

Priprema i karakterizacija jestivih filmova s vodenim ekstraktom kore klementine

Klaić, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:159:795235>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2025.

Lana Klaić

**PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA JESTIVIH
FILMOVA S VODENIM EKSTRAKTOM
KORE KLEMENTINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Dent.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA JESTIVIH FILMOVA S VODENIM EKSTRAKTOM KORE KLEMENTINE

Lana Klaić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058215446

Sažetak: *Pripremljeni su jestivi pektinski i alginatni filmovi s dodatkom vodenog i puferkog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima i dodatkom vodenog ekstrakta kore bez enzimskog predtretmana. Kontrolni filmovi (vodeni i puferški) su pripremljeni radi procjene utjecaja dodatka ekstrakta kore klementine na fizikalno-kemijska i mehanička svojstva filma. Dodatak vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine u jestivi film rezultira smanjenjem udjela vlage (pektinski 15,83 %, alginatni 12,99 %) i kapaciteta vezanja ulja (pektinski 1,37 %, alginatni film 1,86 %) u odnosu na kontrolni film, izraženo utječe na promjenu boje filma (pektinski $\Delta E=23,79$, alginatni $\Delta E=13,86$) te na udio ukupnih fenolnih spojeva izražen kao ekvivalent galne kiseline (pektinski 3,66, alginatni 3,63 mg GAE/g filma). Topljivost filmova u vodi je 100 %, a indeks topljivosti u vodi pektinskih (87,98 %) i alginatnih filmova (89,49 %) je najmanji za filmove pripremljene dodatkom puferkog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima. Jestivi pektinski filmovi pripremljeni dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima pokazuju dobra teksturna svojstva ($F=29,51$ N, $W=43,68$ Nmm). Zaključno, sastav jestivog biofilma utječe na svojstva dobivenog jestivog biofilma. Stoga se u sastav biofilma može dodati ekstrakt koji će doprinijeti poboljšanju svojstava biofilma kako bi on bio najprikladniji za buduću primjenu.*

Ključne riječi: jestivi film, pektin, alginat, vodeni ekstrakt, kora klementine, enzimski predtretman

Rad sadrži: 45 stranica, 20 slika, 6 tablica, 64 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Dent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Dent (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (član)
4. prof. dr. sc. Tonči Rezić (zamjenski član)

Datum obrane: 30. siječnja 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF EDIBLE PECTIN AND ALGINATE FILMS WITH THE EXTRACT OF CLEMENTINE PEEL

Lana Klaić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058215446

Abstract: *Edible pectin and alginate films with the addition of aqueous and buffered extract from enzymatically pretreated clementine peels and films with the addition of aqueous extract from untreated clementine peels were produced. Control films (with water and buffer) were produced to analyse the influence of the addition of aqueous and buffered extracts on the physico-chemical and mechanical properties of the film. The addition of aqueous extract of enzymatically untreated clementine peel leads to a reduction in the moisture content of the edible films (pectin 15.83 %, alginate 12.99 %), a reduced oil-binding capacity of the films (pectin 1.37 %, alginate 1.86 %) in comparison with control films, a significant change in the colour of the films (pectin $\Delta E=23.79$, alginate $\Delta E=13.86$) and a high content of phenolic compounds in the films expressed in Gallic acid equivalents (pectin 3.66 and alginate 3.63 mg GAE/g film). The water solubility of the films is 100%, with the water solubility index of pectin (87.98%) and alginate (89.49%) being lowest in the films prepared with a buffered extract of enzyme-treated clementine peel. Edible pectin films produced with the addition of an aqueous clementine peel extract pre-treated with enzymes exhibited good textural properties ($F=29.51$ N, $W=43.68$ Nmm). In conclusion, edible biofilm composition affects the properties of the biofilm and can be altered to prepare a biofilm with optimal characteristics for further use.*

Keywords: edible film, pectin, alginate, aqueous extract, clementine peel, enzyme pretreatment

Thesis contains: 45 pages, 20 figures, 6 tables, 64 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Maja Dent, PhD, Associate Professor

Reviewers:

1. Tomislav Bosiljkov, PhD, Full professor (president)
2. Maja Dent, PhD, Associate professor (mentor)
3. Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (member)
4. Tonči Rezić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: January 30th, 2025

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KLEMENTINA	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE KLEMENTINE	3
2.2.1. Hlapljivi spojevi	4
2.2.2. Fenoli	5
2.3. PEKTIN	6
2.4. ALGINAT	7
2.5. JESTIVI FILMOVI	8
2.5.1. Primjena jestivih filmova	9
2.6 FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA JESTIVOG FILMA	10
2.6.1. Debljina jestivog filma	10
2.6.2. Barijerna svojstva jestivog filma	11
2.6.3. Mehanička svojstva jestivog filma	11
2.6.4. Optička svojstva jestivog filma	11
2.7. ZAKONSKA REGULATIVA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. METODE	15
3.2.1. Predtretman kore klementine enzimima	15
3.2.2. Clevenger vodena destilacija	15
3.2.3. Priprema pektinskih i alginatnih jestivih filmova	15
3.2.4. Određivanje udjela vlage u jestivom filmu	17
3.2.5. Određivanje kapaciteta vezanja vode jestivog filma	18
3.2.6. Određivanje kapaciteta vezanja ulja jestivog filma	19
3.2.7. Određivanje indeksa topljivosti (WSI) jestivog filma	20
3.2.8. Određivanje teksture jestivog filma	20
3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	21
3.2.10. Određivanje boje jestivog filma	23
3.3. OBRADA REZULTATA	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE U JESTIVOM FILMU	25
4.2. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE JESTIVOG FILMA	27
4.3. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA ULJA JESTIVOG FILMA	27
4.4. REZULTATI INDEKSA TOPLJIVOSTI (WSI) JESTIVOG FILMA	29
4.5. ODREĐIVANJE TEKSTURE JESTIVOG FILMA	30

4.6 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	33
4.7. ODREĐIVANJE BOJE JESTIVOG FILMA.....	36
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Prilikom prerade citrusnog voća u proizvodnji sokova, džemova i dr. zaostaju velike količine otpada u obliku kore i pulpe, koje predstavljaju vrijedan nusprodukt bogat biološki aktivnim spojevima, a još uvijek nedovoljno istražen i iskorišten. Kora citrusa se koristi za dobivanje eteričnih ulja, no u industriji proizvodnje eteričnih ulja zaostaju vodeni ostaci u velikim količinama koji predstavljaju vodeni ekstrakt te trenutno nemaju daljnju uporabu, već se zbrinjavaju u obliku otpadnih voda. Provedeno istraživanje usmjereno je na iskorištavanje vodenog ekstrakta dobivenog nakon vodene destilacije kore klementine za razvoj novih materijala kao što su jestivi filmovi na bazi polisaharida s dodatkom plastifikatora i sredstva za umrežavanje. Jestivi filmovi spadaju u kategoriju prehrambenih proizvoda jer osim što mogu biti sastojci hrane, koriste se kao dodaci hrani, materijali u dodiru s hranom za pakiranje raznih prehrambenih proizvoda. Također, koriste se kao nosači u proizvodnji lijekova i funkcionalnih dodataka prehrani, u proizvodima za osobnu njegu te u medicinskim pomagalicama. Također, istražuje se primjena jestivih filmova u proizvodnji oralnih lijekova s bržom apsorpcijom i brzim djelovanjem.

S obzirom na širok spektar potencijalne primjene jestivih filmova, ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Priprema jestivog pektinskog i alginatnog filma s dodatkom vodenog i puferskog ekstrakta kore klementine nakon predtretmana enzimima (ksilanaza, pektinaza i celulaza=1:1:1, w/v) u vodi i u limunskom puferu (pH=5); priprema kontrolnog pektinskog i alginatnog jestivog filma s dodatkom samo vode i limunskog pufera (pH=5); priprema pektinskog i alginatnog jestivog filma s vodenim ekstraktom kore klementine koja prethodno nije podvrgnuta tretmanu enzimima.
- Fizikalno-kemijska karakterizacija pripremljenih jestivih pektinskih i alginatnih filmova (udio vlage, indeks topljivosti, kapacitet vezanja vode i ulja jestivog pektinskog i alginatnog filma) gravimetrijskim metodama, određivanje boje filma kolorimetrom, određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu kore klementine i pripremljenom jestivom filmu spektrofotometrijski, a teksture jestivog filma analizatorom strukture.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KLEMENTINA

Klementina (*Citrus x Clementina*) (slika 1) je citrus dobiven križanjem slatke naranče (*Citrus sinensis* L. Osbeck) i mandarine (*Citrus reticulata* Blanco). Kao i ostale biljke iz porodice *Rutaceae*, grm klementine je srednje veličine, a nosi plodove koji dozrijevaju sporije nego mandarine. Takozvani endokarp, to jest meso plodova citrusa podijeljeno je na segmente, s vanjske strane obavijene korom. Klementina najčešće sadrži 7-14 takvih dijelova. Kora citrusa je relativno čvrsta i ispunjena uljnim žlijezdama. Vidljiva su dva dijela kore, vanjski dio ili flavedo je obojana površina kore koja sadrži pigmente i žlijezde u kojima su ulja kore. Srednji sloj albedo je mekani bijeli sloj spužvastog izgleda (Ljubas, 2021; Durmus i sur., 2024). Kora klementine je glađa i intenzivnije boje od kore mandarina, a lakše se guli. Klementina dozrijeva u jesen. U odnosu na mandarinu i naranču, klementina je slađeg okusa, ali sadrži i opore i gorkaste tonove. Vrlo privlačna osobina klementina sa stajališta potrošača je što vrlo često nemaju koštice (Boninsegna i sur., 2023).



Slika 1. Klementina (*prema* Anonymus 1)

Najveći proizvođač klementina je Kina, a na području Mediterana zemlje poput Španjolske, Italije i Portugala prednjače količinom proizvodnje klementina. Danas se klementine konzumiraju najčešće svježe, sok klementina se koristi u proizvodnji sokova, a kora klementine se kao nusproizvodi često bacaju. Procjenjuje se da se godišnje baca 15 milijuna tona ostataka citrusa, što uključuje koru, koštice i dijelove membrana različitih vrsta citrusa (Leporini i sur., 2020). Pritom treba imati na umu da su klementine sezonsko voće, što znači da većina otpada nastaje u relativno kratkom vremenskom razdoblju. Obzirom na njihovu nutritivnu vrijednost, sadržaj fenola i drugih bioaktivnih spojeva, velik je potencijal za iskorištavanje kore klementine

u dobivanju eteričnih ulja, prehrambenih vlakana, pektina te za izolaciju bioaktivnih spojeva. Općenito, citrusi su od velike važnosti u prehrani čovjeka zbog antiviralnog djelovanja, protuupalnih i antioksidativnih svojstva. Klementina je bogata mnogim bioaktivnim spojevima pogodnim za ljudsko zdravlje, poput karotenoida koji im daju boju, flavonoida, fenola, vitamina, u prvom redu vitamina C, ali i vitamina B, provitamina A i biotina, eteričnog ulja bogatog hlapljivim spojevima.

2.2. KEMIJSKI SASTAV KORE KLEMENTINE

Kora klementine je vrlo bogata fenolima i flavonoidima: ekstrakt kore klementine sadrži 5,5 mg ekvivalenata galne kiseline i 16,5 mg ekvivalenata kvercetina po gramu suhe mase kore. Koncentracija polifenolnih spojeva (*p*-kumarinske kiseline, trans-ferulinske kiseline i hesperidina) je veća u kori klementine nego u kori naranče i mandarine (Gomez-Mejia i sur., 2019). Prema istraživanju Voća i sur. (2022), provedenom na naranči, grejpu i kumkvatu, klementina među navedenim citrusima ima najveći antioksidativni kapacitet u iznosu od 1,70 mmol Trolox/L. Dobiveni rezultat je u skladu s činjenicom da su u tom istraživanju također u klementini izmjerene najviše koncentracije bioaktivnih fenolnih i flavonoidnih spojeva, vitamina C i β -karotena u odnosu na ostale tri vrste citrusa. Općeniti kemijski sastav kore citrusnog voća prikazan u tablici 1. odredili su Munir i sur. (2024) na temelju informacija dostupnih o raznom citrusnom voću poput *Citrus grandis* (L.) *Osbeck*, *Cirtus hystrix* DC, *Citrus reticulata* Blanco.

Tablica 1. Kemijski sastav kore citrusa (prema Munir i sur., 2024)

Komponenta	w (mg/g kore)
Ukupni šećeri	165
Pektin	128
Vlakna	86
Lignin	22
Ugljikohidrati	715,70
Fenoli	179
Vitamin C	65
β -karoten	0,021
Hesperidin	0,066 do 66
Narirutin	0,03 do 26,50

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kore citrusa provodi se pomoću različitih otapala. Koriste se etil-acetat, etanol i voda. Na temelju istraživanja ekstrakcije kore limuna zaključeno je da prinosi ekstrakcije variraju ovisno o korištenom otapalu. Prinos ekstrakcije etil-acetatom je najviši (18 %), slijedi aceton (17 %), a etanol je najmanje pogodno otapalo za ekstrakciju kore limuna (Munir i sur., 2024). Moguća je ekstrakcija superkričnim fluidom, za koju se koristi velik broj otapala poput butana, heksana i pentana. Međutim, ugljikov dioksid je najpopularniji zbog

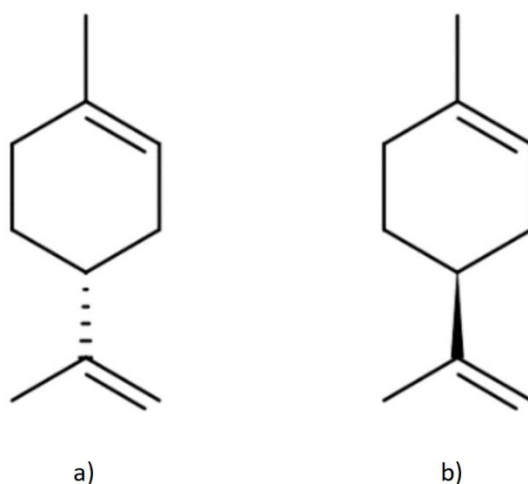
sigurnosti korištenja i pristupačne cijene. Metoda se temelji na činjenici da su pojedini plinovi u superkritičnom području iznimno dobra otapala za određene vrste spojeva (Aladić i sur., 2015). Ekstrakti dobiveni na ovaj način bolje su kvalitete od onih dobivenih tradicionalnom metodom.

2.2.1. Hlapljivi spojevi

Hlapljivi spojevi citrusima daju njihove prepoznatljive arome. Miris i senzorska svojstva citrusnog voća ovisi o sadržaju hlapljivih spojeva. Kora citrusa je bogata hlapljivim spojevima, posebice terpenoidima, aldehydima, alkoholima i esterima. Najčešći hlapljivi spojevi u kori većine citrusa jesu terpenoidi (Zhang, 2019).

Kora i sok klementine bogati su limonenom, koji u kori čini čak oko 93 %, a u soku klementine 90 % ukupnih hlapljivih spojeva. Kora klementine također sadrži linalol - nositelj cvjetne note, α -pinen, sabinen, α -sinensal koji čine po 0,20 % hlapljivih spojeva, ali i mnoge druge monoterpe i seskviterpene u vrlo niskim koncentracijama (Barboni i sur., 2011).

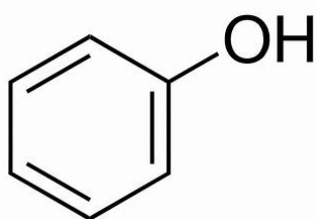
Limonen je optički aktivan spoj koji postoji u dva enantiomerna oblika, R i S (slika 2). Upravo je R-(+)-enantiomer zastupljen u eteričnom ulju kore klementine. Limonen je monoterpen zaslužan za karakterističnu citrusnu aromu (Leporini i sur., 2020). Nalazi se u brojnim vrstama voća poput grožđa i već spomenutih agruma. Koristi se kao dodatak hrani, u kozmetičkoj industriji te u proizvodnji parfema. Rjeđa je primjena D-limonena u medicinske svrhe, u prevenciji raka i prilikom otapanja žučnih kamenaca, što je manje istraženo (Siddiqui i sur., 2022).



Slika 2. Struktura R-(+) limonena i S-(-) limonena (prema Erasto i Viljoen, 2008)

2.2.2. Fenoli

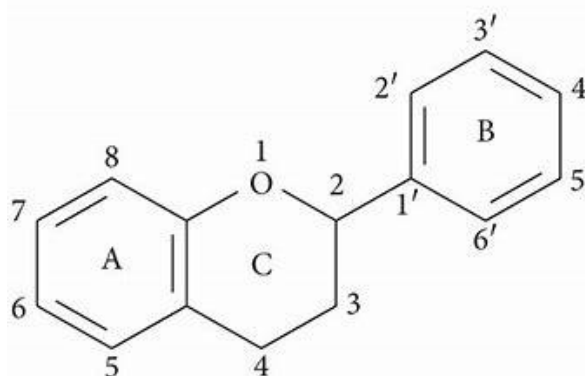
Fenoli su spojevi čiju osnovnu strukturu čine benzenski prsten na koji je vezana hidroksilna skupina (slika 3). Zahvaljujući hidroksilnoj skupini, mogu stvarati vodikove veze s drugim molekulama fenola te s vodom. Fenoli su sekundarni metaboliti mnogih biljaka, što znači da nemaju ulogu u rastu i razvoju, ali daju kompetitivnu prednost i imaju ulogu u obrambenom mehanizmu biljke, nastanku mirisa i boje, što su osobine biljke koje su važne za privlačenje oprašivača i rasprostranjivača plodova. Sinteza fenola odvija se preko šikiminske kiseline ili putem fenilpropanoide (de la Rosa, 2019).



