2010). Rezultati istraživanja Cho i sur. (2010) pokazuju da se aktivnost galne kiseline poboljšava ugradnjom u kitozanske filmove. Ugradnjom galne kiseline u materijale za pakiranje, rok trajnosti prehrambenih proizvoda može se produžiti, smanjujući bacanje hrane koji je jedan od vodećih problema u svijetu i poboljšavajući sigurnost potrošača. Upravo prirodno podrijetlo i gore navedena učinkovita svojstva čine galnu kiselinu poželjnim aditivom i za proizvođače u prehrambenoj industriji i za industriju pakiranja jer nudi održivo rješenje za poboljšanje kvalitete i dugotrajnosti prehrambenih proizvoda.

2.1.4. Eterično ulje naranče (OEO)

Eterično ulje naranče pokazuje antioksidativno, antikancerogeno, protuupalno, kardioprotektivno i antibakterijsko djelovanje i zbog tih karakteristika čest je sastojak korišten u prehrambenoj industriji. Sastoji se od stotinjak spojeva, a glavnina otpada na hlapive komponente (85 - 99 %), uglavnom terpenoide (Razola- Díaz i sur., 2021). Najzastupljeniji spoj je limonen i čini gotovo 90 % eteričnog ulja (Wang i sur, 2019). Brojna istraživanja u području materijala za pakiranje hrane, rezultirala su poboljšanim svojstvima materijala nakon inkapsulacije eteričnog ulja naranče što znači da je korištenje eteričnog ulja u prehrambenoj industriji, odnosno industriji

pakiranja budućnost. Da Silva i sur. (2018) su pokazali da se inkapsulacijom OEO (30 %) u filmove od poli(vinil-klorida) postiže zaštitni učinak polimera nakon sterilizacije gama zračenjem. Nadalje, Alparslan i Baygar (2018) su dokazali da dodavanjem OEO u filmove od kitozana se produljuje rok trajnosti. Kavas i sur. (2016) su došli do zaključka kako se kombinacijom OEO i proteinskog praha bjelanjka tvore filmovi koji pridonose očuvanju fizikalno kemijskih i antibakterijskih svojstava kašar sira, pojačavajući antimikrobni učinak i izgled, te čineći ga svjetlijim i transparentnijim.

2.2. KOMBINIRANI MATERIJALI

Ambalaža dobivena iz biorazgradivih i kompostabilnih izvora energije jedan je od najučinkovitijih pristupa alternativnim biomaterijalima za pakiranje (Muller i sur., 2017), odnosno upućuje na to da bi bila dobra zamjena konvencionalnim načinima pakiranja. Jednokomponentni filmovi često nemaju zadovoljavajuća svojstva poput mehaničke čvrstoće ili barijerne koja bi u potpunosti odgovarala potrebama materijala za pakiranje hrane. Stoga se često materijali kombiniraju kako bi im se poboljšala svojstva, odnosno iskoristilo najbolje od svake komponente u višekomponentnim materijalima. Primjerice, ukoliko se kombinira polimer dobre barijere na kisik no velike propusnosti na vodenu paru s materijalom male propusnosti na vodenu paru a velike na kisik, tada njihova kombinacija može rezultirati materijalom niske propusnosti i na vodenu paru i na kisik. Prirodni polimeri su često osjetljivi na utjecaj vodene pare i vlage (Ivanković i sur., 2017), pa se koriste u kombinaciji s materijalima neosjetljivim na vlagu (primjerice lipidi, voskovi i sl.) kako bi se spajanjem polimera prikrili nedostaci jedne od komponenti (Muller i sur., 2017). Nadalje, dodavanjem funkcionalnih sastojaka, ambalaža uz primarnu funkciju zaštite može poprimiti i druge funkcije što se postiže inkapsulacijom antioksidansa, aroma i antimikrobnih tvari u cilju dobivanja što boljih performansi proizvoda (Galić, 2009). Takvi materijali poznati su pod nazivom aktivni materijali za pakiranje hrane, jer pružaju određenu i dodatnu zaštitu proizvodu koji se pakira.

Tablica 2. Kombinacija različitih materijala u svrhu poboljšanja svojstava

Sastav materijala/biofilma	Svojstva	Referenca
Tapioka škrob, kitozan i glicerol	Poboljšana mehanička svojstva, barijerna svojstva te zadovoljavajuća neprozirnost, boja i toplinska svojstva	Shapi' i sur., 2022

Tablica 2. Kombinacija različitih materijala u svrhu poboljšanja svojstava - nastavak

PLA, kitozan i keratin	Smanjena vlačna čvrstoća, poboljšana viskoelastična svojstva, smanjenje tvrdoće u odnosu na jednokomponentni film PLA	Rojas-Martínez i sur., 2020
Pšenični gluten i jabučni pektin, pšenični gluten	Poboljšana mehanička svojstva i bolja ujednačenost filma	Dong i sur., 2022
Kitozan i nanoceluloza	Poboljšana barijera na kisik, mehanička svojstva, baktericidno i fungicidno djelovanje	Costa i sur., 2021
Kitozan i maslinovo ulje	Smanjena prozirnost i brzina prijenosa vodene pare	Nowak i sur., 2022

2.3. ZAKONSKA REGULATIVA

Zdravlje potrošača je na prvom mjestu, te stoga svi pripremljeni proizvodi, a time i jestivi i biorazgradivi filmovi moraju biti u skladu sa zakonima Europske unije, ali i zakonima države u kojoj će biti dostupni na tržištu. Različite države imaju različite propise i zakone o materijalima za pakiranje hrane što uvelike može otežati da se određeni materijal za pakiranje hrane odobri (Jeya i sur., 2020). Jestivi filmovi i prevlake klasificiraju se kao prehrambeni proizvodi, dodaci hrani, sastojci hrane, tvari u dodiru s hranom ili materijali u dodiru s hranom, na njih se primjenjuju isti zakonski propisi kao i na prehrambene proizvode jer su sastavni dio proizvoda i konzumiraju se zajedno s njim (Galić, 2009). Svi aditivi koji se koriste u hrani, tako i pakiranjima koji su sastavni dio hrane, moraju biti na popisu dozvoljenih aditiva prema uredbama Europske unije (EU 1331/2008, EU 234/2011). Svi aditivi koji se koriste moraju opravdati svrhu, ne smiju biti toksični, moraju biti upotrijebljeni u granicama dozvoljenih koncentracija i ne smiju dovesti potrošača u zabludu. Oznaka mora biti jasno vidljiva i označena na deklaraciji.

Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN 125/2009), materijalima se smatraju: metali i njihove slitine, emajl, cement, keramika i porculan, staklo, polimerni materijali (plastika uključujući lakove, premaze i prevlake,

celuloza i elastomeri) drvo uključujući i pluto te tekstil. Isti pravilnik daje nam definicije aktivnog i inteligentnog pakiranja, pa se tako pod aktivnim pakiranjem smatraju materijali koji imaju mogućnost poboljšati uvjete zapakirane hrane ili povećati trajnost samih proizvoda i sadrže komponente koje mogu ulaziti u hranu; inteligentnim materijalima se smatraju oni koji registriraju uvjete u pakovanju ili okolini koja okružuje hranu. Iz istog pravilnika, aktivni i inteligentni materijali i predmeti koji su u dodiru s hranom moraju biti pravilno označeni kako bi potrošači mogli identificirati nejestive dijelove koje sadržava pakovina. Aktivni i inteligentni materijali i predmeti moraju biti označeni tako da ukazuju da se radi o materijalima ili predmetima koji su aktivni i/ili inteligentni. Posebnu pozornost treba posvetiti tome da se ne dovede potrošača u zabludu na način da aktivni materijali ne smiju mijenjati sastav ili organoleptička svojstva prikrivajući kvarenje hrane.

Norma ISO 13432:2002 odnosi se na "Zahtjeve za ambalažu koja se može obnoviti kompostiranjem i biorazgradnjom – Shema ispitivanja i kriteriji ocjenjivanja za konačno prihvaćanje ambalaže". Norma je donesena od Europskog odbora za standardizaciju i daje uvid u ključne parametre koje ambalaža mora zadovoljiti kako bi imala epitet biorazgradivosti, a neki od njih su:

- podrazumijeva metaboličku pretvorbu materijala do krajnjeg produkta - CO₂ s razinom prihvatljivosti od 90 % (u usporedbi s celulozom) za koju je potrebno manje od 6 mjeseci;
- ima sposobnost raspadanja što predstavlja odsustvo komadića materijala;
- nema negativnog utjecaja na proces kompostiranja i kvalitetu samog komposta;
- nema promjene u fizikalno - kemijskim svojstvima nakon same razgradnje.

Zbog velikog gomilanja otpada koji postaje sve veći problem, potrebno je donijeti pravilnike i zakone kojih će propisivati ponašanje sukladno dobrim gospodarenjem otpadom. Više od 40 % plastike proizvodi se za pakiranje hrane (Ahmed i Sarbon, 2016), te predstavlja veliki problem. Prema pravilniku o ambalaži i otpadnoj ambalaži (NN 88/2015) potrebno je reciklirati između 55 % i 80 % otpadne ambalaže, što je gotovo neostvarivo. Kako bi se smanjila količina otpadne ambalažne plastike i probudila svijest o zagađenosti okoliša istom, 1. srpnja 2021. godine donesena je odluka na razini Europske unije (Direktiva EU 2019/904) o ukidanju jednokratne plastike, odnosno plastike za jednokratnu upotrebu.

2.4. KARAKTERIZACIJA BIOPOLIMERA ZA PAKIRANJE

Karakterizacija biopolimera za pakiranje je od velike važnosti jer određivanjem svojstava materijala može se predvidjeti trajnost određenog proizvoda. Sam materijal čini granicu između namirnice koja će se konzumirati i okoline koja može narušiti kvalitetu, odnosno skratiti rok

trajnosti određenog proizvoda. Da bi se to svelo na minimalnu razinu, potrebno je uspostaviti ravnotežu na granici sustava hrana/ambalaža, odnosno odgovarajućim sastavom materijala pronaći onaj optimalnih karakteristika za proizvod. Parametri koji se najčešće određuju u svrhu karakterizacije biopolimera su:

1. Debljina filma;
2. Barijerna svojstva;
3. Topljivost i udio vode;
4. Mehanička svojstva;
5. Funkcionalna svojstva (u slučaju aktivne ili inteligentne ambalaže).

2.4.1. Debljina filma

Debljina filma je parametar koji utječe na barijerna i mehanička svojstva filmova. Ovisno o viskoznosti filmogene otopine iz koje se priprema film, on u konačnici može biti tanji ili deblji, odnosno što je pripremljena otopina viskozija film će biti deblji i obrnuto, što je otopina manjeg viskoziteta film će biti tanji. Debljina se mjeri mikrometrom. Uz kontaktnu metodu mjerenja mikrometrom, postoji i ne-kontaktna metoda mjerenja digitalnim uređajem koja je učinkovitija, ali i složenija. Prednost te metode film je u tome što film ne dolazi u doticaj s uređajem i nema oštećenja ili kontaminacije istog. Još davne 1993. godine, Park i sur. (1993) uočili su korelaciju između barijernih svojstava i debljine filma.

2.4.2. Barijerna svojstva

U barijerna svojstva ubraja se propusnost na vodenu paru, plinove, arome i masti. Važnost barijernih svojstava krije se u sprječavanju izmjena vodene pare, plinova, arome i masnoća između prostora pakovine i okolne atmosfere, a usko su povezana s rokom trajnosti proizvoda. Pri odabiru jestivih filmova koji će služiti kao ambalažni materijal u obzir treba uzeti vrstu namirnice te prema njoj odabrati propustljiv, odnosno manje propustljiv film.

Stopa prelaska vodene pare jer brzina kojom će količina vodene pare proći kroz materijal u određenom vremenskom periodu. Kod provedbe mjerenja, mjeri se porast mase uzorka s vremenom. Na propusnost utječu količina slobodne vode, debljina filma, vlažnost i sastav, odnosno omjer komponenti od koji je film napravljen (Gutierrez i sur., 2015). Uvjeti skladištenje materijala mogu utjecati na propusnost vodene pare; na primjer porastom temperature, ali smanjenjem relativne vlažnosti dolazi do povećanja propusnosti na vodenu paru. Lošija propusnost na vodenu paru pokazala se kod jestivih, u odnosu na konvencionalne filmove.

Ovisno o vrsti namirnice, količina kisika može varirati između poželjnog do strogo nepoželjnog. Pojava kisika može izazvati degradacijske promjene na namirnicama, oksidaciju masti i rast nepoželjnih mikroorganizama (Ayaranci i Tunc, 2003). Ulje je jedna od namirnica u kojoj je kisik izrazito nepoželjan jer prolaskom svjetlosti i kisika dolazi do oksidacije masti te neželjenog okusa i mirisa koji odbijaju konzumenta; s druge strane, kisik u pakiranju svježeg mesa pomaže u očuvanju poželjne crvene boje (Brewer, 2004). Gruniger i sur. (2006) su zaključili da struktura filma puno više utječe na propusnost na kisik, nego kemijski sastav istog. Dobar omjer plinova kod pakiranja, odnosno upotreba modificirane atmosfere pomaže u očuvanju svježine nekih namirnica, posebice voća i povrća (Kader i sur., 1989).

2.4.3. Topljivost i udio vode

Topljivost je mjera hidrofilnosti/hidrofobnosti filma, odnosno način ponašanja filma u doticaju s vodom. Koliko će neki film biti topiv ili ne topiv u vodi govori činjenica od kojih je komponenti i u kojim omjerima film napravljen. Topljivost filma je bitna jer utječe na probavljivost i apsorpciju aktivnih komponenti nakon konzumacije, ali i zbog straha od prijevremenog otapanja filma na površini namirnice (Hasl, 2022). Za namirnice koje su osjetljive na migracije vode poželjno je koristiti hidrofobne filmove.

Udio vode predstavlja omjer između suhe tvari i slobodne vode, a predstavlja ukupni volumen vode umrežen u polimernoj strukturi filma (Buljan, 2020).

2.4.4. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva materijala ispituju se radi procjene održivosti i trajnosti filma tijekom procesa obrade (Debeaufort i sur., 1998). U mehanička svojstva materijala ubrajaju se elongacija pri pucanju, vlačna čvrstoća i Youngov modul elastičnosti. Elongacija i vlačna čvrstoća daju informaciju o maksimalnoj točki istezanja koju film može podnijeti, a da ne pukne, a Youngov modul prikazuje ukočenost filma (Pereda i sur., 2012). Jestivi filmovi imaju slabija mehanička svojstva od sintetičkih (Han i sur., 2015), a njihove performanse moguće je unaprijediti dodatkom plastifikatora, aditiva, emulgatora i stabilizatora.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao osnova za izradu materijala u ovom radu korišteni su prirodni biopolimeri:

1. KITOZAN (tip 652, molekulske mase 165 kDa, stupanj deacetiliranja iznad 85 %, France Chitin, Marseille, Francuska)
2. ŽELATINA (ribljeg podrijetla, Louis Francois, Croissy Beaubourg, Francuska).

Kao bioaktivni sastojci korišteni su galna kiselina (CAS 149-91-7, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka) i eterično ulje naranče (Ireks aroma d.o.o., Jastrebarsko, Hrvatska). Za plastifikator korišten je prirodni glicerol (minimalne čistoće 99,5 %, E422, Dekorativna točka d.o.o, Hrvatska). Destilirana voda i vodena otopina octene kiseline (ledena octena kiselina, J.T. Baker, Schwerte, Njemačka) koristili su se za otapanje (dispergiranje) polimera. Prilikom pripreme zasićene otopine za održavanje relativne vlažnosti (53 % RH) korišten je magnezijev nitrat ($Mg(NO_3)_2$, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD). Za test biorazgradivosti korištena je zemlja Florafi (Eko-Terra d.o.o, Nedelišće, Hrvatska).

3.2. PRIPREMA FILMOVA

Otopina kitozana (CS) dobivena je otapanjem 2 grama praha kitozana u 1 % (v/v) vodenoj otopini octene kiseline kako bi se dobila 2 % (m/v) filmogena otopina koja se miješala na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja polimera. Otopina želatine (GEL) pripremljena je otapanjem 4 g želatine u 100 ml destilirane vode (4 % m/v filmogena otopina). Otopina se grijala na 70 °C kroz 30 minuta kako bi se omogućilo geliranje i umrežavanje lanaca želatine prilikom hlađenja. Otopine su izmiješane i ostavljene na magnetskoj miješalici 1 h. U otopine je dodano po 20 % glicerola u odnosu na ukupnu količinu polimera. U filmove koji su sadržavali aktivnu komponentu galnu kiselinu, dodano je 5 % galne kiseline u odnosu na količinu želatine, što bi iznosilo 0,2 g na 100 ml filmogene otopine. Za filmove koji su sadržavali eterično ulje naranče korišteno je 1 ml u odnosu na 100 ml otopine, odnosno 1 % (v/v). Tako pripremljene filmogene otopine prethodno definiranog volumena izlivena su u Petrijeve zdjelice poznatih dimenzija i stavljene na sušenje u ventiliranu klima komoru (HPP110, Memmert, Schwabach, Njemačka) tijekom 24 h pri kontroliranim uvjetima temperature od 30 °C i relativne vlažnosti 40 %. Filmovi su odlijepljeni od podloga i čuvani u eksikatoru sa zasićenom otopinom $Mg(NO_3)_2$, kako bi se

postigli uvjeti relativne vlažnosti od RH 53 % pri 23 ± 2 °C. Pripremljeni filmovi prikazani su na slici 7.



Slika 7. Pripremljeni filmovi na bazi (redom s lijeva na desno) kitozan i želatina (CSGEL), kitozan, želatina i galna kiselina (CSGELGA), kitozan, želatina i eterično ulje naranče (CSGELOEO), kitozan, želatina, eterično ulje naranče i galna kiselina (CSGELOEOGA)

3.3. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA

3.3.1. Određivanje debljine filmova

Za određivanje debljine filma korišten je digitalni mikrometar (Digimet, HP, Helios Preisser, Gammertingen, Njemačka). Mjerenja su provedena na 10 različitih mjesta na uzorku, a kao konačna debljina filma koristila se srednja vrijednost svih mjerenja uz pripadajuću standardnu devijaciju (μm).

3.3.2. Određivanje boje filma

Boja filma određena je pomoću kolorimetra (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d, Langenhagen, Njemačka) koji radi na principu u CIE $L^*a^*b^*$ prostornog dijagrama boja. Sustav boja predstavlja kvantitativni odnos boja na tri osi: L^* vrijednost označava svjetlinu, a a^* i b^* su koordinate kromatičnosti. Svjetlina L^* je ograničena između 0 (apsolutna crna) i 100 (bijela), dok koordinate a^* i b^* nemaju fiksne granice (Durmus, 2020). Vrijednost a^* predstavlja raspon crveno - zeleno, dok se b^* odnosi na raspon žuto - plavo. Postupak mjerenja ponavljao se 10 puta po uzorku. Dobiveni rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom

devijacijom. Kolorimetrijska razlika (ΔE) pokazuje odstupanje reprodukcije od originala, a računa se kao srednja vrijednost razlika između L , a i b vrijednosti standarda (referentna vrijednost) i vrijednosti izmjerene na uzorku, prema sljedećoj jednadžbi [1]:

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

sa:

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

i gdje su:

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

L_1 , a_1 , b_1 - vrijednosti ispitivanog uzorka boje.

3.3.3. Određivanje transparentnosti filmova

Mjerenje transparentnosti filmova provedeno je na UV-VIS spektrofotometru (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD). Izrezani komadi, otprilike jednakih dimenzija, stave se na mjesto predviđeno za kivete te se mjeri apsorbancija pri 600 nm. Iz dobivenih podataka o apsorbanciji izračuna se transparentnost filma prema sljedećoj jednadžbi [2]:

$$\tau = \frac{A_{600}}{x} \quad [2]$$

gdje je:

A_{600} - apsorbancija izmjerena pri 600 nm,

x - debljina filma (mm).