Slika 3. Osnovna strukturalna komponenta fenola (*prema* Anonymus 2)

Fenoli su prisutni u gotovo svim tkivima biljaka, najčešće u obliku glikozida otopljenih u vakuoli. Podjela fenolnih spojeva je na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi su najzastupljeniji u citrusima, posebice u području kore, cvijeća i sjemenki biljaka. Vrlo su bioaktivni te imaju antioksidativno djelovanje. Stoga se može reći da je njihova zaštitna uloga u biljaka jednako važna kao i u čovjeka koji ih unosi u tijelo prehranom. Strukturnu osnovu flavonoida čine dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom (slika 4).

Zahvaljujući hidroksilnim skupinama prstena B i njihovoj sposobnosti da hvataju reaktivne vrste kisika i dušika, flavonoidi djeluju antioksidacijski. Omogućeno je doniranje vodikova elektrona radikalima koji se na taj način stabiliziraju, a novonastali flavonoidni radikal se rezonancijski stabilizira preko aromatskih prstena. Flavanoni, koji također spadaju u skupinu flavonoida, vrlo su koncentrirani u citrusnom voću. Osim već spomenutih djelovanja flavonoida, flavanoni imaju i antialergijski i antikancerogeni učinak. U kori klementine posebno je zastupljen hesperidin.

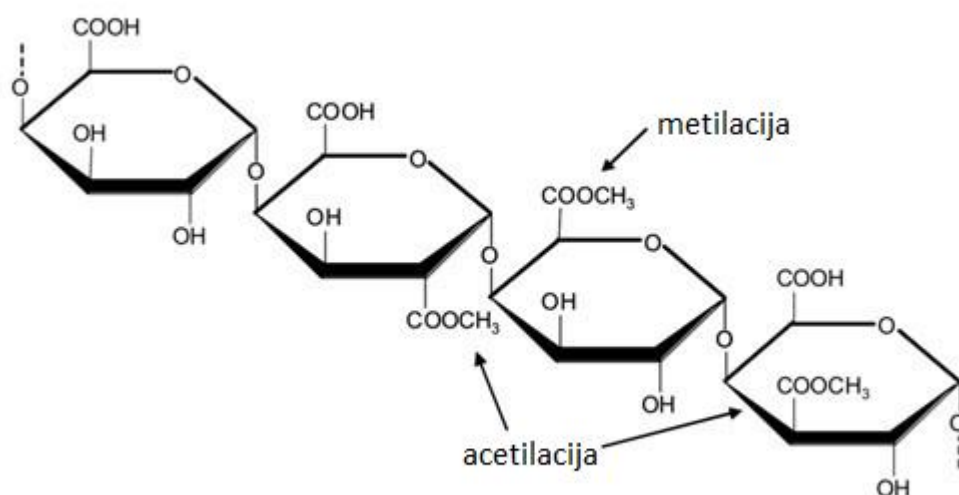


Slika 4. Strukturna osnova flavonoida (*prema* Morović, 2018)

Fenolne spojeve se također može podijeliti na topive i netopive, obzirom na njihovu strukturu i mjesto na kojem se nalaze u biljci. Spojevi poput fenola i flavonoida manje molekulske mase koji nisu vezani za komponente membrane pripadaju skupini topivih fenolnih spojeva. Spojevi manje molekulske mase vezani na polisaharide i proteine membrane i veći fenolni spojevi poput kondenziranih tanina spadaju u netopive spojeve (de Lourdes Reis Giada, 2013).

2.3. PEKTIN

Pektin je polisaharid prisutan u staničnim stijenkama biljaka te im daje čvrstoću. Iako se nalazi u većini biljaka, najčešće se ekstrahira iz kore citrusa i komine jabuka. Osnova strukture pektina je lanac kojeg čini α -D-galakturonska kiselina povezana 1,4 glikozidnim vezama (slika 5). Povremeno u strukturi dolazi do savijanja lanca, na mjestima gdje je 1,2 - glikozidnom vezom vezana L-ramnoza umjesto galakturonske kiseline. Na L-ramnozu su često vezani drugi neutralni šećeri, te oni tvore ogranke pektina. Najučestaliji šećeri u ograncima su D-galaktopiranoza i L-arabinofuranoza, a D-ksilopiranoza i D-glukopiranoza rjeđe. Galakturonska kiselina može biti esterificirana metanolom, dok slobodne hidroksilne skupine mogu biti neutralizirane monovalentnim ionima poput iona natrija, kalija ili amonijevim ionima. Ovisno o stupnju esterifikacije, mijenjaju se funkcionalna svojstva pektina poput topivosti i sposobnosti stvaranja gelova, što posljedično utječe i na svojstva jestivih filmova (Thakur i sur., 1997).

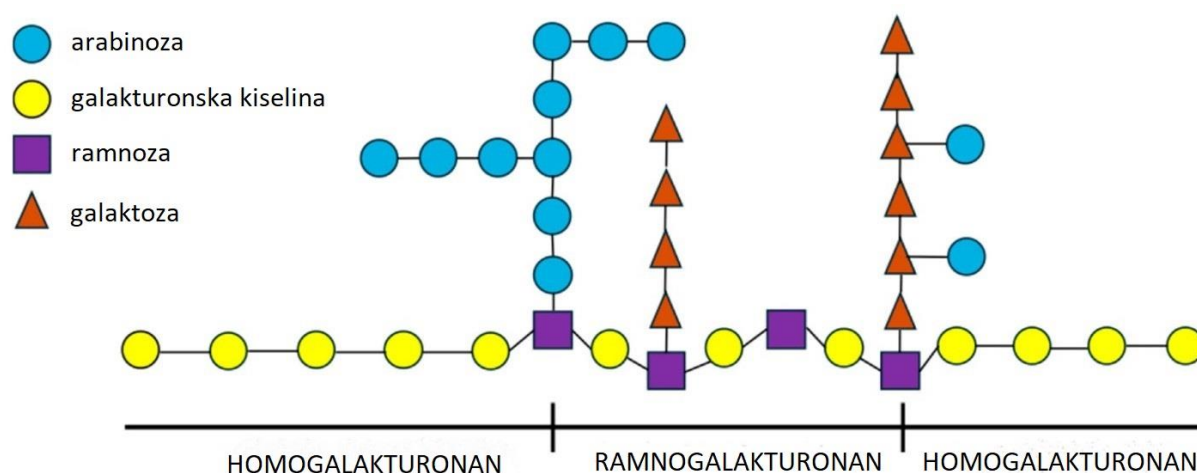


Slika 5. Osnovna struktura pektina (prema Vos, 2008)

Građu pektina dijeli se na tri domene: homogalakturonan, ramnogalakturonan I i II (slika 6). Homogalakturonan je linearni homopolimer D-galakturonske kiseline metilirane na C-6 atomu ili O-2 ili O-3 acetilirane, a čini oko 65 % pektina (Mohnen, 2008). Ramnogalakturonan I je domena čiju osnovu čini ponavljanje L-ramnoze i D-galakturonske kiseline vezane na način [-

α -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1-4-]n. Postoje brojne varijacije u učestalosti grananja i vrsti šećera u ograncima vezanim na okosnicu ramnogalakturonana I. Ramnogalakturonan II je najkompleksnija od domena pektina, a čini 10 % pektina. Sadrži brojne ogranke u kojima je različitim vezama vezano 12 vrsta šećera.

Prema stupnju metilacije komercijalni pektin može biti visokoesterificirani (HM – high methoxyl) ili niskoesterificirani (LM – low methoxyl) pektin.



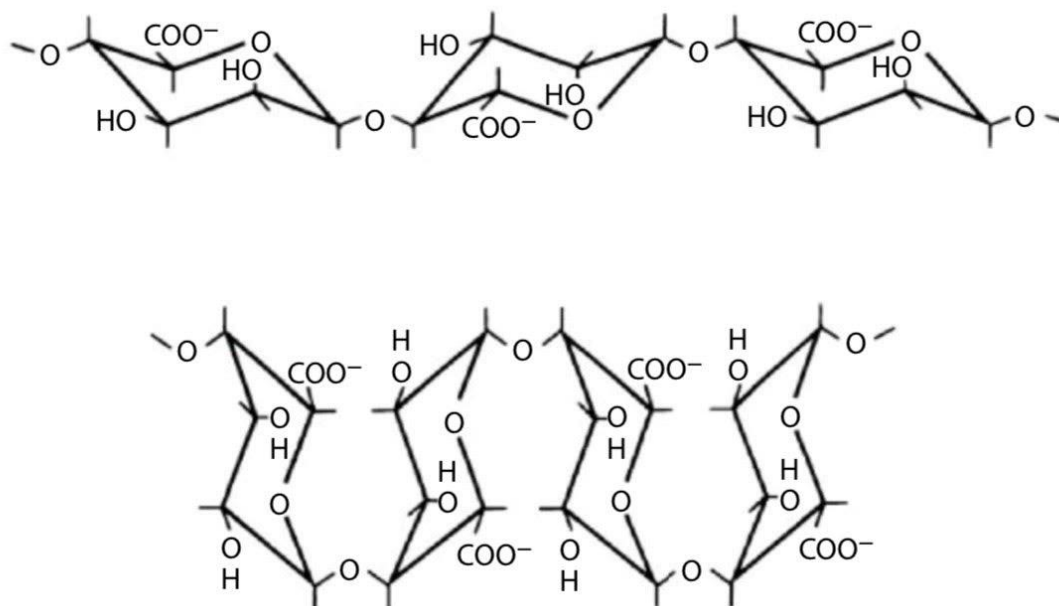
Slika 6. Domene unutar građe pektina (prema Van Rooyen i sur., 2024)

Pektin karakterizira dobra topivost u vodi i sposobnost stvaranja gelova u prisutnosti Ca^{2+} iona ili šećera i kiselina. Zbog toga je široka primjena pektina u prehrambenim proizvodima. U prehrambenoj industriji pektin je važan kao stabilizator, emulgator i zgušnjivač. Tijekom proizvodnje džemova i pekmeza također se često dodaje pektin, ali i u gumene bombone, dijetalne sokove i umake. Pektin je komercijalno dostupan u obliku žućkastog praha.

2.4. ALGINAT

Alginat je polisaharid koji se dobiva iz morskih trava i različitih rodova smeđih algi *Phaeophyceae*, kojima daje fleksibilnost, mehaničku snagu i sposobnost da zadrže vodu, što sprječava dehidraciju u dodiru sa zrakom. Osim toga, alginat proizvode i bakterije roda *Pseudomonas* i *Acetobacter* (Theagarajan i sur., 2019). Strukturnu osnovu alginata čine monomeri β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-guluronske kiseline (G) povezani 1,4-glikozidnim vezama u linearan niz, kao što je prikazano na slici 7. Struktura alginata podrijetlom iz algi može se podijeliti u tri frakcije: homopolimerne regije koje sadrže samo β -D-manuronsku kiselinu, regije koje sadržavaju samo α -L-guluronsku kiselinu, te frakcija koja sadrži blokove oba monomera u različitim omjerima. Ovisno o izvoru alginata, variraju omjeri M i G monomera, što utječe na fizikalna i kemijska svojstva alginata, pa tako i na njegovu moć stvaranja gela (Parreidt

i sur., 2018).

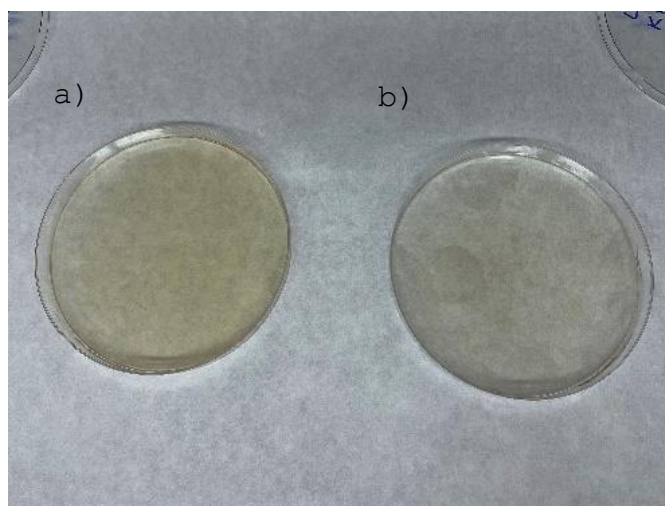


Slika 7. Struktura alginata (prema Theagarajan i sur., 2019)

Alginat može apsorbirati do 200-300 puta više vode u odnosu na vlastitu masu. Alginati su hidrofilni polimeri, oni tvore prozirne filmove topive u vodi te s dobrim mehaničkim svojstvima. Natrijeve, kalijeve i amonijeve soli alginske kiseline su topive u vodi, a netopivi su kalcijev alginat i alginska kiselina. Dodatak dvovalentnih ili polivalentnih kationa tvori netopive alginatne polimere i jače gelove (Maslov Bandić i sur., 2024). Zbog biodegradacije i biokompatibilnosti alginata, široka je njegoa primjena u mnogim industrijama. Osim u prehrambenoj industriji kao izvor vlakana, u proizvodnji vrhnja i sladoleda te kao zaštitni premaz za održavanje svježine voća, a još neki od primjera upotrebe alginata su korištenje u tekstilnoj industriji kao zgušnjivač boja za tkaninu, u industriji pića, farmaciji za inkapsulaciju u sistemima za sporije otpuštanje lijekova (Puscaselu i sur., 2020).

2.5. JESTIVI FILMOVI

Jestivi materijali na bazi biopolimera najčešće dolaze u obliku prevlaka i filmova. Prevlake se nanose izravno na proizvod i tako postaju dio konačnog proizvoda. Da bi se pripremili jestivi filmovi, filmogene otopine se izljevaju i suše, a zatim se dobiveni tanki slojevi (slika 8) koriste za omatanje proizvoda ili za druge primjene. Filmogene otopine karakterizira mogućnost stvaranja filmova, a sadrže biopolimere i razne dodatke (Kurek i sur., 2022).



Slika 8. Jestivi a) pektinski i b) alginatni film (vlastita fotografija)

Biopolimeri koji se najčešće koriste u pripremi jestivih filmova su hidrokoloide, a tu spadaju polisaharidi i proteini biljnog ili životinjskog podrijetla. Osim njih koriste se lipidi. Mogu se koristiti i mješavine biopolimera i lipida kako bi se dobili kompozitni filmovi s različitim svojstvima. Osim toga, neophodan je dodatak plastifikatora, s ciljem povećanja fleksibilnosti i otpornosti na pucanje, a smanjenja krhkosti (Galić, 2009). U sastav filmova se ponekad dodaju i drugi aditivi kako bi se postigla željena fizikalna svojstva filma. Tu spadaju i aktivni spojevi, koji mogu imati antioksidativno djelovanje, nositi dodatnu nutritivnu vrijednost ili aromu. Materijali koji se koriste kod izrade jestivih filmova i prevlaka navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Materijali koji se koriste kod izrade jestivih filmova i prevlaka (prema Galić, 2009)

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

*CMC – karboksimetil celuloza, MC – metil-celuloza, HPC – hidroksipropil celuloza, HPMC – hidroksipropilmetil-celuloza

2.5.1. Primjena jestivih filmova

Jestivi filmovi se mogu koristiti za prijenos lijekova koji trebaju brzo djelovati, poput lijekova za alergije i bolesti živčanog sustava. Pritom film može utjecati na smanjenje neugodnog okusa te

smanjiti rizik od gušenja. Filmovi imaju i topikalnu primjenu kao analgetici i lijekovi površinskih rana s bakteriostatičnim i fungistatičnim djelovanjem, pri čemu je posebno važna činjenica da se radi o biokompatibilnim materijalima vrlo niske citotoksičnosti. Dijagnostički uređaji koji sadrže film u koji je inkorporiran lijek omogućuju kontrolirano otpuštanje lijeka u dodiru s biološkom tekućinom ili omogućuju sporije otpuštanje lijeka zbog barijernog djelovanja filma. Lijekovi se mogu prenositi pomoću jestivog filma, koji u tom slučaju služi kao nosač lijeka do gastrointestinalnog trakta gdje se lijek otpušta zahvaljujući djelovanju enzima gastrointestinalnog trakta ili kao posljedica promjene pH vrijednosti okoline (Tiwari i sur., 2018).