3.3.4. Određivanje udjela vode i topljivosti filmova u vodi

Topljivost filmova je definirana kao količina suhe tvari otopljena u destiliranoj vodi nakon uranjanja tijekom 24 h prema metodi Gontard i sur. (1996). Prije mjerenja, svi uzorci čuvali su se u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima relativne vlage od 53 %. Filmovi jednakih dimenzija (2 x 2 cm) najprije su osušeni na temperaturi 105 °C, zatim su izvagani na analitičkoj vagi kako bi im

se odredio početni udio suhe tvari (W_i). Tako osušeni i izvagani filmovi, preneseni su staklene bočice s 30 ml destilirane vode 23 ± 1 °C. Nakon 24 h filmovi su izvađeni iz bočica i ponovno se stavljaju na uvjete sušenja 105 °C u sušionik (Memmert, Schwabach, Njemačka) do konstantne mase. Potom se hlade i važu kako bi se odredila masa suhe tvari neotopljene u vodi (W_f). Topljivost filma (FS , %) izračunata je prema sljedećoj jednadžbi [3]:

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

gdje su:

FS – topljivost filma (%);

W_i – početni sadržaj suhe tvari (g);

W_f – masa suhe tvari neotopljene u vodi (g).

Udio vode u filmu određen je razlikom mase nakon sušenja (W_f) i početnog sadržaja suhe tvari (W_i) u odnosu na početnu masu. Za svaki uzorak provedeno je ukupno 4 mjerenja.

3.3.5. Bubrenje filmova

Za određivanje kapaciteta bubrenja filmova (engl. *swelling ratio*, SW) korištena je standardna metoda ASTM D2765-95C. Paralelno s određivanjem topljivosti, određen je i kapacitet bubrenja na način da se film nakon 24 h namakanja u vodi izvadi i važe prije njegova sušenja. Kapacitet bubrenja izračunat je pomoću sljedeće jednadžbe [4]:

$$SW(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} * 100 \quad [4]$$

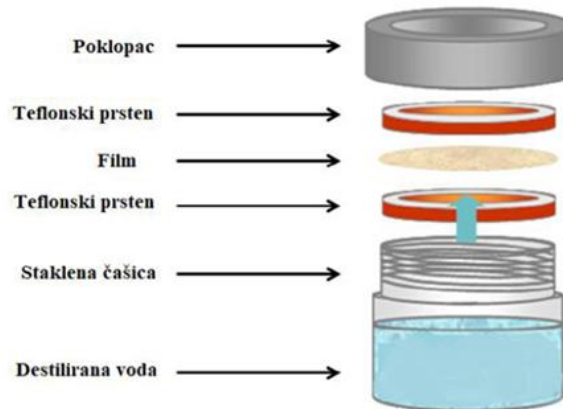
gdje je:

W_s – masa uzoraka nakon bubrenja (g);

W_d – masa suhog uzorka (g).

3.3.6. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film

Mjerenje propusnosti na vodenu paru provedeno je pomoću modificirane gravimetrijske standardne metode ASTM E96 - 80 (1980) koja je prilagođena za jestive materijale (Debeaufort i sur., 1993). Za samo mjerenje, korištena je posuda za mjerenje propusnosti prikazana na slici 8.



Slika 8. Posuda sa sastavnim dijelovima za mjerenje propusnosti materijala na vodenu paru
(prema Kurek, 2012)

Metoda se temelji na postavljanju uzorka filma između dvije okoline s različitom relativnom vlažnošću. Prije mjerenja, uzorci se čuvaju u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (53 % RH). U staklene posude ulije se 20 ml destilirane vode (RH 100 %), a zatim se izrezani uzorci filmova učvrste između dva teflonska prstena na vrhu staklene posude. Tako pripremljeni uzorci s posudama se pohranjuju u ventiliranu klima komoru (Memmert HPP110, Memmert, Schwabach, Njemačka) pri uvjetima relativne vlažnosti od 30 % i temperaturi od 25 ± 1 °C. Uzorci se važu svaka 24 h na analitičkoj vagi (KERN ABS320-4N, KERN&SOHN GmbH, Balingen, Njemačka), sve do ustaljenja gubitka mase. Za svaki film, mjerenja su provedena 9 puta. Propusnost na vodenu paru (WVP , $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) izračunata je iz promjene mase posude u odnosu na vrijeme uz pomoć sljedeće jednadžbe [5]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t * A * \Delta p} * x \quad [5]$$

gdje je:

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

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

x – debljina filma (m);

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

Također, određena je i brzina prijenosa vodene pare kroz uzorak (*WVTR*, g m⁻² s⁻¹), koja je izračunata prema sljedećem izrazu [6]:

$$WVTR = \frac{\Delta m}{\Delta t * A} \quad (\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1}) \quad [6]$$

3.3.7. Mjerenje propusnosti na plinove

Za mjerenje propusnosti filmova na plinove, O₂ i CO₂, korišten je uređaj za mjerenje propusnosti Brugger tip GDP - C (Brugger Feinmechanik GmbH, Njemačka). Metoda je manometrijska, što znači da se mjeri razlika u tlakovima s dvije strane membrane, a membranu predstavlja mjerni uzorak (film). Filmovi se postavljaju na za to predviđeno mjesto u uređaju, između gornjeg i donjeg dijela permeacijske ćelije, točno poznatog volumena. Prije svakog mjerenja vakuum pumpom se evakuira zrak iz gornjeg i donjeg dijela ćelije, a zatim se kroz jednu stranu uzorka (gornja ćelija) propušta mjerni plin pod tlakom od 5 bara i protoka 80 mL/min. Razlika u tlakovima uvjetuje difuziju plina kroz film i samim time porast tlaka u donjem dijelu ćelije. Uređaj automatski očitava, registrira i bilježi porast tlaka na računalu, a dobivena vrijednost naziva se permeacija (cm³ m⁻² d⁻¹ bar⁻¹). Koeficijent propusnosti kisika (*OTR*) izražen je u cm³ m⁻¹ dan⁻¹ Pa⁻¹, a izračunat je kao aritmetički produkt permeacije i debljine filma, prema sljedećem izrazu [7]:

$$OTR = q * d \quad [7]$$

gdje je:

q - permeacija (cm³ m⁻² d⁻¹ bar⁻¹);

d - debljina filma (μm).

3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda korištena za određivanje količine ukupnih polifenola temelji se na sposobnosti antioksidativnih spojeva da reduciraju željezo (III)-tripiridil-triazin u željezo (II)-tripiridil triazin. Reakcija je popraćena smanjenjem intenziteta obojenja koje je proporcionalno koncentraciji antioksidansa.

FRAP reagens je pripremljen na način da se u staklenoj čaši volumena 50 ml pomiješa 25 ml acetatnog pufera (0,3M), 2,5 ml TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagensa i 2,5 ml željezovog (III) klorida u omjeru 10:1:1.

Uzorci filmova najprije su otopljeni u destiliranoj vodi. U staklene epruvete otpipetira se 300 μL ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa, promiješa i termostatira 10 minuta na temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$ u vodenoj kupelji. Nakon provedene reakcije, mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. Slijepa proba sadržavala je samo FRAP reagens i destiliranu vodu.

3.3.9. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

DPPH (1,1-difenil-2-pirihidrazil) metoda je metoda koja se temelji na hvatanju slobodnih radikala pri procjeni antioksidativnosti nekog spoja. Uzorci su stavljeni u staklene epruvete i uronjeni u 0,004 % otopinu DPPH tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi bez dotoka svjetlosti. DPPH radikali postaju stabilne molekule nakon što se odvije reakcija s antioksidansom i to rezultira promjenom boje od tamnoljubičaste do blijedožute. Intenzitet ljubičastog obojenja DPPH je obrnuto proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti uzoraka. Inicijalnu probu predstavljala je sama otopina DPPH. Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 517 nm. Postotak inhibicije mjeri se prema izrazu [8]:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\square_{\square} - \square_{\square}}{\square_{\square}} \times 100 \% \quad [8]$$

gdje je:

- \square_{\square} - apsorbancija kontrole;
- \square_{\square} - apsorbancija uzorka.

3.3.10. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola u filmovima određen je metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. Princip same metode je kolorimetrijska reakcija reducirajućeg reagensa odnosno fenola s FC reagensom koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Tijekom reakcije nastaje plavo obojenje koje je proporcionalno koncentraciji fenola koji se mjeri pri 765 nm.

U staklene epruvete otpipetira se 200 μL FC reagensa, 2 ml deionizirane vode i 20 μL ekstrakta

otopljenih filmova. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine Na_2CO_3 i uzorci se vorteksiraju. Prije mjerenja apsorbancije na 765 nm uzorci se termostatiraju u vodenoj kupelji tijekom 30 minuta na 50 °C. Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, a jedina razlika je što se umjesto ekstrakta nalazi ista količina otapala za ekstrakciju, destilirane vode. Slijepa proba služi kao kontrola. Udio ukupnih fenola računa se pomoću krivulje baždarnog pravca.

3.3.11. Biorazgradivost filmova

Uzorci pripremljenih filmova izrezani su na komade dimenzija 2 x 2 cm, odvagnuti (m_1) i stavljeni na aluminijsku mrežicu te potom zakopani na 6 cm dubine u plastične čaše koje sadrže zemlju, na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C). Filmovi su iskopani 2 puta, nakon 4 tjedna i nakon 9 tjedana od dana ukopa. Po potrebi, sakupljeni filmovi ispiru se u destiliranoj vodi kako bi se uklonio višak zemlje te se suše na 105 °C tijekom 24 h. Tako osušeni filmovi se važu te se dobiva masa (m_2) filma nakon biorazgradnje u zemlji. Udio razgradnje (%) izračunava se prema sljedećem izrazu [9]:

$$\% \text{ biorazgradnje} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \% \quad [9]$$

gdje je:

m_1 - početna masa filma (g);

m_2 - masa nakon razgradnje (g).