Istražuje se primjena jestivih filmova u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini. U radu Acevedo i sur. (2018) proizvedeni su jestivi filmovi na bazi alginata i ribljeg želatina s gelirajućim agensom i plastifikatorom. Pokazano je da su filmovi biokompatibilni s mišićnim stanicama koje su uzgajane na filmu, te film pozitivno utječe na adheziju i proliferaciju mioblasta, pa se uspješno koriste u proizvodnji mišićnog tkiva ili mesa *in vitro*.

Pakiranje za hranu se definira kao prekrivanje ili zatvaranje hrane unutar neke vrste bioaktivnog materijala, sa ciljem zaštite od kontaminacije i oksidacije, kao prevencija rasta nepoželjnih mikroorganizama te za produženje trajnosti proizvoda. Osim toga, pakiranjem hrane se osigurava pozitivan učinak na održavanje svježine hrane i nutritivne vrijednosti. Proizvod koji je pakiran unutar jestivog filma zaštićen je od oštećenja i bioloških kontaminacija, pa je poboljšana kvaliteta proizvoda. Jestivi filmovi se ponašaju kao barijera kod prelaska vlage, kisika i ugljikova dioksida (i ostalih plinova), te zadržavaju hlapive komponente unutar pakiranja. Također mogu spriječiti nastanak kemijskih promjena izazvanih svjetlošću (Han, 2014). Dodatkom aktivnih tvari u sastav filma, pakiranje se može kategorizirati u skupinu takozvanih aktivnih ambalažnih materijala s dodatnom funkcionalnom ulogom. Ekološki su prihvatljiviji jer su biorazgradivi, a nisu toksični.

2.6 FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA JESTIVOG FILMA

2.6.1. Debljina jestivog filma

Važnost debljine jestivog filma je u utjecaju na rok trajanja proizvoda koji se oblaže filmom. Debljina filma je u izravnom utjecaju na biološka svojstva proizvoda. Uobičajeno je da je debljina filma manja od 0,25 mm, a moguće ju je kontrolirati volumenom filmogene otopine. Viskoznije otopine se teže izlijevaju, pa je film dobiven izlivanjem viskozne otopine u pravilu deblji. Koncentracija čvrste faze također bitno utječe na debljinu filma (Liu, 2005).

Jednostavniji način određivanja debljine filma je kontaktna metoda, a provodi se mikrometrom. Složenija metoda je takozvana nekontaktna metoda koja se određuje digitalnim uređajem, a

ujedno se radi o djelotvornijoj metodi koja ne oštećuje uzorak.

2.6.2. Barijerna svojstva jestivog filma

Barijerna svojstva filma odnose se na sposobnost filma da onemogući izmjenu vodene pare, plinova (kisika), aroma i ulja između okoline i proizvoda. Važno je da jestivi film sprječava gubitak karakteristične arome proizvoda koji je pakiran u film. Istovremeno, film treba ograničiti prijelaz kisika iz okoline u pakiranje, što usporava oksidaciju proizvoda i rezultira očuvanjem njegove kvalitete (Miller i Krochta, 1997). Stoga dobra barijerna svojstva produljuju rok trajanja proizvoda. Barijerna svojstva ovise o kemijskom sastavu jestivog filma te o strukturi polimera korištenog tijekom pripreme filma (Singh i Singh, 2005).

2.6.3. Mehanička svojstva jestivog filma

Mehanička i barijerna svojstva jestivog filma ovise o kompoziciji, međumolekulskim interakcijama i distribuciji hidrofobnih spojeva u matriksu filma (Debeaufort i sur., 1993). Čvrstoća filma je proporcionalna međumolekulskim interakcijama u jestivom filmu. Općenito su mehanička svojstva sintetičkih filmova bolja od mehaničkih svojstava jestivih filmova poput hidrokoloidnih filmova, a lipidni filmovi imaju relativno loša mehanička svojstva. Velik utjecaj na mehanička svojstva filma imaju koncentracija i vrsta plastifikatora. Dodatak plastifikatora smanjuje jačinu međumolekulskih interakcija među lancima polimera, istovremeno povećavajući fleksibilnost i rastezljivost filma (Skurtys i sur, 2010). Katkad je potrebno kombinirati polisaharide i lipide, pri čemu se dobivaju kompozitni jestivi filmovi kojima polisaharidna komponenta daje integritet, a lipidna komponenta osigurava bolja barijerna svojstva. Emulgatori su površinski aktivne tvari koje imaju i polarni i nepolarni dio, pa zato smanjuju površinsku napetost na granici dviju faza različitih polarnosti (voda-lipidi ili voda-zrak). Stoga je važnost emulgatora za kompozitne filmove, kako ne bi došlo do odvajanja na granici između lipida i polisaharida (Perez Espitia, 2013).

Postotak produljenja prije pucanja, vlačna čvrstoća i Youngov modul su fizikalne veličine kojima se najčešće karakteriziraju filmovi. Karakterizacija jestivih filmova provodi se u dva koraka: analiza strukture mikroskopskim i spektroskopskim metodama te određivanje svojstava filma (Perez Espitia, 2013).

2.6.4. Optička svojstva jestivog filma

Optička svojstva jestivog filma su važni faktori za pakiranje proizvoda, jer utječu na estetiku proizvoda. Optička svojstva poput sjaja, boje i prozirnosti određuju se kolorimetrom. Sjaj je vizualno vrlo poželjna karakteristika filma na koju utječu hrapavost površine i mikrostruktura

površine filma. Prema Hong i sur. (2004), sjaj je obrnuto proporcionalan količini svjetlosti koju materijal raspršuje. Boja filma uvelike ovisi o sastavu filma. Filmovi na bazi polisaharida obično sadrže žućkaste tonove koji su posljedica postojanja ponovljenih jedinica D-glukopiranoze (Lopez-Mata i sur., 2013). Osim dekorativne uloge, optička svojstva imaju i funkcionalnu ulogu. Prozirnost ima utjecaj na propusnost svjetlosti kroz jestivi film i posljedično na smanjenje svjetlošću potaknutih kemijskih promjena u proizvodu.

2.7. ZAKONSKA REGULATIVA

Da bi film bio jestiv, potrebno je da su sve komponente filma – biopolimeri, plastifikatori i aditivi – također jestivi. Regulacija Europske Unije i Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration* – FDA) mora odobriti GRAS (engl. *generally recognized as safe*) status komponentama jestivih filmova. Radi se o tome da: a) ne smiju biti štetne za ljudsko zdravlje, b) ne smiju utjecati na hranu na nepoželjan način, c) ne smiju mijenjati teksturu, okus ili miris hrane (Cloete, 2022).

Osim toga, važno je da su pogoni i oprema primjereni za rukovanje sa hranom i proizvodima koji s istom dolaze u doticaj. Netoksičnost za ljude i sigurnost za okoliš treba se ustanoviti primjerenim analitičkim procedurama, a preporuča se ostvarivanje certifikata za uporabu od strane nadležnih institucija. Jestivi filmovi spadaju u kategorije dodataka hrani, sastojci hrane, tvari i materijali u dodiru s hranom, a obzirom da se mogu konzumirati i u kategoriju prehrambeni proizvodi (Galić, 2009). Dakle, na filmove se odnose zakonske regulative navedenih skupina. Legislativa Europske unije definira jestive filmove kao supstance koje se dodaju hrani zbog funkcionalne uloge, ne kao uobičajeno konzumiranu hranu ili komponentu hrane (Galus, 2020). Važno je da: a) aditivi u jestivim filmovima ne smiju biti štetni za ljudsko zdravlje, b) komponente jestivih filmova ne smiju zavaravati potrošača, c) jestivi filmovi moraju ispunjavati tehnološku ulogu (poput produživanja roka trajanja), koju se ne može postići nekim drugim načinom (Sinopoli, 2013).

Pektin je vrlo važan sastojak jestivih filmova, a prepoznat je od strane Europske komisije kao siguran za upotrebu i ima GRAS status (FDA, 2020), a alginat i njegove soli odobreni su od strane FDA i imaju GRAS status (Nair i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Sirovine:

- 1) Svježe oguljena kora klementine je usitnjena na komadiće i zamrznuta do provođenja analiza.

Kemikalije:

- 1) Enzimi: Ksilanaza, Pektinaza i Celulaza (Sigma - Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- 2) Jabučni pektin (Sigma - Aldrich, Shanghai, Kina)
- 3) Alginat (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA)
- 4) Kalcijev klorid (Grammol, Zagreb, Hrvatska)
- 5) Glicerol (Grammol, Zagreb, Hrvatska)
- 6) Folin-Ciocalteu reagens (Sigma - Aldrich, Buchs, Švicarska)
- 7) Etanol, 96 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 8) Bezvodni natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 9) Galna kiselina (Sigma - Aldrich, Buchs, Švicarska)
- 10) Suncokretovo ulje (Zvijezda plus d.o.o, Zagreb, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) Aparatura po Clevengeru
- 2) Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- 3) Magnetić (BRAND GMBH + CO KG 30 x 6 mm, Kina)
- 4) Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1 UV/VIS spektrofotometar, Massachusetts, USA)
- 5) Analizator teksture TA.HD plus (Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija)
- 6) Kolorimetar Chroma meter CR-5 (Konica Minolta, Tokyo, Japan)
- 7) Čeljusti kidalice HD Tensile Grips (Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija)
- 8) Sušionik (ST-05, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- 9) Vortex mikser (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- 10) Analitička vaga (AND, tip GR 200E, razred točnosti I, Tokyo, Japan)
- 11) Laboratorijska vaga (YMC CHYO, tip MK 500 C, razred točnosti II, Zagreb, Hrvatska)
- 12) Eksikator
- 13) Okrugla tikvica s okruglim dnom (500 mL)
- 14) Plastične boce (250 mL)

- 15) Staklene čaše (150 mL)
- 16) Staklene epruvete
- 17) Stalak za epruvete
- 18) Menzura (100 mL)
- 19) Petrijeve zdjelice
- 20) Špatula, pinceta
- 21) Filter papir
- 22) Staklene kivete
- 23) Mikropipeta (100 i 1000 μ L)
- 24) Pipete (1 i 2 mL)
- 25) Odmjerne tikvice (100 i 1000 mL)
- 26) Aluminijske posudice s poklopcem

3.2. METODE

3.2.1. Predtretman kore klementine enzimima

Odvažuje se 20 g kore klementine u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 500 mL te se odvažuje po 55 mg enzima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v) i dodaje se 250 mL pročišćene vode ili limunskog pufera (pH=5). Sadržaj tikvice se promiješa, stavi na vodeno hladilo i zagrijava na magnetskoj miješalici 120 minuta pri 50 °C uz konstantno miješanje. Po završetku enzimskog predtretmana kore klementine, sadržaj iz Erlenmeyerove tikvice se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL te se započne vodena destilacija po Clevengeru prema niže opisanom protokolu (poglavlje 3.2.2.).

3.2.2. Clevenger vodena destilacija

Vodena destilacija u aparaturi prema Clevengeru se provodi za uzorke kore klementine koji su prethodno tretirani enzimima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v) u pročišćenoj vodi i u limunskom puferu (pH=5) te za svježije zamrznutu koru klementine koja nije prethodno enzimski tretirana.

U tikvicu s okruglim dnom odvažuje se 20 g kore klementine ili se prenese prethodno enzimski tretirana kora klementine te se dodaje 250 mL pročišćene vode. Sadržaj tikvice se zagrije do vrenja i vodena destilacija se provodi kroz 2 sata. Tijekom vodene destilacije temperatura se održava konstantnom, vodena para iz tikvice prolazi kroz aparaturu te se ukapljuje u hladilo gdje se izdvaja eterično ulje. Nakon destilacije, sadržaj tikvice se hladi pola sata, zatim se odvoji eterično ulje i hidrolat, a vodeni ekstrakt se filtracijom odvoji od biljnog materijala.

3.2.3. Priprema pektinskih i alginatnih jestivih filmova

U ovom radu pripremljeni su jestivi filmovi s jabučnim pektinom i alginatom (tablica 3). Korišteni su vodeni ekstrakti zaostali nakon vodene destilacije kore klementine: a) koja prethodno nije podvrgnuta tretmanu enzimima, b) nakon predtretmana enzimima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v) u pročišćenoj vodi te u limunskom puferu (pH=5). Za pripremu jestivih filmova korišteni su glicerol koji se dodaje kao plastifikator te kalcijev klorid koji se koristi kao sredstvo za umrežavanje. Rađeni su i kontrolni jestivi filmovi na način da se umjesto vodenog ili puferskog ekstrakta kore klementine koristi jednak volumen pročišćene vode ili limunskog pufera (pH=5).

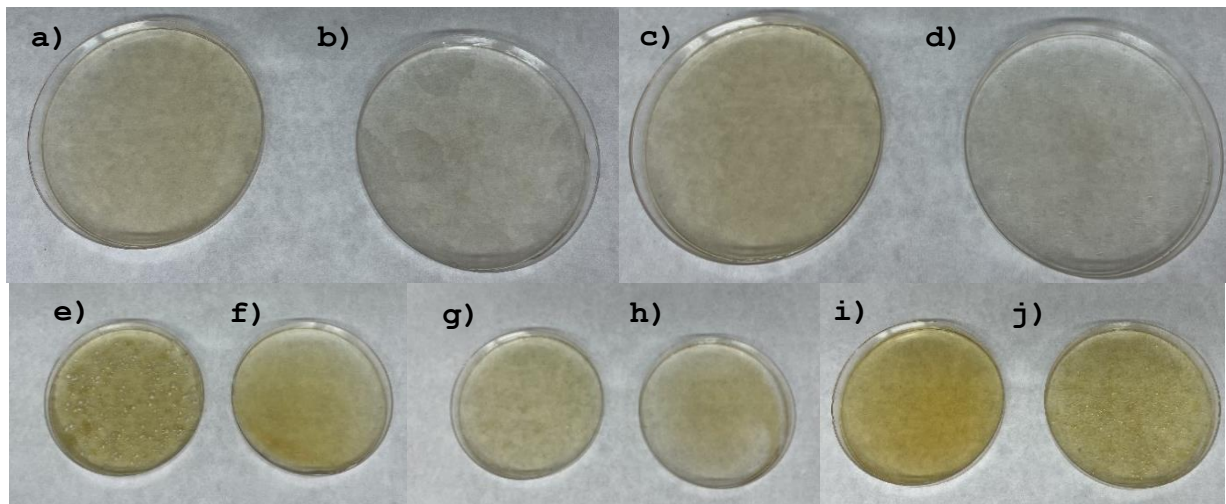
Jestivi pektinski film priprema se na način da se 2 g jabučnog pektina otopi u 100 mL pročišćene vode ili limunskog pufera (pH=5) ili ekstrakta kore klementine (vodeni ekstrakt kore klementine ili vodeni/puferski ekstrakt enzimski predtretirane kore klementine), a pritom se otapanje provodi polagano uz miješanje do potpunog nestanka grudica te se doda 40 mg kalcijeva klorida i 1 g glicerola. Dobivena otopina se zagrijava i miješa na magnetnoj miješalici 2 h, a pritom se temperatura održava oko 40 °C. Homogena otopina pripremljenog jestivog pektinskog filma se izlije u Petrijevu zdjelicu pazeći da se uklone eventualno nastali mjehurići. Petrijeve zdjelice s jestivim pektinskim filmom se suše u sušioniku pri 30 °C kroz 72 h.

Jestivi alginatni film se priprema na način da se 2 g alginata otopi u 100 mL pročišćene vode ili limunskog pufera (pH=5) ili ekstrakta kore klementine (vodeni ekstrakt kore klementine ili vodeni/puferski ekstrakt enzimski predtretirane kore klementine), a pritom se otapanje provodi polagano uz miješanje do potpunog nestanka grudica te se doda 40 mg kalcijeva klorida i 1 g glicerola. Dobivena otopina se zagrijava i miješa na magnetnoj miješalici 2 h, a temperatura se održava oko 40 °C. Homogena otopina pripremljenog jestivog alginatnog filma se izlije u Petrijevu zdjelicu pazeći da se uklone eventualno nastali mjehurići. Petrijeve zdjelice s jestivim alginatnim filmom se suše u sušioniku pri 30 °C kroz 72 h.

Nakon sušenja jestivi filmovi (pektinski i alginatni) se lagano odljepljuju s dna Petrijevih zdjelica te su u njima čuvani pri sobnoj temperaturi do daljnjih analiza. Gotovi pektinski i alginatni jestivi filmovi prikazani su na slici 9.

Tablica 3. Pripremljeni jestivi filmovi (pektinski i alginatni)

Oznaka	Opis
V-PF	Jestivi pektinski film s vodom (kontrolni uzorak)
P-PF	Jestivi pektinski film s puferom (kontrolni uzorak)
K-PF	Jestivi pektinski film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine
K-V-PF	Jestivi pektinski film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima
K-P-PF	Jestivi pektinski film s dodatkom puferskog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima
V-AF	Jestivi alginatni film s vodom (kontrolni uzorak)
P-AF	Jestivi alginatni film s puferom (kontrolni uzorak)
K-AF	Jestivi alginatni film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine
K-V-AF	Jestivi alginatni film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima
K-P-AF	Jestivi alginatni film s dodatkom puferskog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima



Slika 9. Jestivi filmovi: a) V-PF, b) V-AF, c) P-PF, d) P-AF
 e) K-AF; f) K-PF; g) K-V-AF; h) K-V-PF; i) K-P-PF; j) K-P-AF (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje udjela vlage u jestivom filmu

Udio vlage u jestivom filmu je određen standardnom AOAC metodom (AOAC, 1999; metoda 930.15). Aluminijske posudice s poklopcima se prethodno osuše u sušioniku te nakon hlađenja izvažu. Pripremljeni jestivi film se izreže tako da uzorak bude veličine 2 cm x 2 cm. Mjerenja se provode u dvije paralele. Uzorak jestivog filma se izvaže u aluminijsku posudicu nakon čega se stavlja sušiti u sušionik 24 sata, do konstantne mase pri temperaturi od 105 °C. Jestivi filmovi osušeni do konstantne mase su prikazani na slici 10. Aluminijska posudica s osušenim jestivim filmom se ponovo važe te se udio vlage u uzorku računa prema formuli [1]:

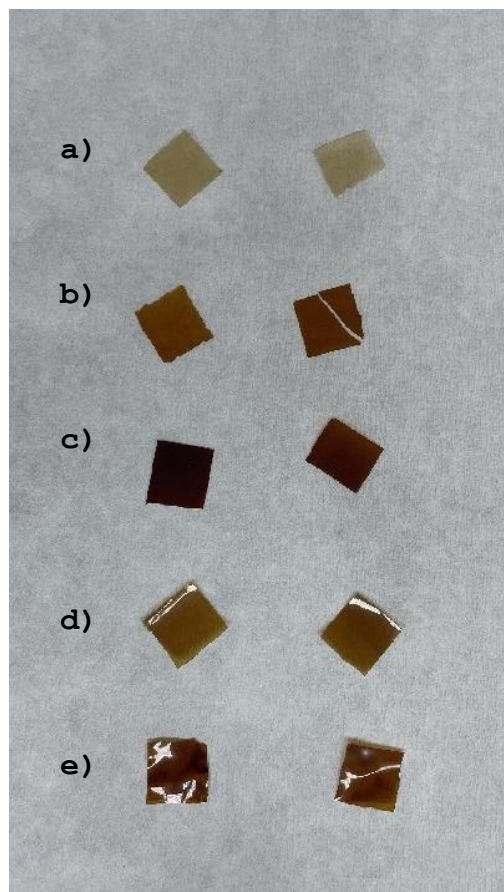
$$w \text{ (vlage)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \% \quad [1]$$

gdje su:

m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

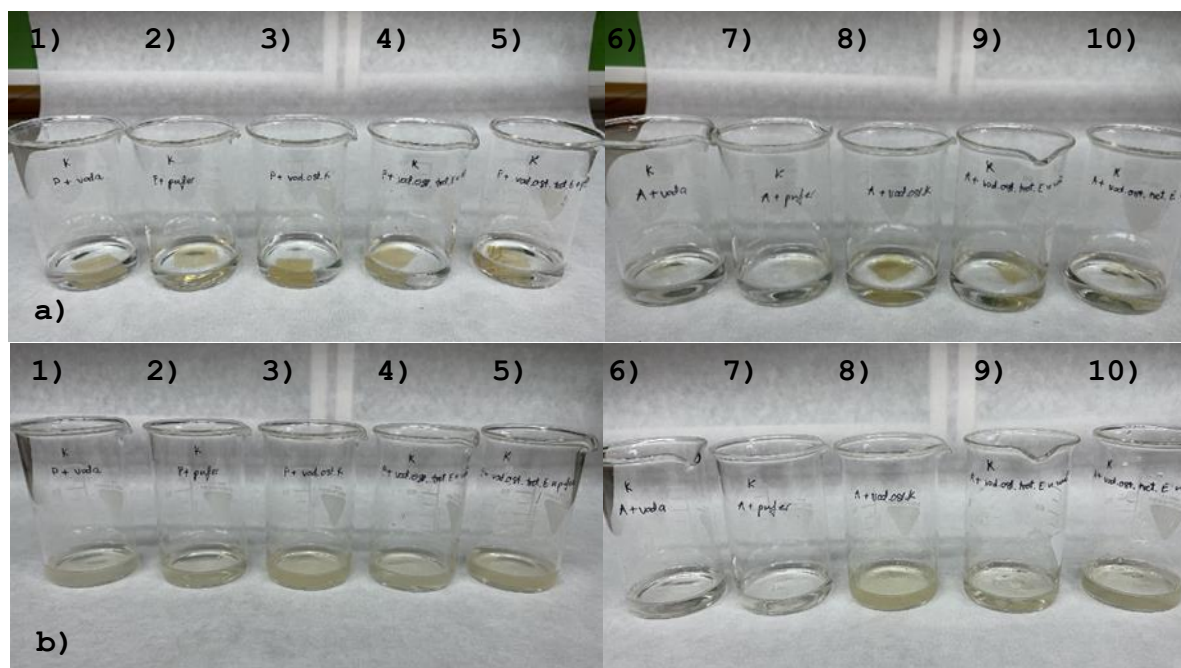
m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)



Slika 10. Uzorci jestivih pektinskih i alginatnih filmova nakon sušenja. Jestivi filmovi: a) V-PF i V-AF, b) P-PF i P-AF, c) K-AF i K-PF, d) K-V-AF i K-V-PF, e) K-P-AF i K-P-PF (vlastita fotografija)

3.2.5. Određivanje kapaciteta vezanja vode jestivog filma

Kapacitet vezanja vode jestivog filma je određen prethodno opisanom metodom (Xu i sur., 2003). U laboratorijsku čašu stavi se prethodno osušena i izvagana pločica filma dimenzija 2 cm x 2 cm (slika 11). U čašu se zatim doda 10 mL pročišćene vode te se ostavi stajati 24 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata, pločica se potpuno otapa u vodi, kao što je prikazano na slici 11, pa se može zaključiti da je kapacitet vezanja vode pektinskih i alginatnih filmova u vodi 100 %.



Slika 11. Uzorci jestivih pektinskih i alginatnih filmova: a) prije bubrenja u vodi i b) nakon bubrenja u vodi: 1) V-PF, 2) P-PF, 3) K-PF, 4) K-V-PF, 5) K-P-PF, 6) V-AF, 7) P-AF, 8) K-AF, 9) K-V-AF, 10) K-P-AF (vlastita fotografija)

3.2.6. Određivanje kapaciteta vezanja ulja jestivog filma

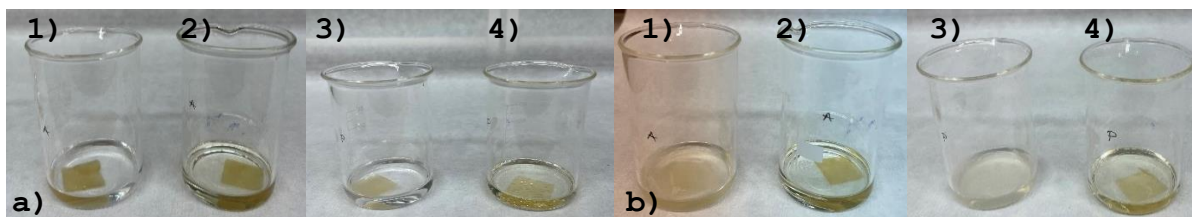
Kapacitet vezanja ulja (engl. *swelling degree*, *SD*) jestivog filma određuje se istom metodom kao i kapacitet vezanja vode. Mjerenja se provode u dvije paralele na način da se izvagana pločica filma dimenzija 2 cm x 2 cm stavlja u staklenu čašu te se u nju doda 10 mL suncokretovog ulja (slika 12a). Uzorak se tako ostavlja 24 sata pri sobnoj temperaturi, nakon čega film izgleda kao na slici 12b. Nakon što uzorak upije određenu količinu ulja, ta količina se određuje ponovnim vaganjem uzorka te izračuna kapacitet vezanja ulja prema formuli [2].

$$k = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \cdot 100 \% \quad [2]$$

gdje je:

m_1 – masa pločice prije bubrenja

m_2 – masa pločice nakon bubrenja



Slika 12. Uzorci jestivih pektinskih i alginatnih filmova: a) prije bubrenja u ulju i b) nakon bubrenja u ulju: 1) K-V-AF, 2) K-P-AF, 3) K-V-PF, 4) K-P-PF (vlastita fotografija)

3.2.7. Određivanje indeksa topljivosti (WSI) jestivog filma

Indeks topljivosti (engl. *water solubility index*, WSI) jestivog pektinskog filma određen je prethodno opisanom metodom (Irissin-Mangata i sur., 2001; Brnčić i sur., 2009). Uzorak filma se izreže na pločicu veličine 2 cm x 2 cm te se izvaže. Staklena kiveta se numerira, osuši i izvaže. U kivetu se stavi pločica uzorka i 10 mL deionizirane vode te se ostavi stajati 24 sata pri sobnoj temperaturi. Zatim se kiveta s otopljenim uzorkom centrifugira 15 minuta, pri 3000 okretaja u minuti. Kivetu sa supernatantom se stavlja na sušenje pri 105 °C do konstantne mase. Zatim slijedi vaganje kako bi se dobila masa otopljenog filma. Indeks topljivosti (WSI) pektinskog i alginatnog filma računa se prema formuli [3].

$$w(WSI) = \frac{m(\text{supernatant})}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \% \quad [3]$$

3.2.8. Određivanje teksture jestivog filma

Za određivanje mehaničke čvrstoće jestivog filma korišten je analizator teksture s mjernom ćelijom od 750 kg. Mjerenja se provode u tri paralelna određivanja, a koristi se uzorak jestivog filma veličine 3 cm x 1 cm. Uzorak jestivog filma se postavi između čeljusti uređaja koje su razmaknute 10 mm. Prije-testna brzina iznosi 0,3 mm/sec. Pokretanjem uređaja započinje kretanje gornje čeljusti testnom brzinom od 0,1 mm/sec, pri čemu se uzorak rasteže do potpunog pucanja. Kao rezultat dobiva se dijagram ovisnosti maksimalne sile (F_{\max}) o vremenu (t) koje je potrebno da uzorak pukne, to jest o udaljenosti nakon koje uzorak puca. Neki uzorci počinju se deformirati prije pravog loma filma, a tu pojavu naziva se predpucanjem. Pravi lom se definira kao trenutak u kojem se uzorku nepovratno mijenja oblik. Trenutak pucanja definira čvrstoću filma (Brnčić i sur., 2008).

Rezultati se obrađuju u programu *Exponent*, u potprogramu *5 Repeat Until Count*. Iz dijagrama je moguće odrediti vrijednosti prekidne sile (F) izražene u njutnima (N), a radi se o sili pri kojoj jestivi film u potpunosti puca, postotnu deformaciju (\mathcal{E}) izraženu u postocima (%) i rad (W) utrošen na kidanje filma (Nmm).

3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

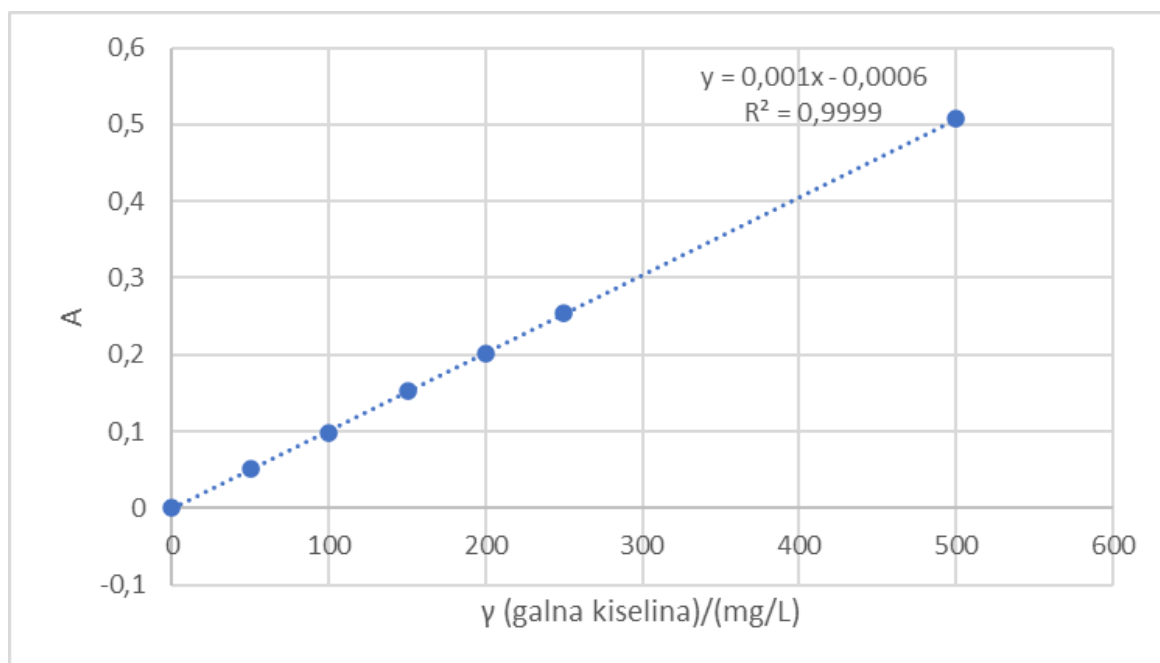
Metoda određivanja ukupnih fenolnih spojeva temelji se na kolornoj reakciji prisutnih fenola s Folin Ciocalteu reagensom (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline) u blago alkalnim uvjetima, mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm (Singleton i Rossi, 1965).

Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola:

- Folin Ciocaltheu (1:2, v/v), pripremi se razrjeđivanjem deioniziranom vodom u omjeru 1:2.
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v) se pripremi otapanjem 200 g anhidrida natrijeva karbonata u 800 mL vruće destilirane vode i ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata i nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Nakon 24 sata se profiltrira.
- Standardna otopina galne kiseline ($\gamma=5$ g/L) pripremi se vaganjem 250 mg galne kiseline u lađici za vaganje. Potom se pomoću 96 %-tnog etanola prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi, nakon čega se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Postupak izrade baždarnog dijagrama:

Za pripremu baždarnog pravca koristi se prethodno pripremljena standardna otopina galne kiseline ($\gamma=5$ g/L) iz koje se dalje razrjeđivanjem pripremi niz standardnih otopina galne kiseline masenih koncentracija 50, 100, 150, 200, 250 i 500 mg/L. Za mjerenje apsorbancije svake pojedinačne standardne otopine galne kiseline, u staklenu epruvetu se redom otpipetira 125 μ L otopine standarda galne kiseline, zatim 625 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (1:2, v/v) i 10 mL destilirane vode. Pričeka se tri minute pa se dodaje 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %, w/v). Slijepa proba se pripremi na način da se umjesto standarda galne kiseline, dodaje 125 μ L deionizirane vode. Sadržaj epruvete se promiješa pomoću Vortexa. Uzorci se termostatiraju u vodenoj kupelji pri 50 °C, 25 minuta. Uzorci se prebacuju u kivete kako bi im se izmjerila apsorbancija pri 765 nm. Baždarni pravac na slici 13 prikazuje ovisnost apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L), a crta se pomoću programa Microsoft Excel. Prema jednadžbi pravca računat će se maseni udio ukupnih fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline u kori klementine, odnosno u jestivom filmu.



Slika 13. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline

Postupak određivanja ukupnih fenola u vodenom i puferskom ekstraktu kore klementine:

Kako bi se odredio maseni udio ukupnih fenola u vodenom i puferskom ekstraktu kore klementine, u staklenu epruvetu otpipetira se po 125 μ L uzorka, 625 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (1:2, v/v) te 10 mL destilirane vode. Pričeka se tri minute te se doda 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %, w/v) nakon čega se epruveta promiješa pomoću Vortexa i stavi u kupelj pri 50 °C, 25 minuta. Uzorak se zatim prebacuje u kivetu kako bi mu se izmjerila apsorbancija pri 765 nm. Mjerenja se provode u dvije paralele. Iz jednadžbe pravca izračuna se maseni udio ukupnih fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline u kori klementine (mg GAE po g kore klementine).

Postupak određivanja ukupnih fenola u jestivom filmu:

Određivanje ukupnih fenola u pektinskom i alginatnom jestivom filmu provodi se na način da se prvo izreže komadić filma veličine 2 cm x 2 cm. Film se zatim stavlja u staklenu čašu u koju se doda 10 mL deionizirane vode, te tako stoji 24 sata pri sobnoj temperaturi. Jestivi film se u vodi u potpunosti otopi te se pristupa određivanju ukupnih fenolnih spojeva na način da se uzme 125 μ L otopine filma te se ponavlja prethodno opisani postupak određivanja fenola u vodenom i puferskom ekstraktu kore klementine. Iz jednadžbe pravca izračuna se maseni udio ukupnih fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline u jestivom filmu (mg GAE u g jestivog filma).