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka napravljena je u programu Xlstat 2023.1.6. (1410) (Addinsoft, SAD) analizom varijance (ANOVA). Podaci su rangirani i statističke razlike su ocijenjene u redovima s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukey-ovim višestrukim usporednim testovima. U svim slučajevima vrijednost $p < 0,05$ se smatra statistički značajnom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PARAMETRI BOJE I TRANSPARENTNOST

Parametri boje, veličine L^* , a^* i b^* , ukupna razlika u obojenosti (ΔE) i transparentnost pri valnoj duljini od 600 nm (T_{600}) mjereni u filmovima na bazi kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline ili eteričnog ulja naranče, te dodatkom oba aditiva prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Parametri boje (a^* , b^* , L^* , ΔE) u pripremljenim filmovima i transparentnost mjerena pri valnoj duljini od 600 nm (T_{600})

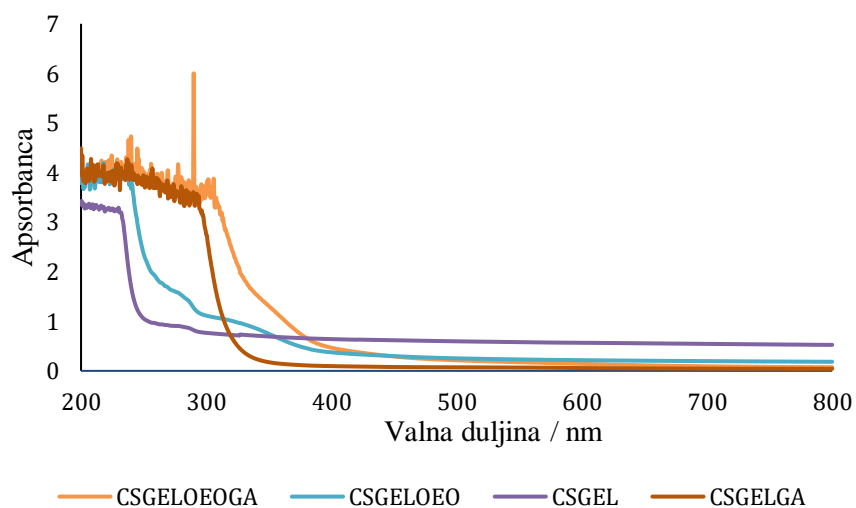
Uzorak	L^*	a^*	b^*	ΔE	T_{600}
CSGEL	$90,24 \pm 1,93^a$	$1,19 \pm 0,23^c$	$-3,51 \pm 0,76^c$	$0,00 \pm 0,00^c$	4,90
CSGELGA	$82,48 \pm 2,60^c$	$3,72 \pm 0,50^a$	$2,02 \pm 1,56^b$	$9,86 \pm 2,82^b$	0,94
CSGELOEO	$86,79 \pm 1,67^b$	$-0,44 \pm 0,85^d$	$10,56 \pm 4,31^b$	$8,29 \pm 4,33^b$	4,09
CSGELOEOGA	$77,26 \pm 3,84^d$	$2,22 \pm 0,74^b$	$10,56 \pm 4,68^a$	$19,17 \pm 5,48^a$	3,37

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Različiti eksponenti (^{a-d}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

Vizualno promatrajući filmove, uočeno je da se filmovi razlikuju u boji ovisno o dodatku, a korištenjem glicerola postiglo se da su filmovi bili ujednačeni, bez nepravilnosti na površinama (Jeya i sur., 2020). Boja filma kretala se od prozirne za CSGEL filmove, koji su bez dodataka te korišteni kao referentna vrijednost, svijetložuto do izrazito svijetlozelene boje za CSGELOEO filmove s dodatkom eteričnog ulja naranče. Filmovi s dodatkom galne kiseline CSGELGA, bili su svjetlije smeđe te filmovi s oba dodatka, CSGELOEOGA, tamnije smeđe boje (slika 7). Shodno tome, iz instrumentalnih rezultata (tablica 3), uočeno je da se L^* vrijednost koja označava svjetlinu uzorka kreće u rasponu od $77,26 \pm 3,84$ za najtamniji CSGELOEOGA uzorak do $90,24 \pm 1,93$ za najsvjetliji CSGEL uzorak. Iz navedenog se može zaključiti da galna kiselina uzrokuje smanjenje svjetline, odnosno niže L^* vrijednosti. Vrijednost parametra b^* je negativna kod CSGEL uzorka,

dok su izmjerene vrijednosti za ostale filmove pozitivne. Vrijednosti u filmovima s eteričnim ulje naranče su značajnije veće što znači da su se tonovi plave boje (negativne vrijednosti) mijenjali u tonove žute boje (pozitivne vrijednosti). Pozitivne a^* vrijednosti kod filmova ukazuju na crvene tonove, a negativne na prisustvo zelenih tonova konkretno u CSGELOEO. Statistički gledano, filmovi se razlikuju u svjetlini i nijansama boje. Ukupna razlika u obojenosti, ΔE prikazuje odstupanja u boji od originala. Kao referentni uzorak, korišten je film na bazi kitozana i želatine, odnosno CSGEL te su ostali filmovi uspoređivani s njim. Prema Luo i sur. (2019), vidljiva razlika golim oko uočljiva je ukoliko je ΔE veća od 3 što je slučaj kod svih pripremljenih filmova o ovome radu. Najveću ΔE vrijednost ima CSGELOEOGA film, a najmanju CSGELOEO (tablica 3).

Obzirom da filmovi trebaju biti odobreni od strane potrošača, posebno kada je riječ o filmovima koji oblažu proizvode i trebaju poboljšavati izgled, od izuzetne je važnosti mjerenje transparentnosti filma (Benbettaieb i sur., 2014). Kod mjerenja transparentnosti vrijednosti bi trebale biti što niže, jer što je vrijednost niža uzorak je transparentniji (Jridi i sur., 2014). Vrijednost T_{600} za CSGELGA film se značajnije razlikuje od preostale 3 vrijednosti za filmove, pa bi se moglo zaključiti da su dodatkom samo galne kiseline filmovi transparentniji, obzirom da se u prisustvu eterična ulja naranče u filmu koji sadrži i galnu kiselinu vrijednost značajnije povećala.



Slika 9. Apsorbance filmova na valnim duljinama od 200 do 800 nm CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče

Apsorbancija UV svjetla i vidljivog dijela spektra na valnim duljinama između 200 i 800 nm prikazana je na slici 9. Zbog visokog sadržaja aminokiselina s aromatskim prstenovima koji mogu apsorbirati UV zračenje filmovi na bazi želatine pokazuju dobra barijerna svojstva na UV pri valnim duljinama do 280 nm (Jridi i sur., 2014). Dodatkom galne kiseline smanjena je propusnost UV zračenja, pa filmovi CSGELGA i CSGELOEOGA pokazuju dobra barijerna svojstva između 200 i 350 nm. Dodatkom eteričnog ulja naranče (CSGELOEEO) apsorbancija se povećala na početnim valnim duljinama u odnosu na CSGEL film, ali već pri 280 nm propusnost je slična kao kod CSGEL filma. Zbog dobivenih rezultata, a i pretraživanjem literature Ahmed i Ikram (2016) može se uvidjeti kako ovako pripremljeni filmovi pokazuju korisna svojstva zaštite od UV pa bi se mogli vrlo vjerojatno koristiti u budućnosti i na taj način smanjiti oksidacijske promjene i produljiti rok trajnosti proizvoda.

4.2. UDIO VODE, SUHE TVARI, TOPLJIVOST I BUBRENJE

Udio vode, suhe tvari, topljivosti i postotka bubrenja prikazan je u tablici 4. Topljivost filma je važan parametar jer ukazuje na to kako će se film ponašati u doticaju s hranom stoga je važno da film bude netopiv odnosno otporan na vlagu i time stvori epitet dobrog ambalažnog materijala.

Tablica 4. Udio vode, udio suhe tvari, topljivost i postotak bubrenja (SW) pripremljenih filmova od kitozana i želatine

Uzorak	Udio vode (%)	Udio suhe tvari (%)	Topljivost (%)	SW (%)
CSGEL	15,06 ± 0,93 ^a	84,94 ± 0,93 ^a	45,42 ± 1,13 ^a	7,66 ± 2,40 ^a
CSGELGA	11,46 ± 4,14 ^a	88,54 ± 4,14 ^a	41,65 ± 2,72 ^a	9,75 ± 3,36 ^a
CSGELOEEO	12,25 ± 1,71 ^a	87,75 ± 1,71 ^a	38,25 ± 7,61 ^a	7,44 ± 2,07 ^a
CSGELOEEOGA	12,68 ± 0,34 ^a	87,32 ± 0,34 ^a	37,69 ± 7,50 ^a	7,29 ± 2,29 ^a

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče EkspONENT^a unutar stupca ukazuju da nema statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05)

Zbog topljivosti želatine u vodi, filmovi na bazi želatine će također biti topivi u vodi, a dodatkom kitozana u želatinske filmove ta se topljivost smanjuje (Ahmed i Ikram, 2016). Topljevost se smanjuje zahvaljujući vezama koje nastaju između kitozana i želatine pa je samim time manji broj slobodnih grupa za vezivanje s vodom. Shodno tome, manja je i mogućnost bubrenja. Udio vode pripremljenih filmova kreće se u rasponu od $11,46 \pm 4,14$ % za CSGELGA do $15,06 \pm 0,93$ % za CSGEL film. Dodatkom galne kiseline udio vode se smanjio što je u skladu s rezultatima istraživanja Pacheco i sur. (2018), gdje su autori pokazali da se dodatkom galne kiseline smanjuje udio vode, odnosno povećavanjem njezine koncentracije taj udio je sve manji. Dodatkom eteričnog ulja naranče, udio vode se također smanjio, ali manje u usporedbi s dodatkom galne kiseline. Najmanju topljevost pokazuje film s najviše komponentni, odnosno CSGELOEOGA što je i za očekivati jer broj slobodnih grupa za vezanje s vodom je u ovom polimernom matriksu najmanji. Najmanja topljevost može biti i rezultat hidrofobnog karaktera ujinih komponenti (Jancikova i sur. 2019). Nadalje, topljevost filmova može se smanjiti i zbog interakcije između polifenola koji sadrže hidrofobne i hidroksilne skupine koje mogu reagirati s aminokiselinama hidrofobnim interakcijama i vodikovim vezama (Jancikova i sur., 2019). Kapacitet bubrenja smanjio se dodatkom aktivne komponente, eteričnog ulja naranče, ali je zanimljivo da se povećao dodatkom galne kiseline, svakako ovo je potrebno detaljnije proučiti i istražiti.

4.3. DEBLJINA, PROPUSNOST NA VODENU PARU (WVP) I BRZINA PRIJENOSA VODENE PARE (WVTR) FILMOVA

Rezultati mjerenja debljine, propusnosti na vodenu paru i brzine prijenosa vodene pare prikazani su u tablici 5. Prema statističkoj obradi podataka, nema značajne razlike u debljini filmova, odnosno dodatak aktivnih komponenti nije imao utjecaja na debljinu što je u skladu s Pacheco i sur. (2018) gdje se dodatkom polifenola debljina značajnije ne mijenja.