3.2.10. Određivanje boje jestivog filma

Boja filma određuje se spektrofotometrijski, koristeći kolorimetar Chroma meter CR-5 (Konica Minolta, Tokyo, Japan). Prije određivanja boje uzoraka, uređaj je potrebno kalibrirati na crno-bijelo. Mjeri se transmitancija, a parametri uređaja su namješteni na lambda D65 i kut (H ANGLE) 10° . Uzorke jestivog filma je prije mjerenja potrebno izrezati na kvadratiće $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ te se oni postavljaju na otvor uređaja koji mjeri vrijednosti L^* , a^* , b^* , C^* , h , kako bi se vrijednosti mogle prikazati u CIE $L^*a^*b^*$ trodimenzionalnom modelu boja (slika 14). Za svaki se uzorak provode tri mjerenja te se rezultati iskazuju u obliku srednje vrijednosti. Pomoću dobivenih vrijednosti računa se ukupna kolorimetrijska razlika uzorka (ΔE_{ab}^*) u odnosu na referentne uzorke (uzorci bez vodenog ekstrakta kore klementine) prema formuli [4] (Pavlič i Petrič, 2020). Kolorimetrijska razlika je jedinstvena vrijednost koja obuhvaća, to jest uzima u obzir promjenu svakog parametra u odnosu na referentnu vrijednost. Vrijednost kolorimetrijske razlike ukazuje na vidljivost razlike u boji, kao što je prikazano u tablici 4.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [4]$$

Pri čemu su:

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

Gdje su:

L_0 , a_0 , b_0 – vrijednosti ispitivanog uzorka

L_1 , a_1 , b_1 – vrijednosti referentnog uzorka (slijepe probe) u odnosu na koji se mjeri odstupanje boje uzorka

Tablica 4. Vizualna razlika dvaju boja na temelju kolorimetrijske razlike (prema Pavlič i Petrič, 2020)

ΔE_{ab}^*	Vidljivost razlike
< 0,5	Razlika vidljiva golim okom
0,5 – 1,0	Razlika vidljiva samo iskusnom oku
1,0 – 2,0	Teško uočljiva, ali razlika vidljiva i neuvježbanom oku
2,0 – 4,0	Vidljiva razlika
4,0 – 5,0	Značajna razlika u boji
> 5,0	Vrlo značajna razlika, može se reći da se radi o drugoj boji

Različite kombinacije brojeva u CIE $L^*a^*b^*$ prostornom sustavu boja predstavljaju sve boje koje ljudsko oko može percipirati. U ovom modelu, suprotni parovi boja predstavljaju osi sustava.

Os a označava raspon boja crveno-zelenu, os b raspon boja žuto-plavo, te akromatska os L sa vrijednostima od bijele (100 %) do crne (0 %). Pritom vrijedi:

$-\Delta L$ – uzorak je tamniji od standarda

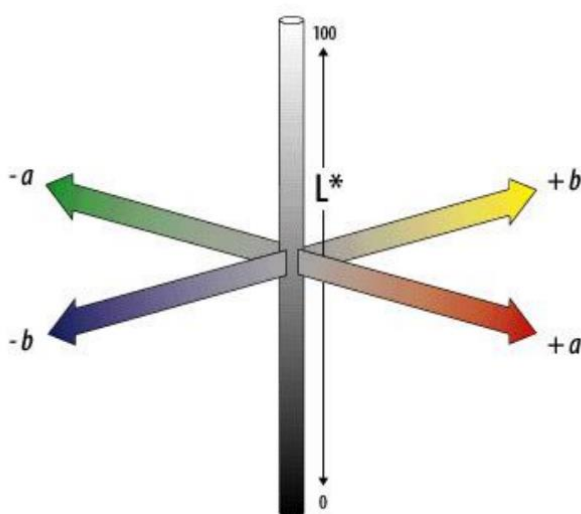
$+\Delta L$ – uzorak je svjetliji od standarda

$-\Delta a$ – uzorak je zeleniji od standarda

$+\Delta a$ – uzorak je crveniji od standarda

$-\Delta b$ – uzorak je plaviji od standarda

$+\Delta b$ – uzorak je žući od standarda



Slika 14. CIE $L^*a^*b^*$ trodimenzionalni sustav boja (prema Petrović i sur., 2013)

3.3. OBRADA REZULTATA

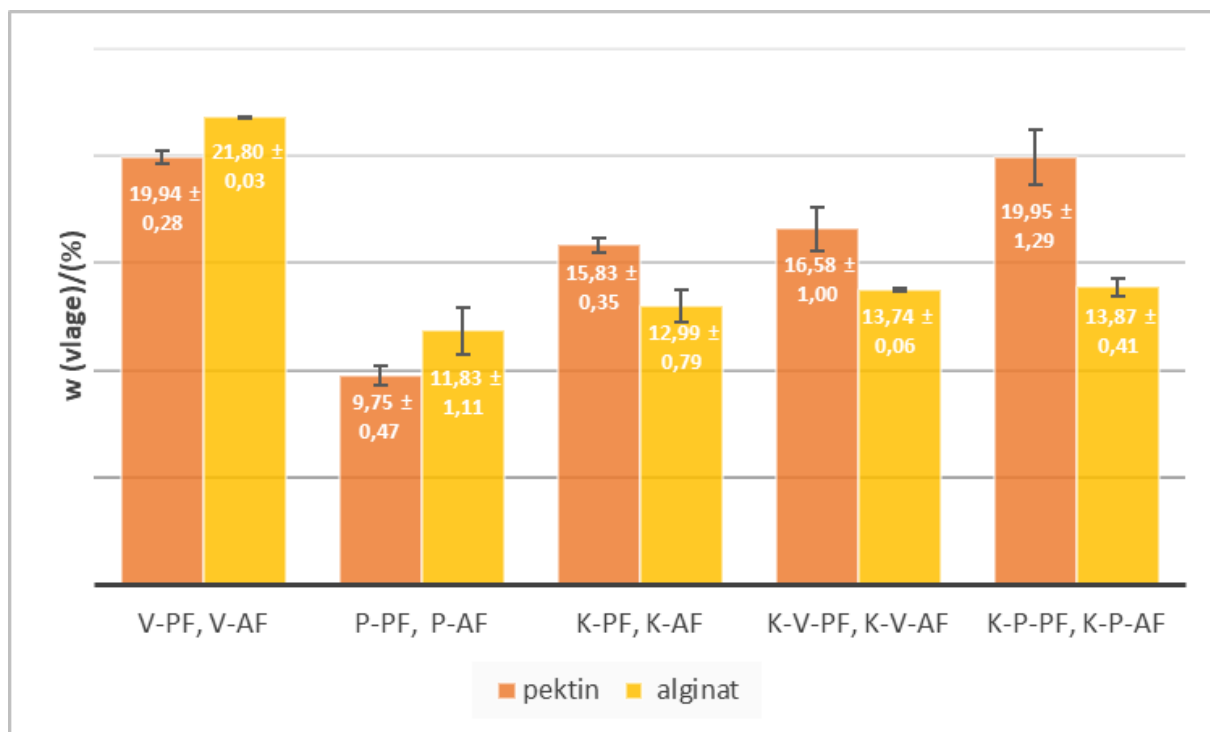
Rezultati provedenog istraživanja su obrađeni u programu Microsoft Excel (2024). Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost dvaju ili triju paralelnih mjerenja ($n=2$ ili $n=3$) \pm standardna devijacija (SD). Rezultati određivanja teksturnih svojstava se obrađuju u programu *Exponent*, u potprogramu *5 Repeat Until Count*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu pripremljeni su jestivi pektinski i alginatni filmovi s dodatkom vodenog i puferkog ekstrakta kore klementine nakon predtretmana enzimima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v), zatim dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine bez predtretmana enzimima te kontrolni filmovi (vodeni i puferki). Kontrolni jestivi (pektinski i alginatni) filmovi s vodom i puferom su pripremljeni radi usporedbe, kako bi se mogao procijeniti utjecaj dodanog vodenog ili puferkog ekstrakta kore klementine na fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih filmova. Jestivi filmovi (pektinski i alginatni) su karakterizirani određivanjem fizikalno-kemijskih svojstava (udio vlage, indeks topljivosti, kapacitet vezanja ulja i vode jestivog filma) gravimetrijskim metodama, a mehaničkih svojstava (tekstura filma) korištenjem analizatora strukture. Nadalje, boja jestivih filmova određena je kolorimetrom, a udio ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu kore klementine i jestivom pektinskom i alginatnom filmu spektrofotometrijski.

4.1. ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE U JESTIVOM FILMU

Rezultati postupka određivanja masenog udjela vlage u jestivom pektinskom i alginatnom filmu su prikazani na slici 15.



Slika 15. Prikaz rezultata masenog udjela vlage u jestivim pektinskim i alginatnim filmovima ($n=2$)

Maseni udio vlage u filmovima kreće se između 9,75 % i 21,80 %. U radu Zioga i sur. (2022) izmjerene su vrijednosti udjela vlage u rasponu 24,74 do 25,54 %, za pektinske filmove koji sadrže anis i diktamo, što su vrijednosti slične dobivenima u ovom radu.

Najveći je udio vlage u kontrolnim filmovima na bazi vode, bez obzira radi li se o filmovima s pektinom ili alginatom, u tom slučaju maseni udio vlage se kreće između 19,94 % i 21,80 %. Kontrolni filmovi (i pektinski i alginatni) pripremljeni u puferu (pH=5) sadrže najmanji udio vlage. Može se zaključiti da smanjenje pH rezultira smanjenjem udjela vlage u kontrolnim filmovima. Alginatni filmovi koji sadrže ekstrakt lista maslina pripremljeni su u radu Moura-Alves i sur. (2023) te se udio vlage u tim filmovima kreće između 15,07 % i 23,69 %, a kontrolni uzorak bez ekstrakta ima veći udio vlage (31,55 %). U korelaciji s time su rezultati u ovome radu, budući da pektinski i alginatni filmovi koji sadrže vodeni ekstrakt kore klementine bez predtretmana enzimima (K-PF i K-AF) i enzimski tretirane kore klementine u vodi (K-V-PF i K-V-AF) sadrže manji udio vlage nego filmovi s vodom bez ekstrakta kore klementine (V-PF i V-AF). To ukazuje da dodatak vodenog ekstrakta kore klementine utječe na smanjenje vezanja vode u filmove, što je moguće zbog prelaska tvari koje otežavaju vezanje vode iz kore klementine u ekstrakt koji se ugrađuje u film. Moura-Alves i sur. (2023) ovu pojavu objašnjavaju činjenicom da dodatak ekstrakta rezultira porastom koncentracije fenolnih spojeva s hidrofobnim karakteristikama u filmu, te njihovim interakcijama s alginatom. Slična pojava je u radu Wang i sur. (2019) gdje udio vlage opada u filmovima na bazi kitozana dodatkom ekstrakta sjemenke crne soje. Pretpostavljeno je da je visok udio vlage posljedica postojanja brojnih hidrofilnih skupina (pretežito -OH i -NH₂) u kitozanu. Dodatkom ekstrakta, hidroksilne skupine iz antocijanina vežu se vodikovim vezama na hidrofilne skupine kitozana i na taj način konkuriraju molekulama vode.

Pektinski i alginatni filmovi s puferkim ekstraktom enzimski predtretirane kore klementine (K-P-PF i K-P-AF) imaju veći udio vlage u odnosu na kontrolne filmove (P-PF i P-AF). Dakle, pri pH=5, dodatak ekstrakta kore klementine ima suprotan učinak na promjenu vezanja vode, to jest dodatak ekstrakta u uvjetima nižeg pH dovodi do povećanja vezanja vode u filmove. Pritom je udio vlage u filmovima s vodenim ekstraktom kore klementine bez enzimskog predtretmana (K-PF i K-AF) i vodenim ekstraktom enzimski tretirane kore klementine (K-V-PF i K-V-AF) vrlo sličan, što navodi na zaključak da tretman enzimima samo blago utječe na povećanje udjela vlage u filmu. Iz toga proizlazi da udio vlage u pripremljenim jestivim filmovima, osim o dodatku ekstrakta, u najvećoj mjeri ovisi o pH vrijednosti medija u kojem se provodi predtretman enzimima. Moguće je da enzimski tretman djeluje na povećanje udjela vlage tako što iz kore klementine oslobađa spojeve koji utječu na gustoću pakiranja polisaharidnih lanaca, te kao takvi oni u svoju strukturu vežu veću količinu vode (Zioga i sur., 2022). Stoga, može se zaključiti da pri izradi pektinskih i alginatnih filmova s ekstraktom kore klementine prednost se daje vodenim

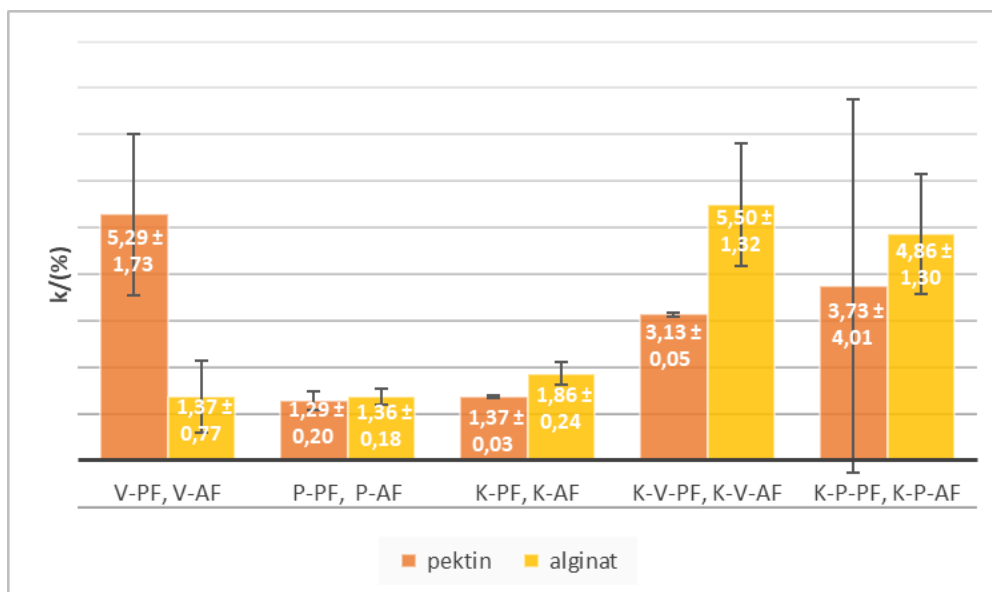
ekstraktima kore klementine bez predtretmana enzimima zbog dobivenih filmova s nižim udjelom vlage.

4.2. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE JESTIVOG FILMA

Provedeno je istraživanje kapaciteta vezanja vode jestivih filmova te je prilikom eksperimenta ustanovljeno da se filmovi nakon 24 sata u vodi potpuno otapaju. Dakle, svi pripremljeni filmovi 100 % su topivi u vodi. Može se zaključiti da nakon 24 sata bubrenja filma u vodi, sile između vode i makromolekula u jestivom filmu nadjačavaju sile u lancima polimera. Velik broj negativno nabijenih karboksilnih skupina pektina i alginata te higroskopska priroda glicerola objašnjavaju dobru topivost jestivih filmova u vodi. U istraživanju Basiak i sur. (2018) jestivi filmovi s manjim udjelom glicerola topivi su u vodi do 30 %, a filmovi s većim udjelom glicerola topivi su do 35 %, što dokazuje utjecaj glicerola na povećanje topivosti u vodi. Veliki kapacitet vezanja vode jestivog filma je nepoželjna karakteristika, a posebice za jestive filmove koji će se koristiti za pakiranje voća i drugih namirnica s velikim udjelom vode. Prema Parreidt i sur. (2018) povećanjem koncentracije korištenog kalcijeva klorida (točnije Ca^{2+} iona koji imaju ulogu u umrežavanju) jačaju međumolekulske veze u polimeru i otežava se prodor otapala u strukturu alginata. U budućim istraživanjima poželjno bi bilo fokusirati se na poboljšavanje karakteristika jestivog filma u kontaktu s vodom, s naglaskom na istraživanje utjecaja koncentracije sredstva za umrežavanje i plastifikatora na topivost jestivog filma.

4.3. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA ULJA JESTIVOG FILMA

Na slici 16 prikazani su rezultati kapaciteta vezanja ulja jestivih pektinskih i alginatnih filmova.



Slika 16. Rezultati kapaciteta vezanja ulja jestivih filmova na bazi pektina i alginata ($n=2$)

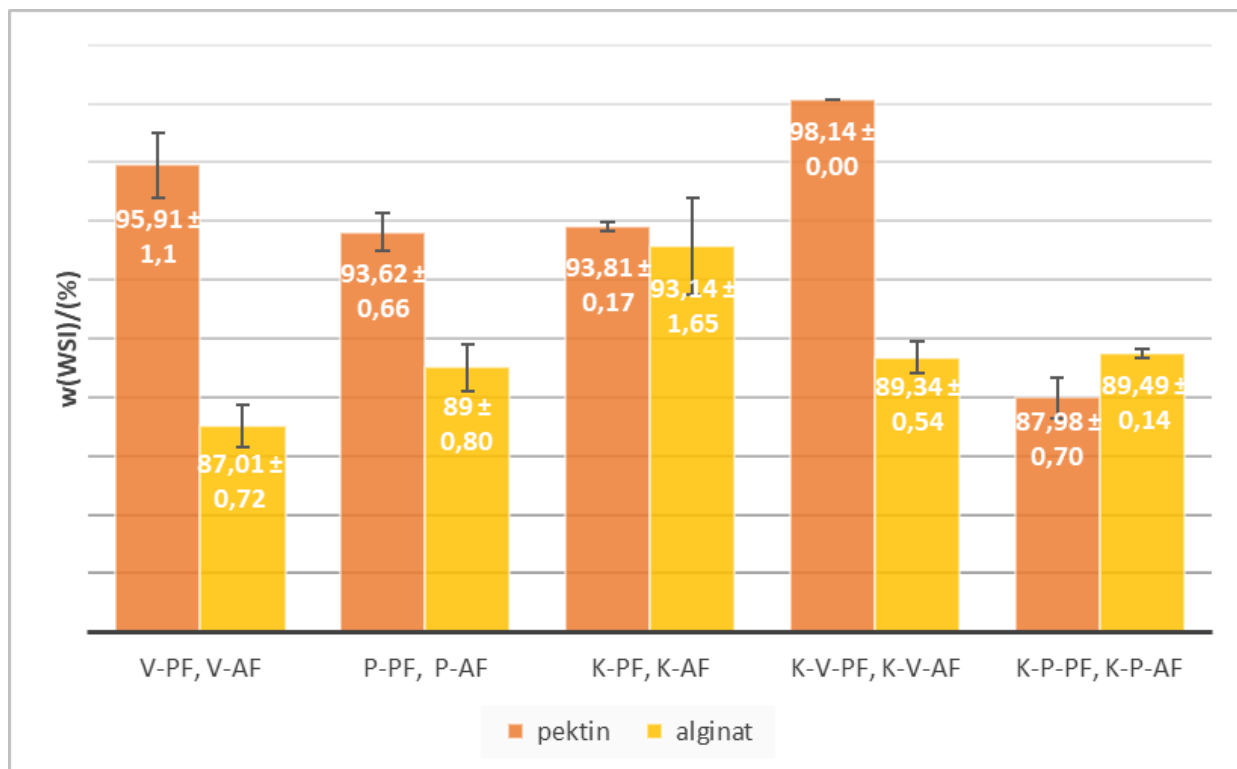
Kapacitet vezanja ulja jestivih filmova kreće se u rasponu od 1,29 do 5,50 %. Rezultati su vrlo slični onima u radu Seixas i sur. (2013), u kojem kapacitet vezanja vode pektinskih i alginatnih filmova ne prelazi 3 %, te u radu Nisar i sur. (2021), gdje ne prelazi vrijednost od 3,37 %. Najnižu vrijednost kapaciteta vezanja ulja pokazuju kontrolni uzorci (jestivi filmovi bez ekstrakta kore klementine) u puferu: 1,29 % pektinski (P-PF) i 1,36 % alginatni (P-AF). Kontrolni uzorak pripremljen s vodom pokazuje veliku razliku u kapacitetu vezanja ulja između pektinskog (V-PF) od 5,29 % i alginatnog filma (V-AF) od 1,37 %, što ukazuje na razliku u utjecaju pektina i alginata na kapacitet vezanja ulja jestivog filma na bazi vode. Dakle, može se zaključiti da je umrežavanje pektina u filmu na bazi vode (V-PF) takvo da omogućuje prodiranje molekula ulja između polimernih molekula pektina u većoj mjeri nego alginat u filmu na bazi vode (V-AF). U pripremi jestivog pektinskog filma dodatkom vodenog i puferskog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima dovodi do porasta kapaciteta vezanja ulja filma od 3,13 % (K-V-PF) i 3,73 % (K-P-PF) u odnosu na film pripremljen s vodenim ekstraktom kore klementine bez enzimskog predtretmana. Jestivi alginatni film pripremljen dodatkom vodenog i puferskog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima dovodi do dodatnog porasta kapaciteta vezanja ulja filma od 5,50 % (K-V-AF) i 4,86 % (K-P-AF) u odnosu na film pripremljen dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine. U istraživanju Gotal (2024), pektinski filmovi s ekstraktom kore mandarine tretirane u vodi i puferu imaju manji kapacitet vezanja ulja od kontrolnih uzoraka, što su povoljniji rezultati, te ukazuju na prednost korištenja ekstrakta kore mandarine u pripravi jestivih filmova.

Dodatak vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine u film (K-PF) značajno smanjuje kapacitet vezanja ulja pektinskog filma (1,37 %). Dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine u alginatni film (K-AF) rezultira tek manjim porastom kapaciteta vezanja ulja (1,86 %). Očito je da pektin i alginat zbog razlike u svojstvima i načinu umrežavanja različito utječu na promjenu sposobnosti filmova da upijaju ulje. Ipak, kapacitet vezanja ulja pripremljenih jestivih pektinskih i alginatnih filmova dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine je niži od kapaciteta vezanja ulja pripremljenih filmova dodatkom vodenog ili puferskog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima što mu daje prednost u daljnjoj primjeni.

Dakle, možemo zaključiti da za pripremu pektinskih i alginatnih jestivih filmova s ekstraktom kore klementine daje se prednost korištenju vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine jer dobiveni filmovi imaju najmanji kapacitet vezanja ulja što je poželjno za filmove koji će se koristiti za pakiranje prehrambenih proizvoda koji sadrže ulje. Također, iz dobivenih rezultata se može zaključiti da pektinski filmovi imaju manji kapacitet vezanja ulja u odnosu na alginatne filmove što im daje prednost u odabiru polisaharida za pripremu filma.

4.4. REZULTATI INDEKSA TOPLJIVOSTI (WSI) JESTIVOG FILMA

Na slici 17 prikazani su rezultati indeksa topljivosti jestivih pektinskih i alginatnih filmova.



Slika 17. Prikaz rezultata indeksa topljivosti jestivih pektinskih filmova ($n=2$)

Indeks topljivosti (WSI) pektinskih filmova kreće se u rasponu od 87,98 do 98,14 %. Pektinski film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima (K-V-PF) ima najveći indeks topljivosti (98,14 %). Pektinski film na bazi puferskog ekstrakta kore klementine enzimski predtretirane (K-P-PF) ima najmanji indeks topljivosti (87,98 %) od svih pektinskih filmova. Ovako velika razlika vrijednosti WSI ukazuje da pH vrijednost pri kojoj se provodi enzimski tretman kore klementine ima utjecaj na indeks topljivosti pektinskih filmova. Indeks topljivosti pektinskih filmova s dodatkom ekstrakta enzimski tretirane i enzimski netretirane kore mandarine u radu Gotal (2024), kreće se u rasponu od 99,59 % do 99,92 %, dakle u rasponu viših vrijednosti nego li su to vrijednosti u ovom radu. S obzirom na sličnost koncentracija korištenih kemikalija i postupka pripreme, razliku u vrijednostima indeksa topljivosti može se pripisati različitim sastavima ekstrakta kora klementine i mandarine i njihovim utjecajima na indeks topljivosti filmova. Prema Jovanović i sur. (2021) WSI praha dobivenog inkapsulacijom korijena vrbe 7,5 %-tnim pektinom iznosi 71,15 %, što su niže vrijednosti od dobivenih u ovom radu. Slično, vrlo niske vrijednosti indeksa topljivosti u odnosu na dobivene rezultate su u radu Meng i sur. (2017) koji su odredili WSI polisaharida u prahu biljke *Dendrobium officinale* u

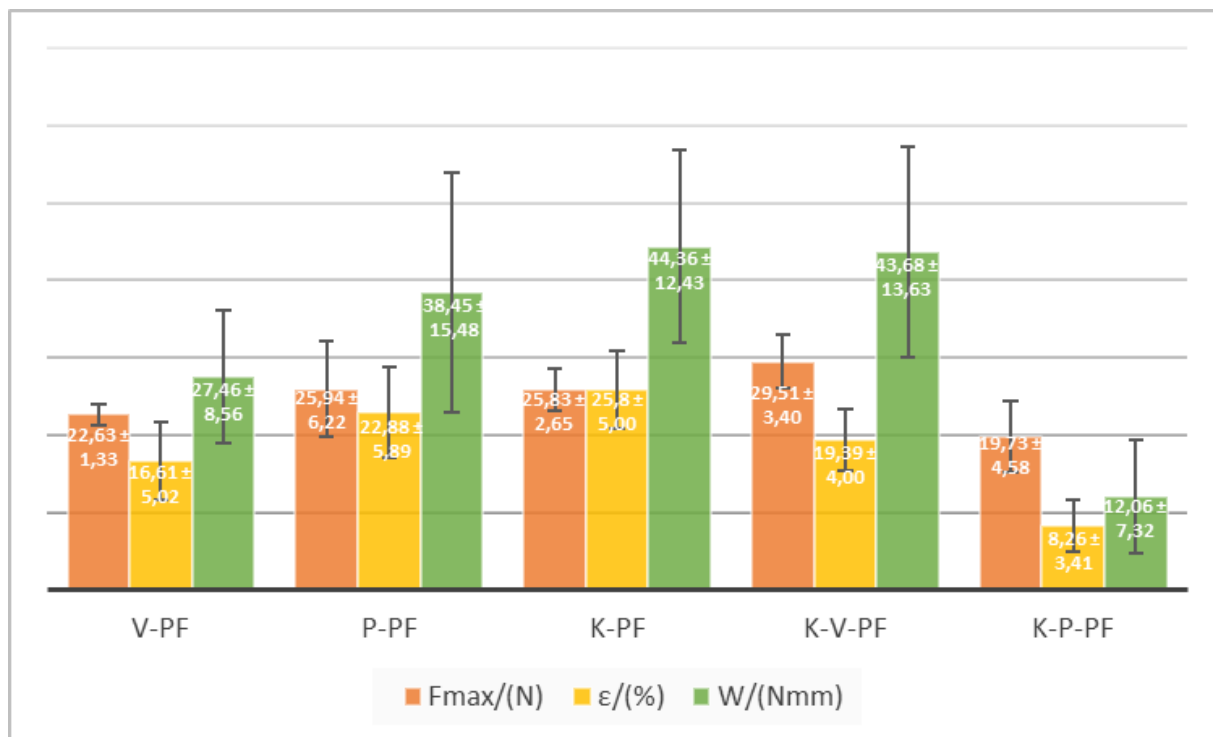
vrijednosti od samo 21 do 39 %. Prema tom istraživanju, WSI ovisi o veličini čestice praha, pa se isto tako može zaključiti da WSI polisaharida filma također ovisi o samom obliku u kojem se nalazi određeni polisaharid. Stoga je teško uspoređivati indeks topljivosti polisaharida u prahu i jestivom filmu.

Vrijednosti indeksa topljivosti alginatnih filmova kreću se u rasponu od 87,01 do 93,14 %. Indeksi topljivosti kontrolnog filma u puferu (P-AF) i filmova s ekstraktima enzimski predtretirane kore klementine u vodi i u puferu (K-V-AF i K-P-AF) su vrlo slične, te se kreću oko 89 %. Iznimke su kontrolni uzorak na bazi vode (V-AF), koji ima najmanji indeks topljivosti (87,01 %) te film koji sadrži vodeni ekstrakt kore klementine bez enzimskog predtretmana (K-AF) s najvišim WSI u iznosu od 93,14 %. Općenito se može uočiti da alginatni filmovi imaju manji WSI od pektinskih filmova. Vrijednosti indeksa topljivosti alginatnih filmova su vrlo slične vrijednostima indeksa topljivosti polisaharida ekstrahiranih iz mungo graha u radu Song i sur. (2019), koja iznosi 88,80 %.

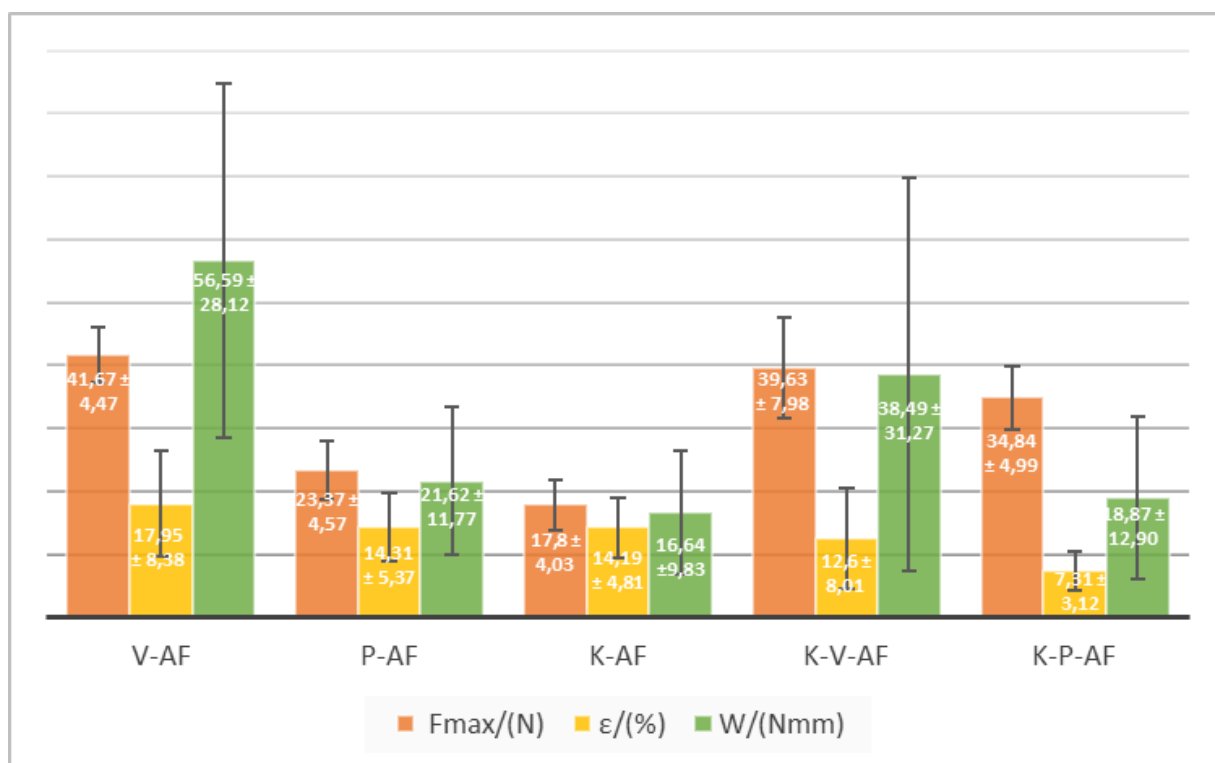
Obzirom na nedostatak informacija o indeksu topljivosti jestivih filmova u vodi u već objavljenim radovima, teško je usporediti dobivene vrijednosti. Međutim, radi se o važnom parametru za karakterizaciju filmova jer opisuje količinu tvari iz filma koje su topive u vodi, te bi prolaskom vode, ili čak vodene pare kroz film mogle migrirati iz jestivog filma te na taj način narušiti početni sastav filma, pa time i strukturu i postojeća svojstva danog filma. Stoga, možemo zaključiti da u pripremi jestivih filmova s ekstraktom kore klementine, najbolji izbor za pripremu pektinskog i alginatnog filma će biti puferski ekstrakt kore klementine prethodno tretirane enzimima jer ima najmanji WSI (87,98 % za K-P-PF) i (89,49 % za K-P-AF).

4.5. ODREĐIVANJE TEKSTURE JESTIVOG FILMA

Provedena je analiza teksture uzoraka jestivih pektinskih i alginatnih filmova te su dobiveni dijagrami ovisnosti maksimalne upotrijebljene sile F_{max} (čvrstoća uzorka) o vremenu (t) potrebnom za pucanje uzorka. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunate su deformacija (ϵ) i rad (W), a rezultati su prikazani na slikama 18 i 19. Prekidna sila jest maksimalna sila koju film može podnijeti prije pucanja. Postotna deformacija je mjera rastezljivosti uzorka, a što je utrošeni rad veći, to je film čvršći. Rad je definiran površinom ispod krivulje, odnosno jednak je umnošku sile potrebne za pucanje uzorka i prijeđenog puta čeljusti do trenutka pucanja.



Slika 18. Rezultati teksturnih svojstava jestivih pektinskih filmova ($n=3$)



Slika 19. Rezultati teksturnih svojstava jestivih alginatnih filmova ($n=3$)

Prekidna sila koja uzrokuje pucanje filmova s jabučnim pektinom se kreće između 19,73 i 29,51 N. Najmanja sila koja uzrokuje pucanje filma se odnosi na film na bazi puferskog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima (K-P-PF). Najveća je sila potrebna za pucanje filma na bazi vodenog ekstrakta kore klementine predtretirane enzimima (K-V-PF). Ostali filmovi pucaju pri sličnim silama.