Brzina prijenosa vodene pare je otprilike ista kod svake vrste filma iznosi oko $1 \times 10^{-2} g m^{-2} s^{-1}$. Na prijenos vodene pare kroz materijal utječu omjer hidrofilnih/hidrofobnih komponenti filma, kristaličnosti filma, vijugavosti puta i prisutnosti površinskih ili strukturnih nedostataka (Ludueña i sur., 2012.). Iz podataka u tablici 5, vidljivo je da u filmovima s dodatkom galne kiseline ili eteričnog ulja naranče dolazi do smanjenja propusnosti na vodenu paru, dok kombinacijom oba dodatka i eteričnog ulja naranče i galne kiseline (CSGELOEOGA film) propusnost na vodenu paru se povećala i taj se rezultat statistički jedino razlikuje od ostalih. Do

smanjenja je moglo doći zbog promjena u strukturi polimera otežavajući difuziju molekula vode kao i hidrofobnih reakcija i vodikovih veza koje mogu stvarati polifenoli s polarnim grupama biopolimera. Prema istraživanjima koje su proveli Piñeros-Hernandez i suradnici (2017) može se zaključiti da se povećavanjem hidrofilnog sadržaja povećava i osjetljivost filmova na vodenu paru. Prema Khalil i sur. (2019) različiti su čimbenici koji utječu na barijerna svojstva filmova na vodenu paru poput debljine, kontakt filma s proizvodom, sastav i uniformnost filma. Uz te unutarnje čimbenike, od velike su važnosti i vanjski čimbenici temperatura i relativna vlažnost. Da se spriječi gubitak vlage u okolinu vrijednosti WVP bi trebale biti što niže što može dovesti do sušenja i narušene strukture i kvalitete proizvoda. Suprotno tome, niska propusnost dovodi do kondenzacije s unutarnje strane filma i mogućeg mikrobiološkog kvarenja. Zbog prije navedenih razloga, svaki proizvod se treba tretirati na njemu svojstven način kako bi njegova kvaliteta bila na visokoj razini.

Tablica 5. Debljina filma, propusnost na vodenu paru (WVP) i brzina prijenosa vodene pare (WVTR) pri razlici relativne vlažnosti od 70 %

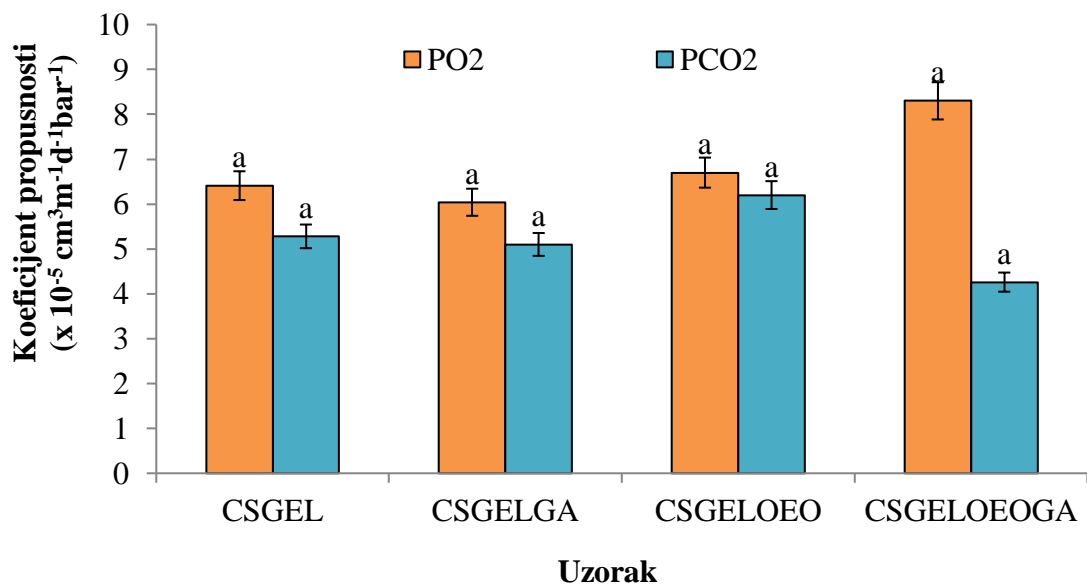
Uzorak	Debljina (μm)	WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) x 10^{-10}	WVTR ($\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$) x 10^{-2}
CSGEL	$73,67 \pm 15,81^a$	$3,69 \pm 0,16^b$	$1,10 \pm 0,05^a$
CSGELGA	$62,57 \pm 16,59^a$	$3,23 \pm 0,78^b$	$1,12 \pm 0,27^a$
CSGELOEO	$60,29 \pm 20,37^a$	$2,90 \pm 0,15^b$	$1,06 \pm 0,06^a$
CSGELOEOGA	$68,57 \pm 13,30^a$	$5,98 \pm 0,63^a$	$0,99 \pm 0,01^a$

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Različiti eksponenti (^{a-b}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

4.4. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O_2 I CO_2)

Rezultati mjerenja propusnosti na kisik i ugljikov dioksid prikazani su na slici 10. Općenito, filmovi kojima je glavna komponenta želatina pokazuju loša barijerna svojstva, dok s druge strane, kitozanski filmovi dobra te se smatra da je upravo kitozan u višekomponentnim filmovima odgovoran za dobra barijerna svojstva. Vrijednosti propusnosti na O_2 kod svih su uzoraka veće, nego vrijednosti za CO_2 . Očekivanja da će topljivost CO_2 biti viša u odnosu na O_2 jer se filmovi na

bazi kitozana pripremaju u kiselom mediju (Kurek i sur., 2014). Značajnija razlika između propusnosti kod dvaju plinova vidljiva je kod filma s dodatkom dvije aktivne komponente i galne kiseline i eteričnog ulja naranče, gdje je moguće da je došlo do narušavanja strukture materijala. Dodatkom galne kiseline, barijerna svojstva su se poboljšala što je u skladu s rezultatima Zhang i sur. (2021). Razlog zbog kojeg to povećanje nije značajnije je zbog vjerojatnosti dodatka male koncentracije galne kiseline. Filmovi koji sadržavaju eterično ulje naranče pokazali su najlošija svojstva propusnosti na kisik, ali i najbolja svojstva propusnosti na ugljikov dioksid.



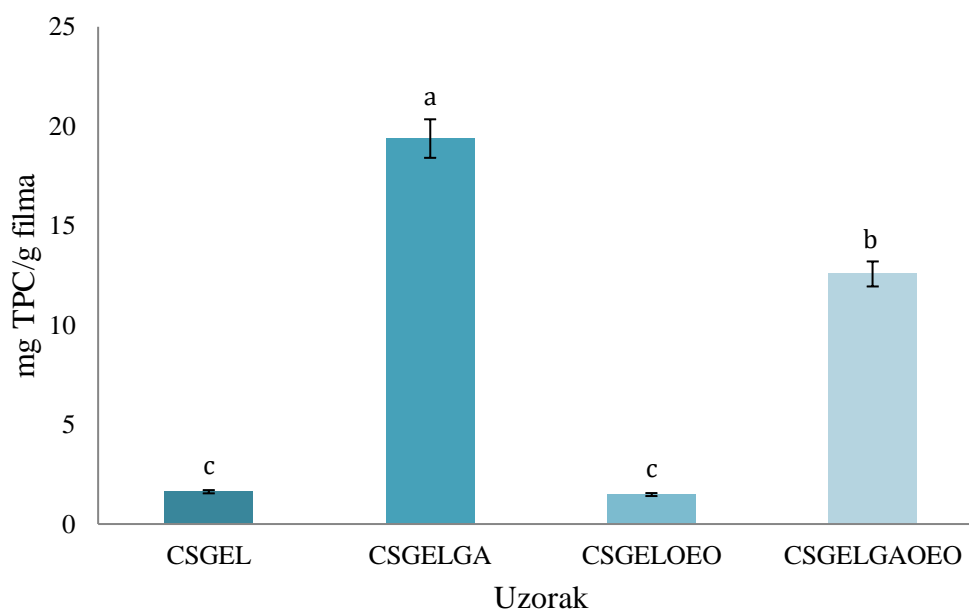
Slika 10. Koeficijent propusnosti materijala na kisik (PO₂) i ugljikov dioksid (PCO₂) CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Ekspozent (^a) iznad stupca ukazuju da nema statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05)

Kontrola vanjskih čimbenika kao što su temperatura i relativna vlažnost igraju veliku ulogu za očuvanje jestivih filmova jer nepovoljno utječu na barijerna i mehanička svojstva istih (Arboleya i sur., 2008). U nekontroliranim uvjetima pojave kisika moguće su oksidacijske promjene koje dovode do narušavanja organoleptičkih svojstava namirnice (izgled, miris, okus), ali i pojavu aerobnih mikroorganizama koji takvu namirnicu čine potpuno neprihvatljivom za korištenje (Wang i sur., 2021). Ovisno o vrsti upakiranog materijala mijenja se i uloga kisika pa tako kod pakiranja voća i povrća, kisik ima važno svojstvo očuvanja svježine i produljenja trajnosti kada se uspostavi

optimalna brzina respiracije.

4.5. UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

U karakterizaciji aktivnih filmova, antioksidacijska aktivnost je jedan od važnijih parametara jer sprječava oksidaciju tvari i na taj način produljuje rok trajnosti proizvoda (Wang i sur., 2019). Udio ukupnih fenola u pripremljenim filmovima prikazan je na slici 11, a antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP i DPPH metodama na slikama 12 i 13.

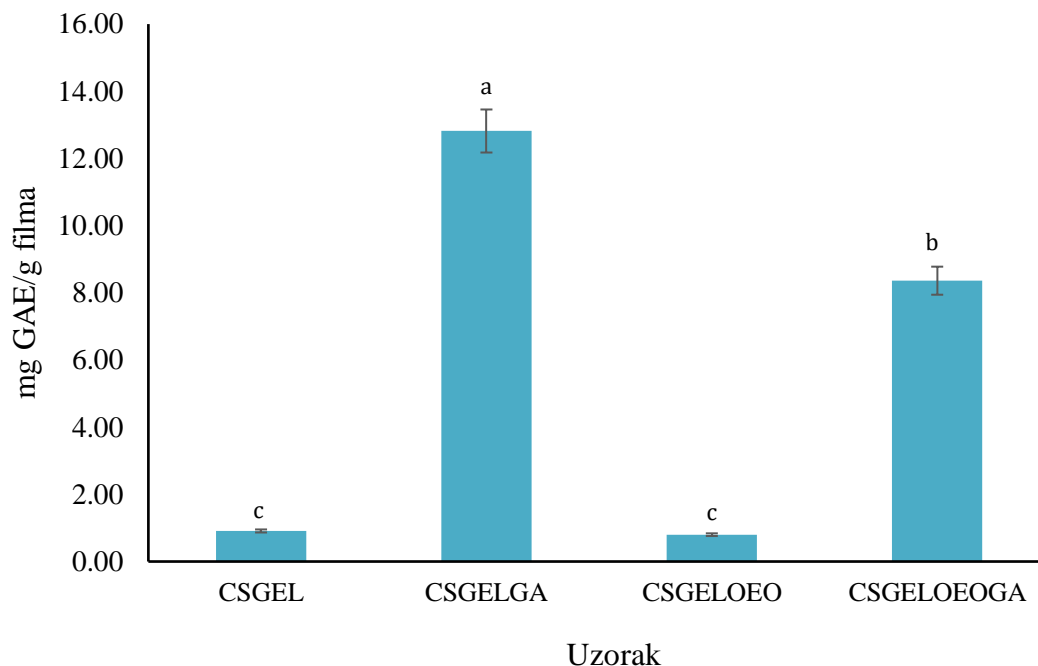


Slika 11. Ukupni udio polifenola u pripremljenim filmovima

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Različiti eksponenti (^{a-c}) iznad stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

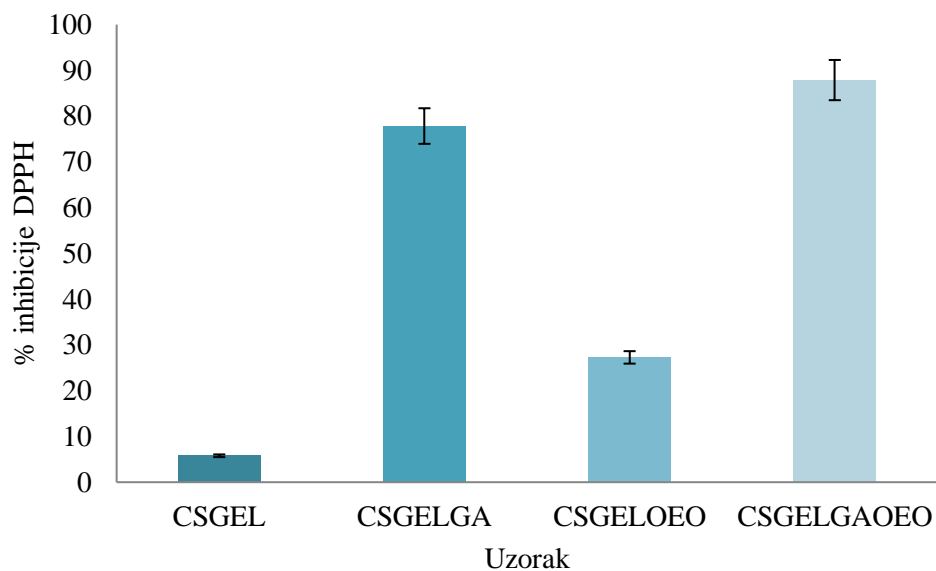
Filmovi na bazi kitozana i želatine te kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGEL i CSGELOEO filmovi, pokazuju znatno niže vrijednosti u odnosu na filmove koji sadrže galnu kiselinu. Iako ni kitozan ni želatina ne sadrže fenole, mjerljive vrijednosti ukupnih fenola u CSGEL uzorku povezuju se s reakcijom FC reagensa s amino skupinom kitozana (Bajić i sur., 2019). U uzorku CSGELGA izmjerena je najveća količinu ukupnih fenola (slika 12) i ovaj uzorak samim time pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost (slika 13). Spojevi bogati fenolima pokazuju antioksidacijski učinak na način da reagiraju sa slobodnim radikalima, apsorbiraju UV

svjetlo na valnim duljinama između 100 i 400 nm te stvaraju prijelazne metale (Benbettaïeb i sur., 2020). Prema Wang i sur. (2019) značajno se poboljšala količina ukupnih fenola dodatkom galne kiseline što je u korelaciji ovim rezultatima.



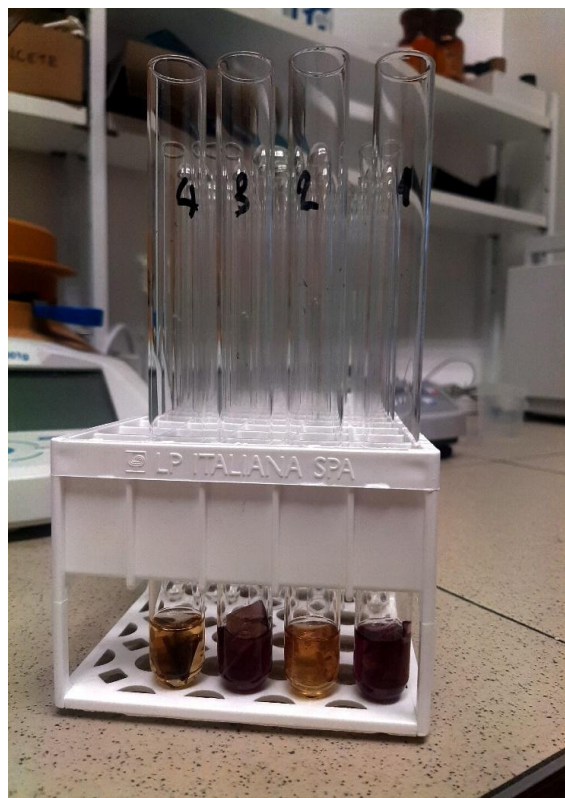
Slika 12. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Različiti eksponenti (^{a-c}) iznad stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

Uspoređujući dobivene vrijednosti iz DPPH testa (slika 14), vidljivo je da uzorak CSGELOEOGA najviše izbljedi DPPH reagens, odnosno postiže najveću inhibiciju što je i za očekivati budući su u toj formulaciji dodana dva snažna antioksidansa galna kiselina i eterično ulje naranče. Mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom (slika 13) dobiveni su rezultati gdje CSGELGA uzorak pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost, što je u korelaciji sa količinom ukupnih fenola za isti uzorak (slika 12).



Slika 13. Postotak inhibicije DPPH u mjenim filmovima

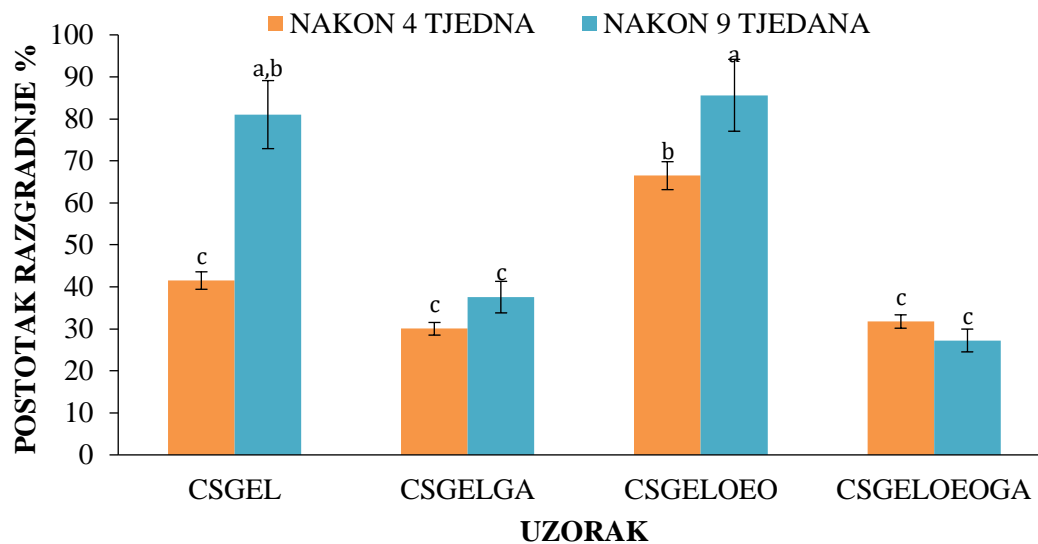
CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče



Slika 14. Promjena boje uzoraka nakon uranjanja filma u otopinu DPPH s lijeva na desno 4- CSGELOEOGA, 3 – CSGELOEO, 2 – CSGELGA, 1 - CSGEL

4.6. BIORAZGRADIVOST FILMOVA

Ovisnost postotka razgradnje o vremenu prikazan je na slici 15. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da filmovi koji nisu obogaćeni galnom kiselinom CSGEL i CSGELOEO imaju značajniji postotak razgradnje nakon 9 tjedana u odnosu na filmove CSGELGA i CSGELOEOGA, filmove s galnom kiselinom za isti vremenski period. Nakon vremenskog razdoblja od 4 tjedna filmovi CSGEL, CSGELGA i CSGELOEOGA pokazuju slične vrijednosti postotka razgradnje što je potkrijepljeno statističkom obradom podataka. CSGELOEOGA uzorak pokazuje veći postotak razgradnje nakon 4 tjedna u odnosu na vremenski period od 9 tjedana. Takav ishod može se pripisati pogrešci prilikom eksperimentalnih mjerenja, mogućem zaostatku zemlje na uzorku koja je prouzročila povećanje mase. Prema rezultatima Riaz i sur. (2020) povećanje biorazgradivosti događa se povećanjem udjela ukupnih fenola, pa se tako kitozanski filmovi nakon zakopavanja u zemlju razgrade 26,98 %, a kitozanski filmovi obogaćeni ekstraktom korijena kineskog vlasca (*Allium tuberosum*) čak 47 %. S druge strane prema Piñeros-Hernandez i sur. (2016) filmovi koji su sadržavali ekstrakt ružmarina pokazali su bolju očuvanost, odnosno manju razgradnju u odnosu na filmove bazirane samo na komponentama kasave i škroba. Uvjete biorazgradnje moguće je poboljšati povećavanjem udjela vlage zemlje u kojoj su uzorci zakopani. Vlaga i prisutnost mikroorganizama uvelike mogu pomoći pri biorazgradnji filmova. Jedan od glavnih čimbenika biorazgradivih filmova je spontana razgradnja bez kontaminacija okoliša koju film mora postići kako bi bio prihvatljiv za korištenje (Yaradoddi i sur., 2020). Unatoč razlikama u postotku biorazgradivosti koje se mogu pripisati različitim formulacijama filmova, svi filmovi na bazi polisaharida imaju sposobnost biorazgradnje (Zhu, 2021).