Postotna deformacija se odnosi na produljenje filma u odnosu na njegovu početnu duljinu u trenutku neposredno prije pucanja filma. Kod pektinskih filmova postotna deformacija se kreće između 8,26 i 25,80 %, a utrošeni rad u rasponu od 12,06 do 44,36 Nmm. U slučaju pektinskih filmova s ekstraktom otpada kave u istraživanju Vujnović (2019) vrijednosti postotne deformacije se kreću u rasponu od 0,66 do 2,65 %, što su vrijednosti mnogo niže od dobivenih u ovom radu, pa se ta razlika s obzirom na sličnost korištenih koncentracija glicerola i kalcijeva klorida može pripisati različitom sastavu ekstrakta kave i ekstrakta kore klementine na različita svojstva filmova. Obzirom na rezultate možemo zaključiti da najbolja teksturna svojstva ima uzorak jestivog pektinskog filma pripremljen dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima u vodi (K-V-PF) jer uslijed najveće vrijednosti prekidne sile (29,51 N) i najvećeg utrošenog rada potrebnog za pucanje filma (43,68 Nmm) pokazuje najbolju čvrstoću od svih pektinskih filmova.

Prekidne sile jestivih filmova s alginatom se kreću između 17,80 i 41,67 N. Pritom je vidljivo da su najviše prekidne sile potrebne za pucanje filma na bazi vode (V-AF) te filmova koji sadrže ekstrakte enzimi predtretirane kore klementine (K-V-AF, K-P-AF). Postotna deformacija alginatnih filmova iznosi od 7,31 do 17,95 %, što su male razlike u usporedbi s promjenom drugih parametara. Vrijednosti postotne deformacije filmova su u korelaciji s vrijednostima postotne deformacije pektinskih i alginatnih filmova koje su odredili Galus i Lenart (2012), a koje su u rasponu od 5,90 do 14,90 %. Rad utrošen na pucanje alginatnih filmova je u rasponu 16,64 do 56,59 Nmm. Najveća vrijednosti utrošenog rada (56,69 Nmm) je potrebna za pucanje filma na bazi vode (V-AF), a također se ističe alginatni film s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima (K-V-AF), s također vrlo visokom vrijednošću utrošenog rada (38,49 Nmm). Prekidna sila kontrolnog uzorka alginatnog filma na bazi vode je najveća (41,67 N), dok u alginatnom filmu pripremljenom dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima je sila nešto manja (36,93 N). Stoga, važno je napomenuti da kontrolni alginatni jestivi film ima veću čvrstoću od alginatnih filmova pripremljenih dodatkom ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima u vodi ili puferu. Može se zaključiti da najbolja teksturna svojstva od pripremljenih jestivih alginatnih filmova dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine ima film pripremljen dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima (K-V-AF), s maksimalnom vrijednošću prekidne sile od 39,63 N i utrošenog rada od 38,49 Nmm.

Tekstura priređenih jestivih filmova vrlo je raznolika. Također je moguće primijetiti da vrijednosti prekidne sile i utrošenog rada ovisno o ispitanom filmu jednako reagiraju, to jest za većinu uzoraka vrijedi da ako je veća prekidna sila, veći je i utrošeni rad što znači da je priređeni film čvršći i boljih teksturnih svojstava.

Pregledom dostupne literature, na povećanje fleksibilnosti i smanjenje čvrstoće filma utječe povećanje udjela glicerola, sorbitola i polietilen glikola u filmu (Jiang i sur., 2023; Wittaya, 2013) Hidrofilni plastifikatori male molekulske mase lako ulaze unutar strukture polimera i tvore vodikove veze s reaktivnim skupinama u lancima polimera što rezultira povećanjem interakcija između plastifikatora i polimera, pritom smanjujući intermolekulske sile duž polimernog lanca, pa posljedično raste prazan volumen između lanaca polimera. Ova pojava može se smanjiti povećanjem koncentracije kalcijevih iona, što dovodi do umrežavanja zbog veza između kalcijevih iona i karboksilnih skupina alginata ili pektina (Seixas i sur, 2013).

Možemo zaključiti da pripremljeni alginatni film dodatkom vode ili pufera (kontrolni uzorak) ima najbolja teksturna svojstva s najvećom prekidnom silom (41,67 N) i najvećim utrošenim radom potrebnim za pucanje filma (56,59 Nmm). Dodatkom ekstrakta kore klementine (vodenog ili puferskog) ne dolazi do poboljšanja teksturnih svojstava pripremljenog filma. Kod pripreme pektinskih filmova, rezultati teksturnih svojstava se razlikuju i dodatkom vodenog ili puferskog ekstrakta kore klementine potrebna je veća prekidna sila i utrošeni rad potreban za pucanje filma. Ipak, kod pripreme jestivih pektinskih i alginatnih filmova pripremljenih dodatkom ekstrakta kore klementine, najbolji izbor je dodatak vodenog ekstrakta klementine prethodno tretirane enzimima jer tako pripremljeni filmovi pokazuju dobra teksturna svojstva.

4.6 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

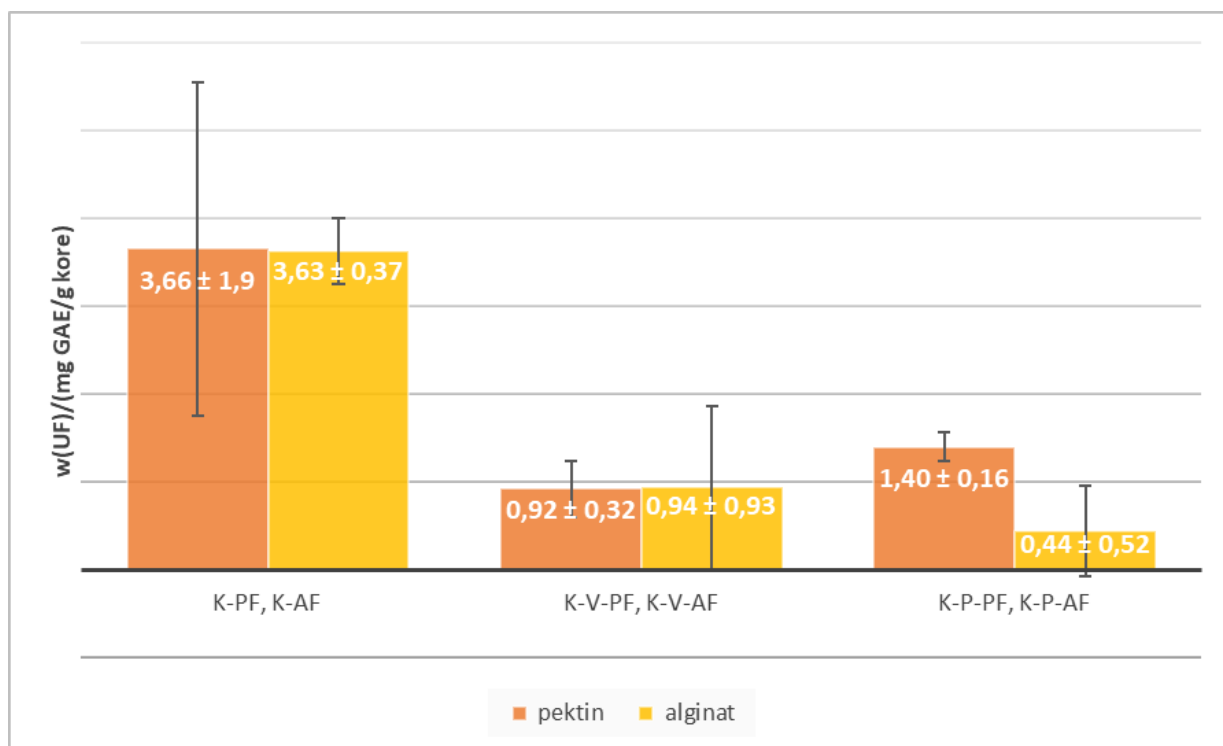
U tablici 5 su prikazane vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola u ekstraktima kore klementine, a na slici 20 maseni udjeli ukupnih fenola u jestivim filmovima na bazi jabučnog pektina i alginata.

Tablica 5. Rezultati masenih udjela ukupnih fenola izraženih kao ekvivalent galne kiseline (UF \pm SD) u vodenim ekstraktima kore klementine ($n=2$)

Vodeni ekstrakt	UF/(mg GAE/g kore) \pm SD
Vodeni ekstrakt kore klementine	3,03 \pm 0,09
Vodeni ekstrakt kore klementine predtretirane enzimima	2,88 \pm 0,19
Puferski ekstrakt kore klementine predtretirane enzimima	2,95 \pm 0,02

Iz prikazanih rezultata u tablici 5 vidljivo je da najmanji maseni udio ukupnih fenola u vodenom

ekstraktu kore klementine predtretirane enzimima u vodi iznosi 2,88 mg GAE/g kore klementine, a najveći u vodenom ekstraktu enzimski netretirane kore klementine u kojem iznosi 3,03 mg GAE/g kore klementine. Budući da je najveći maseni udio fenola u vodenom ekstraktu enzimski netretirane kore klementine, može se zaključiti da uslijed enzimskog tretmana dolazi do pada masenog udjela ukupnih fenola u ekstraktima kore klementine. Pregledom literature, u provedenom istraživanju Dzięcioł (2022) je uslijed enzimskog predtretmana utvrđeno povećanje udjela fenolnih spojeva do 35 % u eteričnom ulju ružmarina te autori smatraju da je dio fenolnih spojeva prešao iz vodenog ekstrakta u eterično ulje nakon provedenog predtretmana enzimima. U ekstraktima kore mandarine su određeni maseni udjeli fenola u rasponu između 3,64 i 5,45 mg GAE/g kore mandarine (Gotal, 2024). U spomenutom radu tretman kore mandarine u vodi također smanjuje maseni udio ukupnih fenola, no tretman kore u puferu dovodi do porasta masenog udjela ukupnih fenola u vodenom ekstraktu kore mandarine. S obzirom da enzimi uspješnije razgrađuju staničnu stijenku biljke i time olakšavaju ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore klementine u otopinu, nisu zabilježene značajno veće vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola u vodenom i puferskom ekstraktu kore klementine. U ovom istraživanju je korištena mješavina enzima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v), a u daljnjim istraživanjima na povećanje prinosa ukupnih fenola iz kore klementine trebao bi se ispitati utjecaj drugačijih udjela enzima ili primjenu pojedinačnih enzima.



Slika 20. Rezultati masenih udjela ukupnih fenola u pektinskim i alginatnim filmovima ($n=2$)

Rezultati masenih udjela ukupnih fenola u jestivim pektinskim filmovima kreću se u rasponu od 0,92 do 3,66 mg GAE/g filma, a za filmove na bazi alginata u rasponu od 0,44 do 3,63 mg GAE/g filma. U radu Pamuković (2017) uspoređeni su filmovi na bazi proteina sirutke, alginatni, pektinski i kitozanski filmovi s ekstraktom ružmarina, te je od njih najveći udio fenola imao pektinski film, s približno 25 mg GAE/g filma. Ta je vrijednost mnogo veća od vrijednosti u ovom radu, dok je najniža vrijednost od približno 7 mg GAE/g filma za kitozanski film sličnija dobivenim vrijednostima. Međutim, s obzirom na vrijednosti dobivenih masenih udjela ukupnih fenola u početnim ekstraktima kore klementine koji su iznosili od 2,88 do 3,03 mg GAE/g kore, ne mogu se ni očekivati veće vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva.

Usporedimo li pripremljene pektinske i alginatne filmove, maseni udio ukupnih fenola kod obje vrste filmova je približno jednak (3,66 i 3,63 mg GAE/g filma) i to za filmove pripremljene dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine. To je u skladu sa činjenicom da je u vodenim ekstraktima enzimski netretirane kore klementine također najveći maseni udio ukupnih fenola (3,03 g GAE/g kore), pa se može zaključiti da je uspješna ugradnja fenola u filmove, neovisno o tome radi li se o pektinskom ili alginatnom filmu.

S druge strane, pektinski i alginatni filmovi koji sadrže vodene ekstrakte kore klementine tretirane enzimima sadrže čak 2 do 8 puta manji maseni udio ukupnih fenola u odnosu na filmove s vodenim ekstraktom netretirane kore klementine. To je djelomično posljedica nižeg masenog udjela ukupnih fenola u vodenim i puferskim ekstraktima enzimski tretirane kore klementine.

Maseni udio ukupnih fenola u vodenim i puferskim ekstraktima enzimski tretirane kore klementine (2,88 i 2,95 mg GAE/g kore) je nekoliko puta veći nego u pektinskim filmovima pripremljenim s vodenim i puferskim ekstraktima kore klementine prethodno tretirane enzimima (0,92 i 1,40 mg GAE/g filma) te alginatnim filmovima pripremljenim na isti način (0,94 i 0,44 mg GAE/g filma). Dakle, enzimski tretman utječe i na smanjenje sposobnosti ugradnje fenola u filmove. Moguće je da pH vrijednost ima utjecaj pri ugradnji fenola u filmove, a točan utjecaj ovisi o kemijskim svojstvima korištenih biopolimernih materijala, u ovom slučaju alginata i pektina. Uslijed predtretmana mješavinom enzima (pektinaza:celulaza:ksilanaza=1:1:1, w/v), maseni udjeli ukupnih fenola se smanjuju te pripremljeni jestivi filmovi sadrže manje udjele ukupnih fenola. Stoga, možemo zaključiti da pripremljeni pektinski i alginatni jestivi filmovi dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine prethodno netretirane enzimima imaju najveće masene udjele ukupnih fenola i kao takvi imaju potencijal primjene u daljnjoj pripremi jestivih filmova na bazi pektina i alginata.

4.7. ODREĐIVANJE BOJE JESTIVOG FILMA

Parametri boje pripremljenih jestivih pektinskih i alginatnih filmova određeni su mjerenjem vrijednosti L , a i b te je izračunata ukupna promjena boje ΔE uspoređujući ju sa kontrolnim jestivim pektinskim i alginatnim filmovima bez dodatka ekstrakta kore klementine. Rezultati mjerenja i izračunate ukupne promjene boje ΔE su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati kolorimetrijskih razlika (ΔE) filmova na bazi jabučnog pektina i alginata s dodatkom ekstrakata kore klementine u odnosu na kontrolni film (bez dodatka ekstrakta kore klementine) ($n=2$)

Vrsta filma	L^*	a^*	b^*	ΔL	Δa	Δb	ΔE
V-PF	95,09	-0,35	7,14	-	-	-	-
P-PF	93,49	-0,47	11,81	-	-	-	-
K-PF	87,64	-1,48	29,71	-7,45	-1,13	22,57	23,79
K-V-PF	88,87	-0,60	13,82	-6,31	-0,25	6,68	9,19
K-P-PF	91,76	0,33	20,03	-1,73	0,80	8,22	8,44
V-AF	95,23	-0,34	4,80	-	-	-	-
P-AF	96,12	-0,52	3,95	-	-	-	-
K-AF	92,02	-2,34	18,13	-3,21	-2,00	13,33	13,86
K-V-AF	92,50	-2,01	14,82	-2,73	-1,67	10,02	10,51
K-P-AF	94,66	-1,31	9,60	-1,46	-0,79	5,65	5,89

Rezultati pokazuju da se L vrijednosti svih pektinskih i alginatnih filmova s dodatkom ekstrakta kore klementine kreću u rasponu od 87,64 do 94,66 i opadaju u odnosu na kontrolne uzorke (95,09 i 96,12), dok b vrijednosti rastu (s 3,95 na 29,71). Dakle, dodatak vodenog ili puferskog ekstrakta kore klementine općenito čini filmove tamnijima i žućima od kontrolnih uzoraka. Jiang i sur. (2023) također su pripremili žućkaste pektinske filmove koji sadrže ekstrakte kore limuna, pomela i pitaje, a u kojima su vrijednosti b parametra u rasponu od 9,23 do 11,24. Pektinski filmovi s ekstraktima ostataka kave također su tamniji u odnosu na referentne filmove, točnije dolazi do pada vrijednosti parametra L s 32,83 u kontrolnom filmu na vrijednosti do 29,56 za filmove s ekstraktima ostataka kave (Vujnović, 2019).

Pektinski film koji sadrži vodeni ekstrakt enzimski netretirane kore klementine (K-PF) i pektinski film koji sadrži vodeni ekstrakt kore klementine tretirane enzimima (K-V-PF) su zeleniji od kontrolnog jestivog pektinskog filma na bazi vode (V-PF). Parametar a za pektinski film (P-PF) raste dodatkom puferskog ekstrakta enzimski predtretirane kore klementine (K-P-PF) (a parametar iznosi -0,47 i 0,33), a pritom vrijednost parametra a prelazi iz područja negativne vrijednosti u područje pozitivne vrijednosti što ukazuje da pektinski film s dodatkom puferskog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima (K-P-PF) dobiva blago crvenu nijansu, za razliku od filma bez dodatka puferskog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima kod kojeg

prevladavaju zeleni tonovi. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju Jiang i sur. (2023) u kojem vrijednosti također ukazuju da jestivi filmovi imaju pretežito zelenkaste tonove kada je korišten pektin iz kore pomela i kore limuna (a parametar iznosi -0,90 i -1,30), odnosno da prevladavaju crvenkasti tonovi kada je korišten pektin kore bijele pitaje (a parametar iznosi 2,63).

Svi alginatni filmovi pokazuju jednak trend promjene nijansi u rasponu zeleno-crvenih tonova dodatkom vodenih ekstrakata kore klementine: dodatak vodenih ekstrakata kore klementine rezultira smanjenjem a parametra u odnosu na kontrolne filmove što znači da već zelenkasti filmovi postaju još zeleniji (a parametar se kreće od -0,34 do -2,34).

Svi alginatni filmovi imaju niže vrijednosti a parametra od pektinskih filmova. Dakle, u alginatnim filmovima prevladavaju zeleni tonovi nad crvenim tonovima i to u većoj mjeri nego što je to u pektinskim filmovima. Galus i Lenart (2013) su pripremili pektinske i alginatne filmove kod kojih je vrijednost parametra a u alginatnim filmovima (0,40) niža nego u pektinskim (0,69) što također ukazuje da pektinski filmovi imaju više crvenih tonova u odnosu na alginatne, odnosno da je dodatak alginata povezan s pomakom parametra a prema negativnim vrijednostima. Parametar L je za pektinske filmove manji nego za alginatne, što ukazuje da su alginatni filmovi svjetliji od pektinskih. U skladu s time, treba spomenuti rezultate istraživanja (Galus i Lenart, 2013) u kojem je primijećeno da veći udio pektina u smjesi pektina i alginata daje tamnije filmove.

Promjena boje pektinskih i alginatnih filmova je najintenzivnija u filmovima u koje je dodan vodeni ekstrakt enzimski netretirane kore klementine (K-PF i K-AF), a kolorimetrijske razlike iznose 23,79 i 13,86. Utjecaj na promjenu boje je najizraženiji u povećanju b vrijednosti (Δb u iznosu od 22,57 i 13,33). U odnosu na kontrolne filmove, razlika u boji je vidljiva golim okom u svim alginatnim i pektinskim filmovima s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine.

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak vodenog ili puferskog ekstrakta kore klementine u sastav jestivog filma utječe na promjenu fizikalno-kemijskih i mehaničkih svojstava filma.
2. Jestivi pektinski filmovi imaju veći udio vlage od alginatnih filmova. Najmanji maseni udio vlage imaju jestivi pektinski film (15,83 %) i alginatni film (12,99 %) pripremljeni dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine, izuzev kontrolnih filmova pripremljenih limunskim puferom (9,75 i 11,83 %).
3. Svi pripremljeni pektinski i alginatni filmovi su potpuno topljivi u vodi.
4. Jestivi pektinski filmovi imaju manji kapacitet vezanja ulja od alginatnih filmova. Najmanji kapacitet vezanja ulja imaju pektinski film (1,37 %) i alginatni film (1,86 %) pripremljeni dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine.
5. Indeks topljivosti (WSI) alginatnih filmova u vodi (do 93,14 %) je manji od indeksa topljivosti pektinskih filmova u vodi (do 98,14 %). Najmanji WSI imaju pektinski film (87,98 %) i alginatni film (89,49 %) pripremljeni dodatkom puferskog ekstrakta kore klementine prethodno tretirane enzimima.
6. Jestivi pektinski filmovi pripremljeni dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima pokazuju bolja teksturna svojstva ($F=29,51$ N, $W=43,68$ Nmm) u odnosu na kontrolne uzorke ($F=22,63$ N, $W=27,46$ Nmm). Kod alginatnih filmova, najbolja teksturna svojstva pokazuju kontrolni filmovi (pripremljeni dodatkom vode ili pufera) ($F=41,67$ N, $W=56,59$ Nmm), dok od film pripremljen dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine tretirane enzimima pokazuje bolja teksturna svojstva ($F=39,63$ N, $W=38,49$ Nmm) od filmova pripremljenih dodatkom drugih ekstrakta kore klementine.
7. Pripremljeni pektinski i alginatni jestivi filmovi s dodatkom vodenog ekstrakta kore klementine prethodno netretirane enzimima imaju najveće masene udjele ukupnih fenola (3,66 i 3,63 mg GAE/g filma) i kao takvi imaju potencijal primjene u daljnjoj pripremi jestivih filmova na bazi pektina i alginata.
8. Promjena boje je najintenzivnija u pektinskom i alginatnom filmu s dodatkom vodenog ekstrakta enzimski netretirane kore klementine, s kolorimetrijskom razlikom koja iznosi 23,79 za pektinski film, a 13,86 za alginatni film.

6. LITERATURA

Acevedo CA, Orellana N, Avarias K, Ortiz R, Benavente D, Prieto P (2018) Micropatterning technology to design an edible film for in vitro meat production. *Food Bioproc Tech* **11**, 1-7, 1267-1273. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2095-4>

Aladić K, Jarni K, Barbir T, Vidović S, Vladić J, Bilić M, Jokić S (2015) Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind Crop Prod* **76**, 472-478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.016>

Anonymus 1, Slika klementine, <https://univela-morocco.com/products/citrus/clementine/>

Anonymus 2, Slika osnovne strukture fenola, <https://ehs.ucsc.edu/lab-safety-manual/specialty-chemicals/phenol.html>

AOAC International (1999) Official Methods of Analysis of AOAC International, Method 930.15, 16. izd., The Association, Gaithersburg, MD

Barboni T, Paolini J, Tomi P, Luro F, Musselli A, Costa J (2011) Characterization and Comparison of Volatile Constituents of Juice and Peel from Clementine, Mandarin and their Hybrids. *Nat Prod Commun* **6**, 10, 1495-1498.

Basiak E, Lenart A, Debeaufort F (2018) How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers* **10**, 412. DOI: 10.3390/polym10040412

Boninsegna MA, De Bruno A, Piscopo A (2023) Quality Evaluation of Ready-to-Eat Coated Clementine (Citrus x Clementina) Fruits. *Coatings* **13**, 9, 1562. <https://doi.org/10.3390/coatings13091562>

Brnčić M, Ježek D, Rimac Brnčić S, Bosiljkov T, Tripalo B (2008) Utjecaj dodatka koncentrata proteina sirutke na teksturalna svojstva izravno ekspaniranog kukuruznog ekstrudata. *Mljekarstvo* **58**, 2, 131-149. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/23050> (Datum pristupa: 16.11.2024.)

Cloete L, Picot-Allain C, Ramasawmy B, Neetoo H, Ramful-Baboolall D, Naushad Emmambux M (2022) Drivers and Barriers for Commercial Uptake of Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables Industry – A Review. *Food rev Int*, <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2012795>

Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity Homogeneity and structure affect water

vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**, 2, 183-190.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb01370.x>

Durmus N, Gulsunoglu-Konuskan Z, Kilic-Akyilmaz M (2024) Recovery, Bioactivity, and Utilization of Bioactive Phenolic Compounds in Citrus Peel. *Food Sci Nutr* **12**, 12, 9974-9997.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.4570>

Dzięcioł M (2022) Influence of enzymatic pretreatment on yield and chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Pol J Chem Tech* **24**, 4, 61-66. DOI: 10.2478/pjct-2022-0029

Erasto P, Viljoen AM (2008) Limonene – a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Nat Prod Commun* **3**, 7, 1193-1202.
<https://doi.org/10.1177/1934578X0800300728>

FDA (2020) CFR Title 21: Food and Drugs, CFR Part 184: Direct Food substances Generally Recognised as Safe; Silver Spring: MD. FDA-Food and Drug Administration, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm>. Pristupljeno 16 studeni 2024.

Galić K (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 1-2, 23-31. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/49941> (Datum pristupa: 16.11.2024.)

Galus S, Arik Kibar E, Gniewosz M, Krasniewska K (2020) Novel Materials in the Preparation of Edible Films and Coatings – A Review. *Coatings* **10**, 7, 674.
<https://doi.org/10.3390/coatings10070674>

Galus S, Lenart A (2012) Development and characterization of composite edible biofilms based on sodium alginate and pectin. *J food eng* **115**, 4, 459 – 465.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006>

Gomez-Mejia E, Rosales-Conrado N, Leon-Gonzalez ME, Madrid Y (2019) Citrus peel waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chem* **295**, 289-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.136>

Gotal N (2024) Priprema i karakterizacija jestivog pektinskog filma s ekstraktom kore mandarine. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:531591>

Han JH (2014) Edible Films and Coatings: A Review. U: Han JH (ured.) Food science and technology, Innovations in Food Packaging, 2. izd., Academic Press, Cambridge, str. 213-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>

Hong SI, Han JH, Krochta JM (2004) Optical and surface properties of whey protein isolate coatings on plastic films as influenced by substrate, protein concentration and plasticizer type. *J Appl Polym Sci* **92**, 1, 335-343

Jiang H, Zhang W, Rizwan Khan M, Ahmad N, Rhim JW, Jiang W i sur. (2023) Film Properties of Pectin Obtained From Various Fruits' (Lemon, Pomelo, Pitaya) Peels. *J Compos Sci* **7**, 9, 366. <https://doi.org/10.3390/jcs7090366>

Jovanović M, Čujić-Nikolić N, Drnić Z, Janković T, Marković S, Šavikin K (2021) Dissolving and water absorption ability of spray-dried willow gentian extract. U: Stojičić A (ured.) Tehnika - Novi Materijali, Institute of Technical Sciences of SASA, Beograd, str. 86.

Kurek M, Gabrić D, Ščetar M, Galić K (2022) Primjena jestivih filmova i prevlaka s eteričnim uljima na trajnost mesnih i ribljih proizvoda. *MESO* **24**, 1, 63-73. <https://doi.org/10.31727/m.24.1.3>

Leporini M, Loizzo MR, Sicari V, Pellicano TM, Reitano A, Dugay A, Deguin B, Tundis R (2020) Citrus x Clementina Hort. Juice Enrichedd with Its By-products (Peels and Leaves): Chemical Composition, In Vitro Bioactivity, and Impact of Processing. *Antiox* **9**, 4, 298. <https://doi.org/10.3390/antiox9040298>

Liu Z (2005) Edible films and coatings from starches. U: Han J (ured.) Innovations in food packaging, Elsevier Science and Technology Books, London, str. 318-332.

Lopez-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Silva-Beltran NP, De Jesus Ornelas-Paz, Zamudio-Flores PB, Burruel-Ibarra SE (2013) Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties pf Chitosan Films Incorporated with Carvacrol. *Molecules* **18**, 11, 13725-13753. <https://doi.org/10.3390/molecules181113735>

Lourdes Reis Giada M, de (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. U: Moralez-Gonzalez JA (ured.) Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A Role for Antioxidants, Intech, Publisher, London str. 87-106. <https://dx.doi.org/10.5772/51687>

Ljubas S (2021) Profil hlapljivih spojeva kore mandarine sorte Zorica. Završni rad, Sveučilište

u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet. Preuzeto s: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:013432>

Maslov Bandić L, Mrkonjić Fuka M, Tanuwidjaja I, Jurić S (2024) Jestivi omotači - održivi tretman poslije berbe voća i povrća. *Agron Glas* **86**, 2, 105-126. <https://doi.org/10.33128/ag.86.2.3>

Meng Q, Fan H, Xu D, Aboshora W, Tabg Y, Xiao T i sur. (2017) Superfine grinding improves the bioaccessibility and antioxidant properties of *Dendrobium officinale* powders. *Int J Food Sci Technol* **52**, 6, 1440-1451. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13405>

Miller KS, Krochta JM (1997) Oxygen and Aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci Technol* **8**, 7, 228-237. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01051-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01051-0)

Mohnen D (2008) Pectin Structure and Biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 3, 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>

Morović M (2018) Flavonoidi: metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet. Preuzeto s: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:330124>

Moura-Alves M, Souza VGL, Silva JA, Esteves A, Pastrana LM, Saraiva C i sur. (2023) Characterization of Sodium Alginate-Based Films Blended with Olive Leaf and Laurel Leaf Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Technology. *Foods* **12**, 22, 4076. <https://doi.org/10.3390/foods12224076>

Munir H, Yagoob S, Awan KA, Imtiaz A, Naveed H, Ahmad N i sur. (2024) Unveiling the Chemistry of Citrus Peel: Insights into Nutraceutical Potential and Therapeutic Applications. *Foods* **13**, 11, 1681. <https://doi.org/10.3390/foods13111681>

Nair MS, Tomar M, Punia S, Kukula -Koch W, Kumar M. (2020): Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Int J Biol Macromol* **164**, 304-320

Nisar T, Alim A, Iqbal T, Iqbal M, Tehseen S, Zi-Chao W i sur. (2021) Functionality of different probiotic strains embedded in citrus pectin based edible films. *Int J Food Sci Technol* **57**, 2, 1005-1015. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15460>

Pamuković F (2017) Razvoj jestivih filmova s bioaktivnim sastojcima ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:043619>

Parreidt TS, Muller K, Schmid M (2018) Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods* **7**, 10, 170. <https://doi.org/10.3390/foods7100170>

Pavlič M, Petrič M (2020) Comparison of Visual and Instrumental Assessment of Colour Differences on Finished Wooden Surfaces. *Drv Ind* **71**, 2, 201-207. <https://doi.org/10.5552/drvind.2020.1954>

Perez Espitia PJ, Du WX, de Jesus Avena Bustillos R, de Fatima Ferreira Soares N, McHugh TH (2013) Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties -A review. *Food Hydrocoll.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>

Petrović V, Milković M, Valdec D (2013) Comparison of characteristics of ink-jet prints obtained using water based, solvent and UV inks. *Teh glas* **7**, 2, 191-197. preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/105606>

Puscaselu RG, Lobiuc A, Dimian M, Covasa M (2020) Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers* **12**, 10, 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>

Rosa LA, de la, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parilla E (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia EM (ured.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 253-271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

Siddiqui SA, Pahmeyer MJ, Assadpour E, Jafari SM (2022) Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. *Ind Crop Prod* **177**. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114484>

Seixas FL, Turbiani FRB, Salomao PG, Souza RP, Gimenes ML (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chem Eng Trans* **32**, 1693-1698. DOI: 10.3303/CET1332283

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

Sinopoli D (2013) A comparative analysis between the european union and the united states on the scope and function of food additives. Master food safety, Wageningen University

Skurtys O, Acevedo C, Pedreschi F, Enrione J, Osorio F, Aguilera JM (2010) Food hydrocolloid

edible biofilms and coatings. U: Hollingworth CS, (ured.) *Food Hydrocoll: Characteristics, Properties and Structures*, Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 41-180.

Song Q, Jiang X, Yang X, Huang L, Yu Y, Yu Q i sur. (2019) Physicochemical and functional properties of a water soluble polysaccharide extracted from Mung bean (*Vigna radiate* L.) and its antioxidant activity. *Int J Biol Macromol* **138**, 874-880. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.167>

Thakur BR, Singh RK, Handa AK, Dr. Rao MA (1997) Chemistry and uses of pectin - A Review, *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**, 1, 47-73. <https://doi.org/10.1080/104083997095227767>

Theagarajan R., Dutta S, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2019) Alginates for Food Packaging Applications. *Alginates*, 205-232. <https://doi.org/10.1002/9781119487999.ch11>

Tiwari RR, Umashankar MS, Damodharan N (2018) Recent update on oral films: A bench to market potential. *Int. J App Pharm* **10**, 6. <http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28725>

Van Rooyen B, De Wit M, Van Niekerk J (2024) Pectin and Alginate Functional Biopolymers: Factors Influencing Structural Composition, Functional Characteristics and Biofilm Development. *Coatings* **14**, 8, 987. <https://doi.org/10.390/coatings14080987>

Voća S, Šic Žlabur J, Jurković T, Družić J, Skendrović Babojelić M, Roje M (2022) Procjena nutritivnog potencijala i sadržaj specijaliziranih metabolita nekih vrsta agruma. *J Cent Eur Agric* **23**, 1, 114-124. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/23.1.3353>

Vos AP (2008) Preclinical studies on the immune-modulatory effects of dietary oligosaccharides. PhD thesis Maastricht Universtiy, the Netherlands. <https://www.researchgate.net/publication/46707196>

Vujnović A (2019) Primjena otpada nastalog konzumiranjem espresso kave pri izradi pektinskih biofilmova. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:938631>

Wang X, Yong H, Gao L, Li L, Jin M, Liu J (2019) Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract. *Food Hydrocoll* **89**, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd:2018.10.019>

Wittaya T (2013) Influence of Type and Concentration of Plasticizers on the Properties of Edible Film From Mung Bean Proteins. *Curr Appli Sci Technol* **13**, 1, 51-58.

Xu B, Bartley JP, Johnson RA (2013) Preparation and Characterization of alginate.carragenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide (WSC). *J Memb Sci* **218**, 1-2, 131-146. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(03\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(03)00165-0)

Zhang H, Wen H, Chen J, Peng Z, Shi M, Chen M i sur. (2019) Volatile compounds in Fruit Peels as Novel Biomarkers for the Identification of Four Citrus Species. *Molecules* **24**, 24, 4550. DOI: 10.3390/molecules24244550

Zioga M, Chroni A, Evageliou V (2022) Utilisation of Pectins Extracted from Orange Peels by Non Conventional Methods in the Formation of Edible Films in the Presence of Herbal Infusions. *Polysaccharides* **3**, 3, 574-588. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3030034>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lana Klaić 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