Slika 15. Postotak razgradnje filmova u komercijalnoj zemlji nakon 4 i 9 tjedana

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline, CSGELOEO - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom eteričnog ulja naranče, CSGELOEOGA - filmovi od kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče. Različiti eksponenti (^{a-c}) iznad stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

5. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju uspješno su pripremljeni biorazgradivi filmovi na bazi kitozana i želatine s dodatkom aktivnih komponenti galne kiseline i eteričnog ulja naranče.

1. Filmovi koji su sadržavali obje aktivne komponente, galnu kiselinu i eterično ulje naranče bili su najtamniji (smeđe boje), dok je referentni film bez dodataka bio gotovo proziran. Galna kiselina uzrokuje smanjenje svjetline, odnosno niže L^* vrijednosti. Svi filmovi imali su glatku površinu bez nepravilnosti.
2. Pripremljeni filmovi pokazuju korisna svojstva zaštite od UV zračenja, posebice filmovi koji sadržavaju galnu kiselinu.
3. Dodatkom aktivnih komponenti došlo je do smanjenja topivosti, a najmanju topljivost pokazuje CSGELOEOGA film. Što se tiče kapaciteta bubrenja, on se smanjio u CSGELOEO i CSGELOEOGA filmovima, dok je u filmu koji sadrži samo galnu kiselinu došlo do povećanja što se treba detaljnije istražiti.
4. Nema statistički značajne razlike u debljini filmova, odnosno dodatak aktivnih komponentni nije imao utjecaja na istu.
5. Dodatkom galne kiseline i eteričnog ulja naranče dolazi do smanjenja propusnosti na vodenu paru, dok kombinacijom eteričnog ulja naranče i galne kiseline, CSGELOEOGA film, propusnost na vodenu paru se statistički značajno povećala.
6. Svi filmovi pokazuju višu propusnost na ugljikov dioksid u odnosu na kisik.
7. Najveću antioksidacijsku aktivnost i ukupnu količinu fenola ima CSGELGA film.
8. Najveći postotak inhibicije DPPH metodom ima film s 2 aktivne komponentne, CSGELOEOGA.
9. Filmovi obogaćeni galnom kiselinom (CSGELGA i CSGELOEOGA) pokazuju bolju očuvanost, odnosno manji postotak razgradnje, dok filmovi koji su sadržavali eterično ulje naranče CSGELOEO kao i film bez dodataka CSGEL pokazali najveći postotak razgradnje.

6. LITERATURA

Aider M (2010) Chitosan application for active bio based films production and potential in the food industry: Review. *LWT Food Sci Technol* **43**(6), 837-842.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>

Andričić B (2009) Prirodni polimerni materijali. Priručnik. Split. Kemijsko-tehnološki fakultet.

Ahmed S, Ikram S (2016) Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *J Photochem Photobiol B: Biology* **163**, 115–124.

DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023)

Aguirre – Joya J A, De Leon – Zapata M A, Alvarez-Perez O B, Torres-León C, Nieto – Oropeza D E, Ventura – Sobrevilla J M, Aguilar M A, Ruelas – Chacón X, Rojas R, Ramos – Aguiñaga M A, Aguilar C N (2018) Basic and applied concepts of edible packaging for foods. *Food Packaging and Preservation*, (Grumezescu A., Holban A.M., ured.), Elsevier, London, str. 1 – 61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00001-4>

Arboleja J C, Olabarrieta I, Luis-Aduriz A, Lasa D, Vergara J, Sanmartín E (2008) From the chef's mind to the dish: how scientific approaches facilitate the creative process. *Food Biophys* **3**(2), 261–268. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-008-9078-3>

Alparslan Y i Baygar T (2017) Effect of chitosan film coating combined with orange peel essential oil on the shelf life of deepwater pink shrimp. *Food BioprocTechnol* **10**(5), 842-853. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-017-1862-y>

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

ASTM-D2765 Standard Test Methods. Determination of Gel Content and Swell Ratio of Crosslinked Ethylene Plastics (2016).

Ayranci E, Tunc S (2003) A method for the measurement of the oxygen permeability and the

development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chem* **80**, 423 – 431. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00485-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00485-5)

Bajić M, Jalšovec H, Travan A, Novak U, Likozar B (2019) Chitosan-based films with incorporated supercritical CO₂ hop extract: Structural, physicochemical, and antibacterial properties. *Carbohydr Polym* **219**, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.003>

Benbettaïeb N, Kurek M, Bornaz S, Debeaufort F (2014) Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Sci Food Agric* **94**(12), 2409–2419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6570>

Benbettaïeb N, Mahfoudh R, Moundanga S, Brachais C H, Chambin O, Debeaufort F (2020) Modeling of the release kinetics of phenolic acids embedded in gelatin/chitosan bioactive-packaging films: Influence of both water activity and viscosity of the food simulant on the film structure and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol* **160**, 780-794. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.199>

Beikzadeh S, Ghorbani M, Shahbazi N, Izadi F, Pilevar Z, Mortazavian A M (2020) The effects of novel thermal and nonthermal technologies on the properties of edible food packaging. *Food Eng Revi* **12**, 333-345. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-020-09227-y>

Buljan J (2020) Barijerna i mehanička svojstva jestivih filmova od kitozana s ekstraktom sjemenki grožđa, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Brewer S (2004) Irradiation effects on meat color – a review. *Meat Sci* (**68**)1, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.02.007>

Chen F, Monnier X, Gällstedt M, Gedde U W, Hedenqvist M S (2014) Wheat gluten/chitosan blends: A new biobased material. *Europ Polym J* **60**, 186-197. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.09.007>

Cho S Y, Lee S Y, Rhee C (2010) Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. *LWT Food Sci. Technol.* **43**(8), 1234 – 1239.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.014>

Costa S M, Ferreira D P, Teixeira P, Ballesteros L F, Teixeira J A, Figueiro R (2021) Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose. *Int J Biol Macromol* **177**, 241-251.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.105>

Da Silva F T, Da Cunha K F, Fonseca L M, Antunes M D, El Halal S L M, Fiorentini A M, Zavareze E D, Dias A R G (2018) Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. *Int J Biol Macromol* **118**, 107 – 115. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.079>

Debeaufort F, Quezada – Gallo J A, Voilley A (1998) Edible films and coatings: tomorrow's packagings: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **38**(4), 299 – 313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>

Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity and structure effect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**(2), 428–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04290.x>

Deepa B, Abraham E, Pothan L, Cordeiro N, Faria M, Thomas S (2016) Biodegradable Nanocomposite Films Based on Sodium Alginate and Cellulose Nanofibrils. *Mater* **9**(1), 50. <https://doi.org/10.3390/ma9010050>

Devi N S, Khatun K, Tarun B M (2016) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Colloid Interf Sci* **239**, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>

Dehnad D, Mirzaei H, Emam-Djomeh Z, Jafari S M. i Dadashi S (2014) Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydr Polym* **109**, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.063>

Direktiva (EU) 2018/852 Europskog parlamenta i Vijeća od 30. svibnja 2018. o izmjeni Direktive 94/62/EZ o ambalaži i ambalažnom otpadu

Direktiva (EU) 2019/904 Europskog parlamenta i Vijeća od 5. lipnja 2019. o smanjenju utjecaja određenih plastičnih proizvoda na okoliš

Dong M, Tian L, Li J, Jia J, Dong Y, Tu Y, Liu X, Tan C, Duan X (2022) Improving physicochemical properties of edible wheat gluten protein films with proteins, polysaccharides and organic acid. *LWT* **154**, 112868. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112868>

Durmus D (2020) CIELAB color space boundaries under theoretical spectra and 99 test color samples. *Color Research and application* **45(5)**, 796-802. <https://doi.org/10.1002/col.22521>

Elsabee M Z i Abdou E S (2013) Chitosan based edible films and coatings, *Mater Sci and Eng* **33**, 1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>

Fernandes F H A i Salgado H R N (2016) Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Analyt Chem*, **46** (3), 257-265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>

FDA (2002) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 73 https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=73&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan Pristupljeno 20. Svibnja 2023.

FDA (2013) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 443 https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=443&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan. Pristupljeno 20 svibnja 2023.

Fernandes F G H i Salgado H R N (2016) Gallic acid: Review of the methods of determination and quantification. *National Library of Med* **46(3)**, 257-265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>

Galić K (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4**(1-2), 23-31. orcid.org/0000-0003-1501-8812

Gontard N, Thibault R, Cuq B, Guilbert S (1996) Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J. Agr. Food Chem.* **44**, 1064–1069. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9504327>

Gruniger A, Bieder A, Sonnernfeld A, von Rohr P R, Muller U, Hauert R (2006) Influence of film structure and composition on diffusion barrier performance of SiO_x thin films deposited by PECVD. *Surf. Coat. Tech.* **200** (14 – 15), 4564 – 4571. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2005.03.044>

Gujinović M (2021) Jestivi ambalažni materijali (završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split. <https://repozitorij.ktf-split.hr/islandora/object/ktfst:927>

Gutierrez T J, Tapia M S, Perez E, Fama L (2015) Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush – cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloid* **45**, 211 – 217. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.017>

Han J, Shin S H, Park K M, Kim K M (2015) Characterization of physical, mechanical, and antioxidant properties of soy protein-based bioplastic films containing carboxymethylcellulose and catechin. *Food Sci Biotechnol* **24** (3), 939 – 945. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-015-0121-0>

Hasl K (2022) Karakterizacija filmova od alginata i kitozana s prirodnim antioksidansima iz ekstrakta ružmarina za pakiranje hrane (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

ISO 13432:2002 Packaging Recoverable Through Composting and Biodegradation

Ivanković A, Zeljko T, Talić S, Bevanda A M (2017) Bioregradable packaging in the food industry. *J of Food Safety and Food Quality* **68**(2), 23-52.

Jancikova S, Jamróz E, Kulawik P, Tkaczewska J, Dordevic D (2019) Furcellaran/gelatin hydrolysate/rosemary extract composite films as active and intelligent packaging materials, *Int. J of Biol Macromol* **131**, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.050>

Janjarasskul T, Krochta M (2010) Edible packaging materials. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**, 415-448 [10.1146/annurev.food.080708.100836](https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100836)

Jeya J, Chandrasekaran M, Venkatesan S P, Sriram V, Britto J G, Mageshwaran G, Durairaj R B (2020) Scalling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends Food Sci Technol* **100**, 210-222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>

Jridi M, Hajji S, Ayed H B, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, Souissi N, Nasri M (2014) Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties od gelatin – chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol* **67**, 373 – 379. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054>

Liu Z, Ge X, Lu Y, Dong S, Zhao Y, Zeng M (2012) Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine- based films. *Food Hydrocoll* **26**, 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.008>

Luo Y, Liu H, Yang S, Zeng J, Wu Z (2019) Sodium alginate-based green packaging films functionalized by guava leaf extracts and their bioactivities. *Mater* **12** (18), 2923. <https://doi.org/10.3390/ma12182923>

Kader A A, Zagory D, Kerbel E L, Wang C Y (1989) Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Food Sci Nutr* (**28**) 1, 1-30. <https://doi.org/10.1080/10408398909527490>

Karim A A, i Bhat R (2009) Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. *Food Hydrocoll* **23**, 563-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>

Kavas N, Kavas G i Derya S (2016) Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Food*, **14** (2), 32-317. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1109001>

Keenan T R (2003) Gelatin, *Encyclopedia of Chem Tech* **12**, 436-448. [10.1002/0471238961.0705120111050514.a01.pub2](https://doi.org/10.1002/0471238961.0705120111050514.a01.pub2)

Khalil N M, El-Ghany M N A, Rodriguez-Couto S (2019) Antifungal and anti-mycotoxin efficacy of biogenic silver nanoparticles produced by *Fusarium chlamydosporum* and *Penicillium chrysogenum* at non-cytotoxic doses. *Chemosphere* **218**, 477-486. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.129>

Kurek M (2012) Comprehensive study of the effects of formulation and processing parameters on structural and functional properties of active bio-based packaging films. Doktorska disertacija.

Kurek M, Galus S, Debeaufort F (2014) Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Pack Shelf Life* **1** (1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.01.001>

Lv L C, Huang Q Y, Ding W, Xiao X H, Zhang H Y, Xiong L X (2019) Fish gelatin: The novel potential applications, *Journal of Functional Foods* **63**, 103581. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>

Ludueña L, Vázquez A, Alvarez V (2012) Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydr Polym* **87**, 411– 421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.064>

Martinac A, Filipović-Grčić J (2002) Kitozan – biopolimer 21.stoljeća. *Farmaceutski glasnik*, **58** (1), 1-10. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:632991>.

Mitelut A C, Tanase E E, Popa V I, Popa M E (2015) Sustainable alternative for food packaging: Chitosan biopolymer. *AgroLife Sci J* **4**, 2.

Muller J, Gonzalez-Martinez C, Chiralt A (2017) Combination of Poly(lactic) acid and Starch for biodegradable food packaging. *Biobased polymers for packaging applications* **10**(8), 952. <https://doi.org/10.3390/ma10080952>

Nowak N, Grzebieniarczyk W, Khachatryan G, Konieczna-Molenda A, Krzan M, Khachatryan K (2022) Preparation of nano/microcapsules of ozonated olive oil in chitosan matrix and analysis of physicochemical and microbiological properties of the obtained films. *Innov Food Sci and Emerg Techno* **82**, 103181. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103181>

Pacheco N, Naal-Ek M G, Ayora-Talavera T, Shirai K, Román-Guerrero A, Fabela-Morón MF, Cuevas-Bernardino J C (2018) Effect of bio-chemical chitosan and gallic acid into rheology and physicochemical properties of ternary edible films. *Int J Biol Macromol* **125**, 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.060>

Pan D, Su F, Liu C (2020) Research progress for plastic waste management and manufacture of value-added products. *Adv Compos Hybrid Mater* **3**, 443–461. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42114-020-00190-0>

Park H J, Weller, C L, Vergano P J, Testu R F (1993) Permeability and mechanical properties of cellulose – based edible films. *J Food Sci* **58** (6), 1361 – 1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06183.x>

Pelissari F M, Yamashita F, Garcia M A, Martino M N, Zaritzky N E, Grossmann M V E (2012) Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films, *J of Food Eng*, **108**, 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.004>

Pereda M, Amica G, Marcovich N E (2012) Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydr Polym* **87** (2), 1318 – 1325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.019>

Pereda M, Dufresne A, Aranguren M I, Marcovich N E (2014) Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals, *Carbohydr Polym* **101**, 1018- 1026. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.046>

Petkoska T, Daniloski A, D’Cunha D, Naumovski N M, Broach A T (2021). Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Res Int* **140**, 109981. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109981>

Piñeros-Hernandez D, Medina-Jaramillo C, López-Córdoba A, Goyanes S (2017) Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloid* **63**, 488–495. [10.1016/j.foodhyd.2016.09.034](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034)

Pravilnik (2015) Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži. Narodne novine 88, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_08_88_1735.html Pristupljeno 19. Srpnja 2023.

Pravilnik (2009) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom. Narodne novine 125, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3092.html . Pristupljeno 19. Srpnja 2023.

Pravilnik (2010) Pravilnik o prehrambenim aditivima. NN62/2010. Narodne novine 62, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_05_62_1981.html .Pristupljeno 15. Lipnja 2023.

Priyadarshi R i Rhim, J W (2020) Chitosan - based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innov Food Sci Emerg* **62**, 102346. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102346>

Razola-Díaz M. del C, Hernández E D G, Villanova B G, Verardo V (2021) Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. *Food Chem* **354**, 129575. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129575>

Riaz A, Lagnika C, Luo H i sur. (2020) Chitosan-based biodegradable active food packaging film containing Chinese chive (*Allium tuberosum*) root extract for food application. *Int J of Bio Macromol* **150**, 595– 604. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.078>

Ren J, Wang X, Zhao L, Li M, Yang W (2022) Double network Gelatin/Chitosan hydrogel effective removal of dyes from aqueous solutions. *Journal of Polymers and the Enviroment* **30**, 2007-2021. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02327-8>

Rojas-Martínez L E, Flores-Hernandez C G, López-Marín L M, Martínez-Hernandez A L, Thorat S B, Reyes Vasquez C D, Del Rio-Castillo A E, Velasco-Santos C (2020) 3D printing of PLA composites scaffolds reinforced with keratin and chitosan: Effect of geometry and structure. *European Polymer Journal* **141**, 110088.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110088>

Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Dalla R M (2008) Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Sci Tech* **19**, 634 – 643.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>

Shapi'i R, Othman S, Basha R. i Naim M. (2022) Mechanical, thermal, and barrier properties of starch films incorporated with chitosan nanoparticles. *Nanotechnology Reviews* **11**(1), 1464-1477. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0094>

Shit S C i Shah P M (2014) Edible polymers; Challenges and opportunities. *J of polym* **2014**, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/427259>

Sun X, Wang Z, Kadouh H i Zhou K (2014) The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *Food Sci and Tech* **57**(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.037>

Tanase C E i Spiridon I (2014) PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications, *Mater Sci and Eng* **40**(1), 242-247. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.054>

Tokić I, Fruk G, Jemrić T (2011) Biorazgradiva ambalaža za čuvanje voća i drugih hortikulturnih proizvoda: materijali, svojstva i učinak na kakvoću. *J Cent Eur Agric* **12**, 226 – 238.

Tang X Z , Kumar P , Alavi S i Sandeep K P (2012) Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *ScienceDirect*. **3**(1), 426-442. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500508>

Uredba komisije (EZ) br. 1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o uspostavi zajedničkog postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i prehrambenih aroma.

Uredba Komisije (EU) br. 234/2011 od 10. ožujka 2011. o provedbi Uredbe (EZ) br. 1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o uspostavi zajedničkog postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i prehrambenih aroma

Uredba komisije (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.

Uredba komisije (EZ) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom.

Wang R. J, Xuemiao Z, Lingling L, Yang M (2022) Double Network Gelatin/Chitosan Hydrogel Effective Removal of Dyes from Aqueous Solutions, *Journal of Polymers and the Environment*, **30**, 2007-2021. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-021-02327-8>

Wang Y, Du H, Minhao X, Gaoxing M, Wenjian Y, Qihui H, Fei P (2019) Characterization of the physical properties and biological activity of chitosan films grafted with gallic acid and caffeic acid: A comparison study. *Food Packaging and Shelf Life*. **22**, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100401>

Wang H, Ding F, Ma L, Zhang Y (2021) Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application. *Food Bioscience* **40**, 100871. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100871>

Wróblewska-Krepsztul J, Rydzkowski T, Borowski G, Szczypiński M, Klepka T, Thakur V K (2018) Recent progress in biodegradable polymers and nanocomposite-based packaging materials for sustainable environment. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **23**(4), 383-395. DOI: [10.1080/1023666X.2018.1455382](https://doi.org/10.1080/1023666X.2018.1455382)

Wu J, Ge S, Liu H, Wang S, Chen S, Wang J, Li J, Zhang Q (2014) Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation, *Food Packaging and Shelflife* **2**, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.04.004>

Yaradoddi J S, Banapurmath N R, Ganachari S V, Soudagar M E M, Mubarak N M, Hallad S i sur. (2020) Biodegradable carboxymethyl cellulose based material for sustainable packaging application. *Sci Report* **10**(1). doi: 10.1038/s41598-020-78912-z

Zemljić L F, Tkavc T, Vesel A i Sauperl O (2013) Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material, *Surface Science* **265**, 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.086>

Zhang C, Yang Z, Shi J, Zou X, Zhai X, Huang X, Xiao J i sur. (2021) Physical properties and bioactivities of chitosan/gelatin-based films loaded with tannic acid and its application on the preservation of fresh-cut apples. *LWT* **144**, 111223. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111223>

Zhong Y, Godwin P, Jin Y, Xiao H (2020) Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials. *Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials* **3**(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>

Zhu F (2021) Polysaccharide based films and coatings for food packaging: Effect of added polyphenols. *Food Chem* **359**, 129871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129871>

Zunying L, Xiaojun G, Yuan L, Shivan D, Yuanhui Z, Mingvong Z (2012) Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine based films. *Food Hydrocolloid* **26**(1), 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.008>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis