

Razvoj jestivih filmova s bioaktivnim sastojcima ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Pamuković, Franka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:043619>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Franka Pamuković

758/PI

**RAZVOJ JESTIVIH FILMOVA S
BIOAKTIVNIM SASTOJCIMA
RUŽMARINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr.sc. Draženke Komes, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Ane Belščak-Cvitanović, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici, prof.dr.sc. Draženki Komes na strpljenju, savjetima i potpori tijekom pripreme, provedbe i pisanja diplomskog rada. Veliko hvala i doc.dr.sc. Ani Belščak-Cvitanović na maksimalnoj motivaciji i entuzijazmu te svom prenijetom znanju. Također, zahvaljujem i doc.dr.sc. Mariu Ščetaru i Laboratoriju za pakiranje hrane na pomoći oko mjerenja debljine jestivih filmova.

Najveća zahvala ide mojoj cijeloj obitelji koja je kroz cijelo moje školovanje bila puna ljubavi, bezuvjetne podrške i neizmjerne vjere u moje uspjehe. Ponajviše veliko hvala bratu Frani na obavljanju svih administrativnih poslova na mom fakultetu tijekom svih ovih godina.

Zahvala ide i prijateljima bez kojih studentski dani ne bi bili najljepši i najveseliji.

Posebna zahvala ide mom Marinu, koji je na svoj način bio podrška i vjetar u leđa da me pogura onda kada je to bilo najpotrebnije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ JESTIVIH FILMOVA S BIOAKTIVNIM SASTOJECIMA RUŽMARINA

(Rosmarinus officinalis L.)

Franka Pamuković, 758/PI

Sažetak: Uslijed sve većih zahtjeva i potražnje tržišta za prirodnom, sigurnom i visoko- kvalitetnom hranom dugog roka trajanja, tehnološki napredak u razvoju biorazgradivih materijala posljednjih je godina omogućio razvoj inovativnih, funkcionalnih jestivih filmova kao ambalažnih materijala. U ovom radu ispitana je mogućnost formiranja jestivih filmova od prirodnih biopolimera alginata, kitozana, pektina i proteina sirutke u ekstraktu ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) kao izvoru bioaktivnih sastojaka, a s ciljem proizvodnje jestivih zaštitnih filmova poboljšanih funkcionalnih svojstava. Jestivi filmovi formulirani su od zasebnih, mješavina i slojeva biopolimera, te su karakterizirana njihova osnovna fizikalno-kemijska, vizualna, senzorska i bioaktivna svojstva. Određivanjem udjela suhe tvari, vode, debljine i topljivosti pokazana je ovisnost ovih parametara o vrsti biopolimera, dok način formiranja filmova nije imao značajniji utjecaj na ova svojstva. Senzorskim ocjenjivanjem i kolorimetrijskim mjerenjem najbolja vizualna svojstva pokazali su filmovi proizvedeni od slojeva biopolimera u kombinaciji kitozan-proteini sirutke. S obzirom na bioaktivni sastav formuliranih filmova, utvrđeno je da filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera sadrže najveće udjele ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina te najveći antioksidacijski kapacitet, posebice film proizveden od kombinacije biopolimera alginata i proteina sirutke. Praćenjem profila otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz filmova određeno je da filmovi proizvedeni od zasebnog biopolimera kitozana imaju najbolji profil.

Ključne riječi: bioaktivni spojevi, biopolimeri, funkcionalni filmovi, jestivi filmovi, ružmarin

Rad sadrži: 65 stranica, 25 slika, 5 tablica, 86 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Ana Belščak-Cvitanović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković

2. Prof.dr.sc. Draženka Komes

3. Doc.dr.sc. Mario Ščetar

4. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Datum obrane: 21. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT OF EDIBLE FILMS WITH ROSEMARY BIOACTIVE COMPOUNDS

(Rosmarinus officinalis L.)

Franka Pamuković, 758/PI

Abstract: Due to the growing market demands for natural, safe and high-quality food with prolonged shelf life, technological advances in the development of biodegradable materials enabled the use of innovative, functional edible films as packaging materials over the last years. This thesis examines the possibility of formulating edible films from natural biopolymers such as alginate, chitosan, pectin and whey proteins in rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) as the source of bioactive ingredients, with the aim of producing edible protective films with improved functional properties. Edible films were formulated from separate, blends and layers of stated biopolymers, and their basic physico-chemical, visual, sensory and bioactive properties were characterized. By assessing the content of dry matter, water, thickness and solubility, the dependence of these parameters on the type of biopolymers was established, while the formulation manner of the films did not have a significant effect on these properties. By sensory evaluation and colorimetric measurements, the best visual properties of films produced from biopolymer layers, especially in combination chitosan-whey proteins were determined. Considering the bioactive composition, it was established that films formulated from biopolymer blends exhibit the highest content of total polyphenols, hydroxycinnamic acids and the highest antioxidant capacity, especially films produced from the combination of alginate and whey proteins. The release kinetics of total polyphenols and antioxidant capacity revealed that the films produced from the separate biopolymer chitosan exhibit the best, prolonged release profile.

Keywords: bioactive compounds, edible films, rosemary extract, functional films, natural biopolymers

Thesis contains: 65 pages, 25 figures, 5 tables, 86 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: PhD Ana Belščak-Cvitanović, Assistant Professor

Reviewers:

1. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković
2. Prof.dr.sc. Draženka Komes
3. Doc.dr.sc. Mario Ščetar
4. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Thesis defended: 21 July 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. JESTIVI FILMOVI.....	3
2.2. MATERIJALI ZA IZRADU.....	3
2.2.1. Hidrokolooidni materijali.....	4
2.2.1.1. Škrob.....	6
2.2.1.2. Alginat.....	7
2.2.1.3. Pektin.....	8
2.2.1.4. Kitozan.....	9
2.2.1.5. Proteini sirutke.....	10
2.2.2. Plastifikatori.....	11
2.3. SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA.....	12
2.3.1. Debljina filmova.....	12
2.3.2. Mehanička svojstva.....	13
2.3.3. Barijerna svojstva.....	13
2.3.3.1. Propusnost vodene pare i plinova.....	13
2.3.4. Optička svojstva: sjaj, prozirnost i boja.....	15
2.4. POSTUPCI PROIZVODNJE JESTIVIH FILMOVA.....	15
2.4.1. Ekstruzija.....	15
2.4.2. Lijevanje otopine jestivih filmova.....	16
2.4.3. Premazivanje.....	17
2.4.4. Prskanje.....	17
2.4.5. Uranjanje.....	17
2.5. PRIMJENA JESTIVIH FILMOVA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	18
2.6. FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI.....	21
2.7. RUŽMARIN KAO IZVOR FUNKCIONALNIH SASTOJAKA.....	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. MATERIJALI.....	25
3.2. METODE RADA.....	25
3.2.1. Priprema ekstrakata ružmarina.....	25
3.2.2. Priprema jestivih filmova.....	25
3.2.3. Karakterizacija filmova.....	27
3.2.3.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari).....	27
3.2.3.2. Određivanje topljivosti filmova u vodi.....	28
3.2.3.3. Određivanje debljine filmova.....	29
3.2.3.5. Određivanje boje.....	29
3.2.4. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova.....	30
3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	31

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	32
3.2.4.3. Određivanje udjela hidrokscimetnih kiselina.....	32
3.2.4.4. Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova.....	35
3.2.5. Senzorska analiza.....	35
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA FORMULIRANIH FILMOVA.....	37
4.2. VIZUALNI IZGLED FORMULIRANIH FILMOVA.....	42
4.3. BIOAKTIVNI SASTAV FORMULIRANIH FILMOVA.....	45
4.3.1. Udjel bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet filmova formuliranih s ekstraktom ružmarina.....	45
4.3.2. Kinetika otpuštanja bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova u simuliranim uvjetima gastro-intestinalnog trakta.....	48
4.4. SENZORSKA SVOJSTVA FORMULIRANIH FILMOVA.....	53
5. ZAKLJUČCI.....	56
6. LITERATURA.....	58

1. UVOD

Jestivi filmovi primjenjuju se kao ambalažni materijali za pakiranje prehrambenih proizvoda, te kao takvi osiguravaju nekoliko važnih funkcija kao što su sprječavanje migracije kisika, vode, ugljikovog dioksida, lipida i sastojaka arome iz okoline u proizvod, stvaranje barijera između slojeva heterogenih proizvoda, za produljenje roka trajanja prehrambenih proizvoda (Garcia i sur., 2016). Velika prednost ove vrste ambalažnih materijala jest njihova mogućnost konzumacije čime se smanjuje otpad od pakiranja prehrambenih proizvoda. Na taj način omogućuje se zamjena štetne i nerazgradive plastične ambalaže koja već duži niz godina predstavlja sve veći globalni problem za okoliš.

Jestivi film, kao tanki sloj na ili između komponenata hrane, proizvodi se od polimernih materijala te se posljednjih godina sve češće takvi filmovi obogaćuju bioaktivnim sastojcima. Najčešće korišteni prirodni biopolimeri za proizvodnju jestivih filmova su hidrokoloidi (polisaharidi i proteini), lipidi te kombinacija hidrokoloida i lipida. Pri proizvodnji jestivih filmova razlikuje se nekoliko mogućnosti primjene samih polimera pa se tako mogu proizvesti filmovi sastavljeni samo od jednog, filmovi sastavljeni od mješavine dviju ili više polimera ili filmovi više polimera u slojevima (Garcia i sur., 2016). Kombiniranje polimera za proizvodnju jestivih filmova omogućuje poboljšavanje barijernih i mehaničkih svojstava jestivih filmova (Bertuzzi i Slavutsky, 2016). Posljednjih godina veliki broj znanstvenih istraživanja posvećen je ispitivanju kombinacije polimera za proizvodnju jestivih filmova te njihovih svojstava. Osim poboljšanja osnovnih fizikalno-kemijskih i mehaničkih svojstava, u trendu je i proizvodnja filmova obogaćenih raznovrsnim bioaktivnim sastojcima, a u cilju poboljšanja funkcionalnih svojstava filmova. Od bioaktivnih sastojaka najčešće se primjenjuju polifenolni antioksidansi zbog svojih izrazitih antioksidacijskih svojstava, čime štite film, time ujedno i proizvod od oksidacijskih reakcija i mikrobnog djelovanja. Primjena polifenola kao bioaktivnih sastojaka iz prirodnih biljnih ekstrakata dosad je ispitivana u nekoliko znanstvenih istraživanja, poput proizvodnje kitozanskih filmova sa dodatkom ekstrakta indijskog ogrozda (*Emblica officinalis*) i galangana (*Alpina galanga*) u ispitivanjima Mayachiewa i suradnika (2010), te proizvodnja alginatnih filmova sa dodatkom ekstrakta ginsenga (*Panax*) u istraživanju Norajita i suradnika (2010).

U ovom radu ispitat će se mogućnost proizvodnje funkcionalnih jestivih filmova, obogaćenih bioaktivnim sastojcima ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.). Kao materijali za proizvodnju filmova primijenit će se 4 prirodna biopolimera; alginat, pektin, kitozan i proteini

sirutke te će se metodom lijevanja proizvesti čisti filmovi te njihove kombinacije u obliku mješavina ili formiranja slojeva dvaju biopolimera. Jestivi filmovi pripremljeni u destiliranoj vodi, služit će kao kontrolni filmovi te će se koristiti za usporedbu učinka obogaćivanja jestivih filmova sa bioaktivnim sastojcima. Provest će se karakterizacija pripremljenih filmova određivanjem njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (udio suhe tvari, topljivost u vodi, debljina), boje, bioaktivnog sastava (udjel polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodama) te senzorskih svojstava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JESTIVI FILMOVI

Jestivi zaštitni filmovi mogu se definirati kao tanki sloj materijala koji potrošač može konzumirati, a koji osigurava barijeru prema plinovima i vodenoj pari (Galić, 2009). S obzirom da se proizvode od prirodnih i jestivih sastojaka, osigurana je njihova biodegradabilnost te se lakše razgrađuju od sintetskih polimernih materijala. Jestivi filmovi jednako kao i plastična ambalaža svojim fizikalnim, kemijskim i mehaničkim svojstvima moraju osigurati zaštitu i očuvati proizvod od raznih utjecaja iz okoliša. Najveća prednost jestivih filmova u usporedbi sa sintetičkimima je ta što se jestivi filmovi mogu jesti zajedno sa proizvodom te na taj način smanjiti zagađenje okoliša. Filmovi se mogu koristiti za individualno pakiranje pojedinačnih količina hrane koji se trenutno ne pakiraju individualno iz praktičnih razloga (kruške, grah, orasi, jagode) (Bourtoom, 2008). Također, filmovi se mogu primijeniti i kod heterogenih proizvoda, gdje odvajaju dva sloja različitog sastava. Jestivi filmovi se mogu prilagoditi kako bi spriječili propuštanje vlažnosti između komponenata i migraciju otopina u hrani kao što su pizza, pite i bomboni (Bourtoom, 2008). Proizvodnja jestivih filmova stvara manje otpada i zagađenja, međutim, njihova propusnost i mehanička svojstva su općenito slabija nego kod sintetskih filmova (Kester i Fennema, 1986). Iz tog razloga potrebno je istražiti nove metode i materijale za proizvodnju filmova kako bi se poboljšala svojstva jestivih filmova kao i njihova primjena.

2.2 MATERIJALI ZA IZRADU

Proizvodnja jestivih filmova uključuje primjenu najmanje jedne komponente sposobne za formiranje neprekidnog i kohezivnog matriksa, što je karakteristika polimernih materijala (Guilbert i Gontard, 2005). Ovisno o vrsti polimera od kojeg su proizvedeni, materijali za proizvodnju jestivih filmova dijele se u tri skupine:

- hidrokoloide (polisaharidi i proteini),
- lipidi (voskovi i masne kiseline) te
- kombinacija hidrokoloida i lipida (kompoziti).

Tablica 1. Materijali za izradu jestivih filmova i prevlaka (Galić, 2009)

Funkcionalni sastav	Materijali	
Materijali za izradu filmova	Polisaharidi	Škrob, modificirani škrob, modificirana celuloza (karboksimetil celuloza, metil-celuloza, hidroksipropil celuloza, hidroksipropilmetil-celuloza), alginat, karagenan, pektin, pululan, kitozan, gelan guma, ksantan guma
	Proteini	Kolagen, želatina, kazein, proteini sirutke, zein, pšenični gluten, proteini bjelanjka
	Lipidi, voskovi	Voskovi (pčelinji vosak, parafin, karnauba vosak), smole (šelak), acetogliceridi
Plastifikatori (omekšavala)	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)	

2.2.1. Hidrokoloidni materijali

Hidrokoloidi su hidrofilni polimeri, biljnoga, životinjskog ili sintetskog podrijetla, a obično sadrže velik broj hidroksilnih skupina te mogu biti polielektroliti (npr. alginat, karagenan, karboksimetilceluloza, arapska guma, pektin i ksantan guma) (Skurtys i sur., 2010). Hidrokoloidi kao što su polisaharidi i proteini, imaju široku primjenu u formiranju jestivih filmova pri čemu imaju utjecaj na teksturu, aromu i rok trajanja proizvoda (Phillips i Williams, 2000). Oni koji se koriste za formiranje filmova su djelomično ili u potpunosti topljivi u vodi. Uloga hidrokoloida je povećanje viskoznosti kontinuirane faze (vodena faza), kao sredstvo za zgušnjavanje ili geliranje (Debeaufort i sur, 1998). Hidrokoloidi mogu imati i ulogu emulgatora jer njihov stabilizirajući učinak na emulzije potječe od povećanja viskoznosti vodene faze jestivih filmova (Skurtys i sur, 2010). Kinetičko gibanje kapljica ulja se smanjuje, što za rezultat ima nižu stopu flokulacije i spajanje u film (Skurtys i sur, 2010). Hidrokoloidi topljivi u vodi, poput polisaharida i proteina, su manje učinkovita barijera za migraciju vode. Međutim, njihova propusnost za plinove je često niža nego kod sintetičkih

materijala, te su dobra barijera za ulja i masti. Od najveće važnosti za jestive filmove proizvedene od hidrokoloida je poboljšanje barijernih svojstava na vodu. Posebice su posljednjih godina kao materijali zanimljivi proteini i ugljikohidrati, budući da uspješno formiraju jestive i biorazgradive filmove a pridonose dodanoj vrijednosti proizvoda zbog funkcionalnih svojstava (Guilbert i sur., 1996).

Polisaharidi kao biopolimeri sastavljeni su od većeg broja mono- ili disaharida povezanih glikozidnim vezama. Polisaharidni filmovi nastaju interakcijama između segmenata dugih lanaca polisaharida tijekom otapanja i stvaranjem novih intermolekulskih hidrofilnih veza nakon isparavanja otapala (Garcia i sur., 2016). Udjel vode u velikoj mjeri utječe na funkcionalna svojstva uslijed hidrofilne prirode filmova od polisaharida (Lacroix i Tien, 2005). U proizvodnji jestivih filmova koriste se: škrob, neškrobni ugljikohidrati, gume i vlakna (Han i Gennadios, 2005). Polisaharidi koji se koriste kao materijali u proizvodnji filmova obično su jednaki onima koji se koriste za geliranje, stabilizaciju i zgrušavanje. Gume kao što su alginat, pektin i karboksimetil celuloza, pokazuju značajno različita reološka svojstva u kiselim uvjetima nego u neutralnim ili alkalnim (Han i Gennadios, 2005). Iako elektrostatska neutralnost ugljikohidrata ne utječe značajno na svojstva formiranih filmova, pojava relativno velikog broja hidroksilnih skupina ili drugih hidrofilnih jedinica u strukturi ukazuju da vodikove veze mogu imati značajnu ulogu u stvaranju filma i njegovih karakteristika. Polisaharidi u otopini sadrže reaktivne grupe koje su sposobne povezivati se sa drugim polimerima uz primjenu odgovarajućih postupaka. Razlozi za njihovu upotrebu su odlična barijerna svojstva za ulja, lipide, kisik i općenito plinove u suhim uvjetima, te odlična mehanička svojstva. Polisaharidi su jako hidrofilni zbog čega imaju slabija barijerna svojstva na vodenu paru. Usprkos tome, mogu imati ulogu u smanjenju gubitka vlage iz prehrambenih proizvoda (Kester i Fennema, 1986).

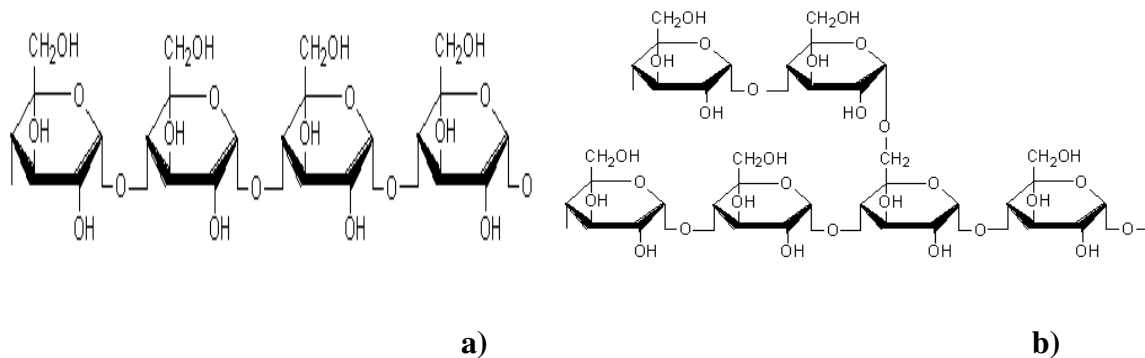
Proteini su makromolekule sa specifičnim aminokiselinskim sekvencama i molekulskom strukturom. Sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina mogu se lako modificirati toplinskom denaturacijom, zračenjem, tlakom, mehaničkom obradom, kemijskom hidrolizom, kiselinama, lužinama, solima i kemijskim umrežavanjem (Han i Gennadios, 2005). Najznačajnije karakteristike proteina u odnosu na druge materijale koji stvaraju film su konformacijska denaturacija, elektrostatski naboj i amfifilna priroda (Han i Gennadios, 2005). Mnogi faktori mogu utjecati na konformaciju proteina, kao što su gustoća naboja i hidrofilna-hidrofobna ravnoteža (Han i Gennadios, 2005). Ti čimbenici kontroliraju fizikalna i

mehanička svojstva jestivih filmova. Proteini za proizvodnju proteinskih filmova dobivaju se iz različitih životinjskih i biljnih izvora, kao što su životinjska tkiva, mlijeko, jaja, žitarice i uljarice (Krochta, 2002). Pri proizvodnji proteinskih filmova također je neophodna upotreba plastifikatora. Kao i polisaharidi, i proteini su topivi u vodi, etanolu i mnogim drugim otapalima. Činjenica da proteini nisu potpuno hidrofobni i sadrže pretežno hidrofilni aminokiselinski ostatak ograničava njihova barijerna svojstva za vlagu. Zbog loše zaštite od vodene pare i slabijih mehaničkih svojstava, primjena proteinskih filmova je ograničena. No, zbog formiranja filmova boljih mehaničkih svojstava od onih baziranih na lipidima i polisaharidima, i zbog mogućnosti povećanja nutritivne vrijednosti prehrambenog proizvoda, interes za primjenom proteinskih filmova raste.

Kemijske strukture, izvori i svojstva nekih od najčešćih korištenih hidrokoloidnih materijala za proizvodnju filmova prikazani su u nastavku.

2.2.1.1. Škrob

Škrob je jedan od najrasprostranjenijih polisaharida u prirodi. Sastoji se od dva polimera glukoze: ravnolančane amiloze (25 % škroba) (slika 1a) i razgranatog amilopektina (75 % škroba) (slika 1b).



Slika 1. Kemijska struktura amiloze (a) i amilopektina (b) (Anonymous 1, 2004)

Kao sirovina utječe na fizikalna svojstva prehrambenih proizvoda, primjerice juha, grickalica, umaka, mesnih proizvoda, pridonoseći teksturi, viskozitetu, formiranju gela, adheziji, zadržavanju vlage, homogenosti proizvoda i formiranju filma (Thomas i Atwell, 1997). Pripremajući otopinu škroba za proizvodnju filmova bitno je minimizirati ili izbjeći hidrolizu i oksidaciju škroba. U otopini svaki polimer škroba mora biti potpuno želatiniziran,

dezintegriran i otopljen. Važno je pripremiti otopinu škroba sa pogodnom koncentracijom krutine, kako bi se osigurala kontinuiranost filmova i jednostavnost lijevanja. U slučaju male koncentracije krutine (<4%), otopina sa potpuno otopljenim škrobnim polimerima se teško gelira, uzrokujući probleme formiranja neprekidnog, dovoljno debelog filma (Protzman i sur., 1967). Međutim, ako je koncentracija velika (>30%), otopina je previše viskozna da bi se ravnomjerno razlila (Protzman i sur., 1967). Predložena koncentracija za formiranje škrobnih filmova iznosi 10-15% (Liu, 2005). Filmovi od škroba su često transparentni (Lourdin i sur., 1997a) ili djelomično transparentni (Rindlav i sur., 1997), bez mirisa i okusa, te bezbojni (Wolff i sur., 1951). Zbog dobrih barijernih svojstava na kisik, koriste se u formiranju jestivih filmova. Ujedno su i jeftiniji od primjerice ne-škrobnih filmova. Učinkovitost škrobnih filmova je promjenljiva zbog dostupnosti različitih vrsta škroba i njihovog kapaciteta za fizikalnim i/ili kemijskim modifikacijama (Ellis i sur., 1998; Liu, 2002). Filmovi od škroba najčešće se koriste za pekarske proizvode, bombone i proizvode od mesa (Thomas i Atwell, 1997). Škrobni filmovi su možda najučinkovitiji oblici topive ambalaže u pogledu izvedbe, prilagodljivosti za proizvode, proizvodnih postupaka i troškova (Daniels, 1973).

2.2.1.2. Alginat

Alginat je negativno nabijeni polisaharid dobiven ekstrakcijom iz smeđih algi (slika 2), poznatih kao *Phaeophyceae*.

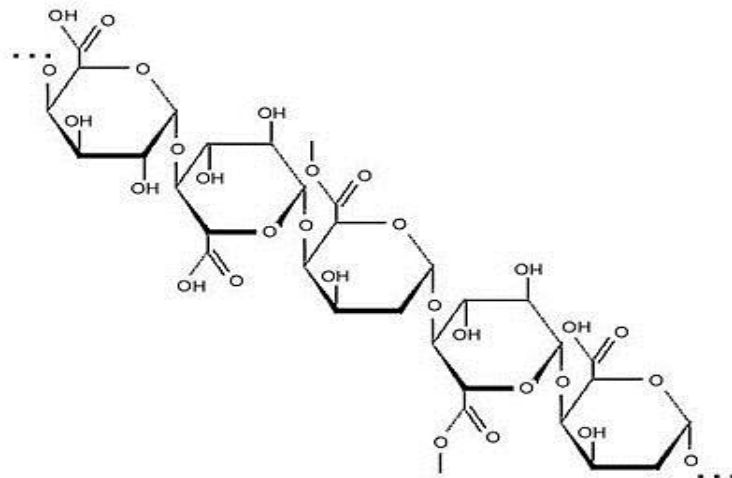


Slika 2. Fotografija smeđe alge (Anonymous 2, 2017)

Proizvodi jednolike, prozirne i u vodi topljive filmove. Alginat može smanjiti dehidraciju proizvoda i smanjiti oksidaciju neprijatnih okusa u mesu (Wanstedt i sur., 1981). Filmovi izrađeni od alginata pokazuju visoku krutost i nisku deformabilnost (Seixas i sur., 2013). Svojstva alginatnih filmova mogu se poboljšati dodatkom ulja (origano, češnjak), škroba i probiotika (Skurtys i sur., 2010), te dodatkom kalcija koji pridonosi efikasnijem geliranju filma. Sadrži dobra svojstva pogodna za proizvodnju jestivih filmova, iako nakon sušenja filmovi budu prilično krhki i lomljivi. Međutim, alginatni filmovi mogu biti plastificirani dodatkom glicerola čime se ovaj nedostatak može umanjiti.

2.2.1.3. Pektin

Pektin je negativno nabijeni polisaharid, sastavljen od D-galakturonske kiseline kao monomera povezanih β -1,4 vezama (slika 3). Jedan je od glavnih komponenti stanične stijenke biljke, a pridonosi cjelovitosti tkiva i krutosti te se smatra jednim od najsloženijih makromolekula u prirodi (Jolie i sur., 2010).



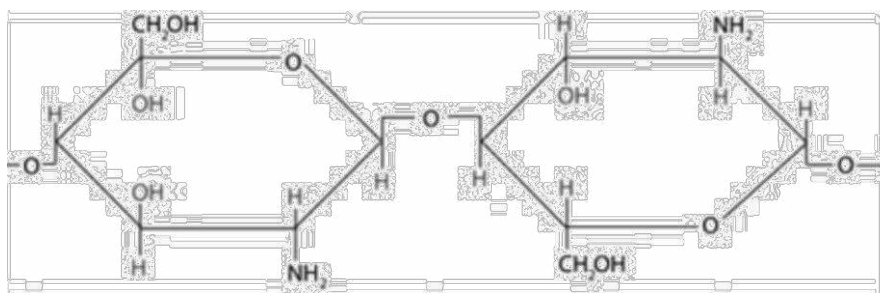
Slika 3. Kemijska struktura pektina (Anonymous 3, 2009)

U prehrambenoj industriji koristi se kao sredstvo za geliranje, stabilizaciju i zgrušnjavanje proizvoda poput džemova, jogurta, sladoleda itd. Karboksilne grupe galakturonske kiseline mogu biti potpuno ili djelomično esterificirane metanolom, pa tako razlikujemo viskoesterificirane i niskoesterificirane pektine. Stupanj esterifikacije utječe na svojstva pektina, pogotovo na svojstvo geliranja. Pa tako, viskoesterificirani pektini formiraju odlične

filmove (Lacroix i Tien, 2005). Niskoesterificirani pektini, dobiveni kontroliranom deesterifikacijom, formiraju gelove u prisutnosti kalcijevih iona, a također se mogu koristiti za razvoj jestivih filmova (Lacroix i Tien, 2005). Filmovi od pektina imaju dobra barijerna svojstva za plinove, a mogu i spriječiti rast bakterija u hrani (Baldwin i sur., 1995). Naime, kada se u jestive filmove od pektina inkorporira prirodni bioaktivni spoj postiže se antimikrobno svojstvo filma protiv patogena koji se prenose hranom (Espitia i sur., 2013). Pektinski jestivi filmovi su ekološka prihvatljiva alternativa, biorazgradivi, dostupni i jeftini, kao i ostali jestivi filmovi formirani od biopolimera kao baze, te su izvodljivi za proizvodnju filmova samostalno ili u kombinaciji s drugim polimerima (Espitia i sur., 2013).

2.2.1.4. Kitozan

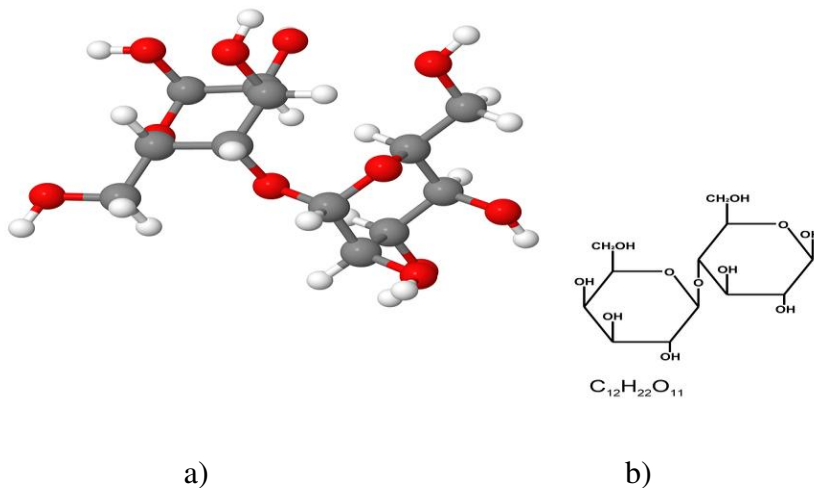
Kitozan je kationski polisaharid vezan β -1,4 vezama (slika 4), a dobiven je deacetilacijom hitina, prisutnog u rakovima ili različitim gljivicama, u lužnatim uvjetima. Sastoji se od β -(1-4)-2-acetamido-D-glukoze i β -(1-4)-2-amino-D-glukoze (Arvanitoyannis i sur., 1998). Kitozan je biopolimer s dobrim antimikrobnim svojstvima, djelujući protiv mnogih patogena i mikroorganizama kvarenja. Sprječava rast raznih mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i kvasci. Antimikrobna aktivnost kitozana ovisi o molekularnoj težini, stupnju polimerizacije i acetilacije (Han, 2005). Istraživanja su pokazala da se antimikrobna aktivnost povećava sa stupnjem deacetilacije (Tokura i sur., 1997). Kitozan je lako topljiv u različitim kiselim otapalima. Kitozanski filmovi nastaju otapanjem kitozana u kiselini (Begin i Van Calsteren, 1999). Kitozan se može koristiti kao sredstvo za bistenje, zgušnjivač, kao barijera za plinove, sredstvo za liječenje rana i antimikrobno sredstvo. Kitozanski filmovi imaju vrlo dobra barijerna svojstva za plinove. Međutim, kao i kod drugih jestivih filmova sa polisaharidnom bazom, imaju veliku propusnost vodene pare. Kitozan pokazuje i svojstvo apsorpcije teških metalnih iona koje može imati ulogu u smanjenju oksidacijskih procesa u hrani kataliziranoj sa slobodnim metalima (Han, 2005). Kationska svojstva kitozana nude dobre mogućnosti povezivanja s brojnim spojevima tijekom obrade čime se inkorporiraju specifična svojstva u materijal (Han, 2005). Kitozan formira filmove dobrih mehaničkih svojstava, pokazujući poželjnu fleksibilnost zbog koje ga je teško rastrgati. Zbog navedenih svojstava, netoksičnosti, biorazgradivosti, tvorbi kompaktnih filmova glatke površine, ima primjenu u različitim pakiranjima.



Slika 4. Kemijska struktura kitozana (Bourtoom, 2008)

2.2.1.5. Proteini sirutke

Proteini sirutke, kao nusprodukt industrije sira, imaju odlična prehrambena i funkcionalna svojstva i potencijal koristan za proizvodnju jestivih filmova (Mate i Krochta, 1996). Proteini sirutke (slika 5) predstavljaju oko 20% ukupnih proteina mlijeka (Brunner, 1981), te sadrže pet glavnih proteina: α -laktalbumin, β -laktoglobulin, goveđi serumski albumin (BSA), imunoglobulin i specifične polipeptide (Lacroix i Cooksey, 2005). Proteini sirutke definirani su kao oni koji ostaju u serumu mlijeka nakon koagulacije kazeina pri pH 4,6 i pri temperaturi od 20°C (Morr i Ha, 1993).



Slika 5. Model molekule (a) i kemijska struktura (b) proteina sirutke (Anonymous 4, 2015)

Beta-laktoglobulin se sastoji od 160 amino kiselina, ovisno o genskim varijantama i predstavlja 48-58% proteina sirutke (Dangaran i sur., 2009). On se ne denaturira pri promjeni pH vrijednosti, ali je termolabilan. Sve frakcije proteina sirutke imaju globularnu

konformaciju, ali različite sekvence amino kiselina i molekulske mase. Kao posljedica toga, konformacije denaturiranih proteina razlikuju se jedna od druge. Osim toga, značajno se razlikuje i broj disulfidnih veza koje utječu na trodimenzionalnu strukturu proteina (Dybing i Smith, 1991). Ove različite strukture mogu proizvesti filmove različitih propusnosti. Za stvaranje filma, važna je slobodna sulfhidrilna grupa, cistein 121 (CYS121) i dvije disulfidne veze između cisteina 66-cistein 160 i 106-cistein 119 (Dangaran i sur., 2009). U prirodnoj formi, CYS121 je skriven (Sawyer i sur., 1999). Nakon toplinske denaturacije, ta grupa je izložena i dostupna za stvaranje intermolekularnih disulfidnih veza. Prema tome, jestivi filmovi na bazi denaturiranih proteina sirutke su jači i kohezivniji nego oni formirani od prirodnog proteina (Perez-Gago i sur., 1999). Temperatura denaturacije beta-laktoglobulina je 78°C u 0,7 M fosfatnog pufera (pH 6) (deWit i Klarenbeek, 1983). Alfa-laktalbumin je drugi najbrojniji protein sirutke (13-19%), te sadrži četiri disulfidna mosta. Kod jestivih filmova proteina sirutke, propusnost kisika i ugljikovog dioksida eksponencijalno se povećava s relativnom vlažnosti prema jednadžbi:

$$P=j*10^{kRH}$$

[1]

gdje je P propusnost kisika, odnosno ugljikovog dioksida ($\text{cm}^3 \mu\text{m}^2 \text{ d kPa}$), j i k su konstante, a RH relativna vlažnost pri 25°C (%) (Cisneros-Zevallos i Krochta, 2002). Proteini sirutke su snažni antioksidansi tako da su učinkoviti u zaštiti protiv oksidacije sastojaka prehrambenih proizvoda. Koriste se u prehrambenim proizvodima zbog svoje visoke prehrambene vrijednosti i njihove sposobnosti da formiraju gelove, emulzije ili pjene. Glicerol je najučinkovitiji plastifikator matriksa proteina sirutke (Sothornvit i Krochta, 2001). Dodatkom plastifikatora unaprjeđuje se fleksibilnost filmova. Pokazalo se da proteini sirutke proizvode transparentne i fleksibilne jestive filmove, s odličnim barijerama za kisik i ulja, te bez okusa i mirisa (McHugh i Krochta, 1994). Međutim, jestivi filmovi proizvedeni od proteina sirutke bez ikakvih modifikacija imaju veliku propusnost za vlagu i relativno slaba mehanička svojstva u usporedbi sa sintetičkim ili drugim materijalima za pakiranje hrane, te stoga imaju ograničenu primjenu.

2.2.2. Plastifikatori

Stvaranje filmova kao prevlaka ovisi o dvije vrste interakcija: kohezije (privlačne sile između polimernih molekula filma) i adhezije (sile između filma i supstrata) (Sothornvit i Krochta, 2005). Svojstva polimera - molekularna težina, polaritet i struktura lanca iznimno su bitna za ove vrste interakcija. Kohezivne sile u polimernim filmovima mogu rezultirati neželjenim svojstvima, kao što je lomljivost. Da se prevladaju sile kohezije, filmovima se dodaju plastifikatori koji smanjuju intermolekulske sile. Posljedično, povećava se pokretljivost polimernih lanaca, a plastifikator snižava temperaturu staklastog prijelaza i poboljšava fleksibilnost, žilavost i rastezljivost filmova (Banker, 1966). Kao plastifikatori mogu se koristiti monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, polioli, lipidi i derivati. Voda je također važan plastifikator u proizvodnji jestivih filmova. Glavni nedostatak plastifikatora je povećanje propusnosti za plinove, vodenu paru i otopljenje supstancije, što je posljedica smanjenja kohezije filma (Gontard i sur., 1993). Plastifikatori mogu djelovati i kao plastifikatori, ali i kao antiplastifikatori. Dodatkom plastifikatora u nižim koncentracijama i pri nižim temperaturama dolazi do antiplastifikacije (Sothornvit i Krochta, 2005). Antiplastifikacijom se smanjuje propusnost za vodenu paru, a povećava modul elastičnosti i lomljivost, što je suprotno plastifikaciji. Prema tome, plastifikatori se moraju koristiti u odgovarajućoj količini. Plastifikatori pomažu pri obradi filmova tijekom proizvodnje i mijenjaju svojstva konačnog proizvoda (Sothornvit i Krochta, 2005). Kao pomoćno sredstvo pri obradi, smanjuju temperaturu proizvodnje, smanjuju lijepljenje za kalupe i povećavaju vlažnost. Kao modifikatori, povećavaju temperaturni raspon upotrebe konačnog proizvoda, povećavaju fleksibilnost, rastezljivost i žilavost (Sears i Darby, 1982). Dakle, postoje prednosti i nedostaci upotrebe plastifikatora u jestivim filmovima.

2.3. SVOJSTVA JESTIVIH FILMOVA

2.3.1. Debljina filmova

Debljina filma kontrolirana je koncentracijom čvrste faze i količinom otopine (Liu, 2005). Također, debljina filma bitno ovisi o tehnici primjene i viskozitetu otopine. Visoko viskozna otopina se ne može ili se jako teško razlijeva, što daje visoku debljinu jestivog filma. Debljina filmova ima vrijednosti manje od 0,25 mm. Bitno je odrediti debljinu formiranog filma jer ona utječe na biološka svojstva kao i na sam rok trajanja obložene hrane. Isto tako, kod

biopolimernih filmova propusnost vodene pare ovisi o debljini filma. Dvije su metode kojima se određuje debljina filma: kontaktna i ne-kontaktna metoda. Kontaktnom metodom debljina filma mjeri se mikrometrom. Iako je ova metoda jednostavnija nema prednost nad ne-kkontaktnom metodom jer je moguće oštećenje mjerenog uzorka. Metode koje primijenom na filmove ne utječu na funkcionalnost ispitivanog filma te ga ne oštećuju, nazivaju se ne-kontaktne metode.

2.3.2. Mehanička svojstva

Mehanička otpornost i deformabilnost jestivih filmova mora se utvrditi da se procijeni održivost integriteta filma tijekom rukovanja, pakiranja i ostalih daljnjih procesa (Debeaufort i sur., 1998). Općenito, jestivi filmovi imaju slabija mehanička svojstva od sintetičkih filmova. Hidrokoloide obično pružaju bolja mehanička svojstva jestivim filmovima u usporedbi sa filmovima na bazi lipida i hidrofobnih materijala. Tri parametra definiraju mehanička svojstva, a to su: Young-ov modul, vlačna čvrstoća i postotak produljenja prije pucanja (Skurtys i sur., 2010). Youngov modul (modul elastičnosti) predstavlja omjer naprezanja i rezultirajućeg produljenja filma, odnosno označava krutost jestivog filma (Ozdemir i Floros, 2008).

2.3.3. Barijerna svojstva

Jedna od najznačajnijih funkcija jestivih filmova je ta da su barijere protiv plinova, vodene pare, ulja i aroma. Određivanje barijernih svojstava jestivih filmova važno je za prikaz djelotvornosti samog filma. Barijerna svojstva ovise o kemijskom sastavu i strukturi polimera upotrijebljenih za proizvodnju filma, karakteristikama proizvoda i uvjetima skladištenja (Singh i Singh, 2005). Proizvodnjom filma dobrih barijernih svojstava postiže se produljenje roka trajanja obloženog proizvoda.

2.3.3.1. Propusnost vodene pare i plinova

Difuzija plinova kroz fleksibilni materijal jestivih filmova ovisi o fizikalnoj strukturi barijere. Transport plinova u jestivim filmovima odvija se u tri koraka: adsorpcija plina na površinu

filma, difuzija čestica od jedne do druge strane filma i desorpcija čestica plina iz filma. Fickov zakon prikazuje difuziju čestica plina kroz jestivi film. Jednadžba Fickovog zakona je:

$$J = -D \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial x}\right)$$

[2]

gdje su:

J- tok, neto količina otopljene tvari koja difundira kroz jedinicu površine u jedinici vremena ($\text{g}/\text{m}^2\text{s}$ ili mLs)

D- koeficijent difuzije ili difuzivnost (m^2s)

C- koncentracija tvari koja difundira (g/m^3 ili mL/m^3)

X- debljina filma (m)

ili

$$J = D \cdot \frac{C_2 - C_1}{X} = Q / (A \cdot t)$$

[3]

gdje su:

Q- količina plina koji difundira kroz film (g ili mL)

A- površina filma (m^2)

t- vrijeme (s)

Konačna jednadžba za određivanje propusnosti filma dobiva se primjenom Henryevog zakona te korištenjem navedenih jednadžbi. Tad jednadžba glasi:

$$\frac{Q}{A \cdot t} = D \cdot S \cdot \frac{p_2 - p_1}{X} = P \cdot \Delta p / X$$

[4]

gdje su:

S- Henryeva konstanta topljivosti (mol/atm)

Δp - razlika parcijalnog pritiska plina kroz film (Pa)

P- propusnost (mL ili $\text{gm}/\text{m}^2\text{sPa}$)

Propusnost vodene pare, ugljikovog dioksida i kisika može se računati prema jednadžbi:

$$P = Q \cdot X / (A \cdot t \cdot \Delta p) \quad [5]$$

U zapakiranim namirnicama, propusnost vodene pare filma odlučujući je faktor u kontroli promjene količine vlage i aktivitetu vode u pakiranom proizvodu (Singh i Singh, 2005). Aktivnost vode se definira kao omjer parcijalnog tlaka vodene pare u proizvodu i parcijalnog tlaka u čistoj vodi. Propusnost vodene pare ovisi o temperaturi pa se tako propusnost vodene pare smanjuje kada se temperatura smanjuje, ali se može ponovno povećati pri vrlo niskim temperaturama (Singh i Singh, 2005). Izuzev lipidnih filmova, većina jestivih filmova imaju veću propusnost vodene pare od plastičnih materijala. Jestivi filmovi imaju širok raspon vrijednosti propusnosti kisika.

2.3.4. Optička svojstva: sjaj, prozirnost i boja

Optička svojstva jestivih filmova ovise o sastavu filma i postupku izrade, kao i o drugim vanjskim faktorima (temperatura, relativna vlažnost) (Rhim i Shellhammer, 2005). Sjaj kod jestivih filmova je visoko poželjan. S fizičkog gledišta, sjaj se smanjuje količinom svjetlosti raspršene materijalom (Hong i sur., 2004). Svjetlost je obično povezana s hrapavosti površine. Što je veća hrapavost površine veća je količina raspršene svjetlosti, i obrnuto. Osim sjaja, još je jedan aspekt izgleda jestivih filmova, a to je nejasnoća (mutnoća) (Hong i sur., 2004). Nejasnoća se odnosi na tendenciju filma da rasprši svjetlost. Nejasnoća tako utječe samo na estetski izgled filma. U ekstremnim uvjetima nejasnoća može utjecati na sposobnost razlikovanja pojedinog sadržaja u proizvodu obavijenog u jestivi film, te tako imati važnu ulogu kod potrošača. Zaštita od svjetla koju nude jestivi filmovi ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući: prirodne apsorpcijske osobine materijala koji sačinjava film, debljinu filma, uvjete obrade filma, obojenje konačnog filma (Singh i Singh, 2005).

2.4. POSTUPCI PROIZVODNJE JESTIVIH FILMOVA

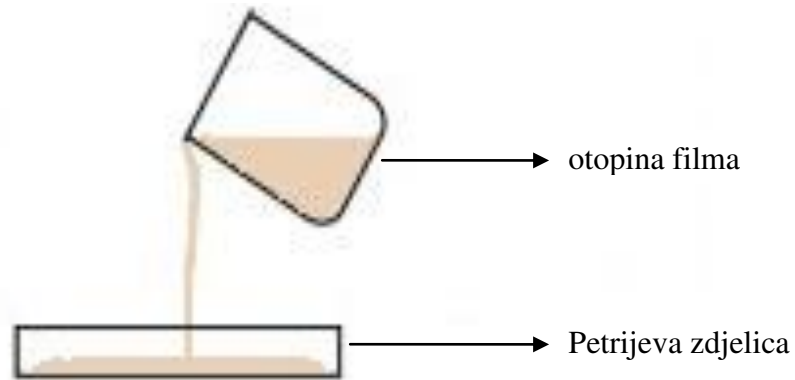
2.4.1. Ekstruzija

Postupak ekstruzije široko je rasprostranjen za proizvodnju konvencionalne komercijalne plastične ambalaže, ali je našao primjenu i kod proizvodnje jestivih filmova. Ekstruzija je kontinuirani, učinkovit i jeftin proces, pogodan za proizvodnju većih količina jestivih filmova (Garcia i sur., 2016). Postupkom ekstruzije smanjuje se utrošak vremena i energije da se ukloni voda u odnosu na postupak lijevanja. Postupak ekstruzije zasniva se na termoplastičnim svojstvima polimera. Prije ekstrudiranja, polimer je pomiješan s plastifikatorima, punilima, stabilizatorima, mazivima i drugim aditivima u cilju dobivanja proizvoda sa željenim svojstvima. S pomoću jednog ili dva vijka postavljenih u cijevi, postupno se povećava tlak i sastojci se guraju prema naprijed i miješaju kroz kalup željeznog oblika, te može doći do ekspanzije. Uspješna primjena ekstruzije mora osigurati potpuno taljenje i dovoljno miješanje da se izbjegne degradacija u svrhu dobivanja homogene taljevine. To se može postići samo pažljivom kontrolom ključnih parametara obrade (brzina uvlačenja, brzina vrtnje, konfiguracija vijka, omjer duljine i promjera vijka, temperatura cijevi, veličina i oblik kalupa) (Garcia i sur., 2016).

2.4.2. Lijevanje otopine jestivog filma

Kod postupka lijevanja, jestivi film se dobiva prelaskom tekuće faze u čvrstu fazu. Tekuća faza je otopina jestivog filma sa odgovarajućom viskoznošću. Kemijske i fizikalne promjene koje se događaju u ovom procesu važne su za konačni izgled filmova. Za vrijeme otapanja makromolekularnih tvari, kohezijske sile između molekula otopine neutraliziraju se molekulama otapala. Što je više polimera, to su jače intermolekulske kohezijske sile i stoga je teže otapanje polimera. Polimeri koji se koriste u proizvodnji jestivih filmova sadrže alifatski polimerni nepolarni lanac s polarnim supstituentima duž lanca. Uvjeti otapanja ovise o karakteristikama funkcionalnih skupina. Kako se funkcionalne skupine na linearnom polimeru ioniziraju tijekom otapanja, nabijene skupine odbijaju jedna drugu. Rezultat tih reakcija je nastajanje izduženih polimernih lanaca. U pravilu, maksimalno otopljen i produljen lanac polimera proizvest će najveću kohezivnost u strukturi filma (Garcia i sur., 2016). Otapanje i produljenje lanca polimera utječe i na viskoznost otopine filma. Viskoznost je koristan parametar tijekom proizvodnje i primjene jestivog filma. Oblikovanje filmova nastaje isparavanjem otapala, budući da su polimerni lanci blisko miješani. Polimerni lanci se međusobno isprepliću, prolaze kroz stanje gela, a konačno se formira membrana filma procesom sušenja. Sušenje se provodi u zračnoj pećnici nekoliko sati. Sadržaj vlage u filmu je

bitan parametar, stoga je poželjno da on bude između 5 i 10% w/v. Struktura filma ovisi o relativnoj temperaturi sušenja, vlažnosti zraka tijekom sušenja, debljini mokrog lijevanja i o sastavu otopine za lijevanje. Lijevanje otopine jestivog filma je najčešće korištena tehnika proizvodnje hidrokoloidnih filmova.



Slika 6. Izlijevanje otopine jestivog filma u Petrijevu zdjelicu

2.4.3. Premazivanje

Postupak premazivanja uključuje razmazivanje otopine za formiranje filma pomoću kista ili valjka na željeni proizvod. Otopina s kojom se premazuje zahtijeva skrućivanje na sobnoj temperaturi ili pomoću zagrijavanja. Premazivanje se pokazalo boljim od postupka uranjanja ili omatanja u smislu smanjenja gubitka vlage u proizvodu koji se želi zaštititi.

2.4.4. Prskanje

Prskanje ili raspršivanje sastoji se od nanošenja otopine filma na podlogu (proizvod) sustavom raspršivanja koji osigurava jednoliku prevlaku s minimalnom količinom vode. Međutim, ovaj postupak zahtijeva okretanje proizvoda da se i donja strana izloži otopini filma. Prskanje je pogodno za otopine filmova male viskoznosti kojom će nastati tanki sloj filma i za proizvode koji imaju veliku površinu.

2.4.5. Uranjanje

Uranjanje je postupak pogodan za proizvode nepravilnih oblika i veličina, te za visoko viskozne otopine filma. Debljina i pokrivenost filmom mogu biti manje jednolični nego kod ostalih postupaka. Ovaj postupak je našao široku primjenu tijekom laboratorijskih analiza mesa i povrća (Donhowe i Fennema, 1994).

2.5. PRIMJENA JESTIVIH FILMOVA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Jestivi filmovi se mogu prilagoditi tako da spriječe promjenu vlažnosti među komponentama u proizvodu i migraciju otapala u hrani kao što su pizze, pite i bomboni (Bourtoom, 2008). Filmovi mogu imati i antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Mogu se koristiti i kod višeslojne ambalaže za pakiranje zajedno sa ne-jestivim filmovima (Bourtoom, 2008) te su u ovom slučaju, jestivi filmovi unutarnji slojevi u izravnom dodiru sa hranom. Većina hidrokolidnih filmova posjeduje izvrsna mehanička svojstva koja su vrlo korisna za krhke prehrambene proizvode. Dobar ambalažni materijal ne samo da može sačuvati kvalitetu hrane nego može i značajno pridonijeti poslovnom profitu.

Postoji nekoliko osnovnih zahtjeva koje jestivi filmovi moraju zadovoljiti kako bi se uspješno primijenili te su prikazani na slici 7.



Slika 7. Osnovni zahtjevi za primjenu jestivih filmova

Glavna svrha pakiranja hrane je postići očuvanje i sigurnu isporuku prehrambenog proizvoda do potrošnje. Tijekom distribucije, kvaliteta proizvoda se može kemijski, biološki i fizički

manjiti. Stoga je cilj ambalaže pridonijeti produljenju roka trajanja, održavanju kvalitete i sigurnosti prehrambenog proizvoda.

Jestivi filmovi također mogu smanjiti grupiranje (aglomeriranje) čestica, poboljšati vizualne i taktilne značajke površine proizvoda (Han i Gennadios, 2005). Također, mogu zaštititi hranu od: migracije vlage, površinskog rasta mikroorganizama, svjetlosno-induciranih kemijskih reakcija, oksidacije hranjivih tvari itd. Najčešće, jestivi filmovi djeluju kao prepreka protiv plinova, vodene pare, ulja, i kao nosioci aktivnih tvari, kao što su antioksidansi, antimikrobni lijekovi, boje i okusi (Han i Gennadios, 2005). Ove zaštitne funkcije usmjerene su na poboljšanje kvalitete prehrambenih proizvoda.

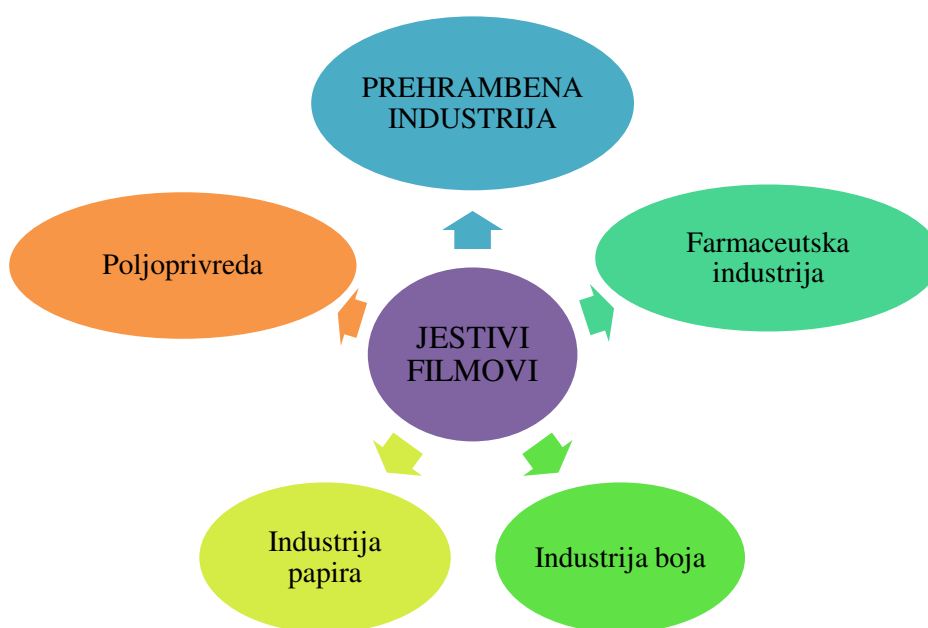
Tablica 2. Primjene jestivih filmova (Galić, 2009)

SVRHA	ŽELJENA KVALITETA	PRIMJENE
Da sadržavaju prethodno odmjerene porcije koje se otapaju u vodi ili toploj hrani	Sposobnost stvaranja kapsula topljivih u vodi	Dehidrirane juhe, instant čajevi ili kava, praškasti napici, začini, zaslađivači
Kontrola migracije otopine, boja, arome unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu i otapala	Heterogeni proizvodi (pite, pizze, kolači), sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Kontrola ravnoteže vlage unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva na vodu	Heterogeni proizvodi (pite, pizze, kolači), sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Osiguranje adhezivnosti smjese za paniranje tijekom prženja	Dobra adhezivnost	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Osiguranje neljepljive i nemasne površine	Ne smije biti ljepljiv	Kockice sira, suho voće, konditorski proizvodi, snack-proizvodi, smrznuti proizvodi (da bi se eliminirala upotreba masnog papira između hamburgera)
Osiguranje strukturalnog integriteta; pojačanje struktura hrane	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Restrukturirani mesni i riblji proizvodi, mehanički otkoštено meso; liofilizirane porcije hrane ili porcija suhe hrane
Poboljšanje izgleda površine hrane	Glatka, sjajna, staklasta površina	Pekarski proizvodi (šećerna i dr. glazure); slastice, orasi, voće srednjeg sadržaja vlage
Poboljšanje mehaničkih svojstava tijekom rukovanja	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Kikiriki, škampi, rakovi, snack-hrana i dr.
Pojačanje boje, arome i okusa hrane (dekorativni efekt)	Dodatak bojila, arome, začina	Različita hrana
Sprečavanje migracije vlage pri nanošenju prevlake maslaca i krušnih mrvica u procesu paniranja	Dobra adhezivnost i niska propusnost na vodu	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Sprečavanje penetracije	Dobra barijerna svojstva na	Usalamureni smrznuti proizvodi

salamure u hranu	vodu i otapala	(škampi, rakovi i sl.)
Usporavanje mikrobnog kvarenja izvana	Dodatak antimikrobnih agenasa	Hrana srednjeg sadržaja vlage
Zaštita od vlage i kisika	Dobra svojstva prevlačenja, niska propusnost na vodenu paru i kisik (mogući dodatak antioksidanata)	Svježa riba, sir, meso, mesni proizvodi; hrana srednjeg sadržaja vlage; suha hrana, orasi, suhi pekarski proizvodi; grickalice
Zaštita većeg broja manjih komada hrane (pakirana u vrećice ili šalice)	Niska propusnost vode; ne smije biti ljepljiv	Sir, procesirane kockice sira, voće srednjeg sadržaja vlage; smrznuta hrana; sladoled; proizvodi veličine jednog zalogaja

Mnoge funkcije jestivih filmova slične su onima sintetičkih filmova za pakiranje. Međutim, primjena jestivih filmova mora biti odabrana prema specifičnoj namirnici, vrsti prehrambenog proizvoda i glavnom mehanizmu smanjenja kvalitete proizvoda (Peterson i sur., 1999). Trenutno, jestivi filmovi imaju primjenu kod nekoliko prehrambenih proizvoda, poput voća, povrća, bombona i nekih orašastih plodova. Voće i povrće obloženo jestivim filmovima imaju veću otpornost na fizička oštećenja (udarci, vibracije) tkiva, odnosno cijelog proizvoda, te im se usporava brzina respiracije. Visoko masno mesni i riblji proizvodi (kobasice i fileti) mogu biti zaštićeni od oksidacija primjenom jestivih filmova. Jestivi filmovi s dobrim barijernim svojstvima na propusnost vlage mogu zaštititi voće i povrće od dehidracije. Također, to svojstvo im omogućava i sposobnost sprečavanja migracije vlage između heterogenih sastojaka hrane, na primjer između grožđica i žitarica za doručak, punila pite i kore, čipsa i tijesta za pečenje, i slično (Han i Gennadios, 2005). Tržište za minimalno procesiranu hranu bilježi značajan rast zadnjih godina, i u skladu s tim postoji potreba za osiguranjem sigurnosti i produljenja roka trajanja tih proizvoda. Jestivi filmovi primijenjeni na konvencionalnim materijalima za pakiranje mogu poboljšati njihova optička svojstva i modificirati njihovu hidrofилnu/hidrofobnu prirodu (Han i Gennadios, 2005). Jestivi biopolimeri mogu se ugraditi u boje na bazi vode kako bi kontrolirali viskoznost boje i svojstva površine boje nakon sušenja (Han i Gennadios, 2005). Jestivi biopolimeri također mogu sadržavati kemikalije, čime se dobiva jača struktura filma s većom otpornošću i većom dugovječnosti. Iako takvi filmovi više nisu jestivi, oni još uvijek čuvaju svoju biološku razgradivost, umanjujući negativan utjecaj na okoliš (Han i Gennadios, 2005). Jestivi filmovi i premazi pronašli su svoju primjenu još u dalekoj prošlosti. Kinezi se u dvanaestom stoljeću prakticirali premazivanje voća voskom kako bi mu produljili rok trajanja. Yuba (skorup sojinog mlijeka) je primjer jestivog filma koji se tradicionalno koristi u Aziji od petnaestog stoljeća, a koristi se za

omatanje i oblikovanje mljevenog mesa ili voća. Osim u prehrambenoj industriji, jestivi filmovi pronašli su primjenu i u farmaceutskoj industriji gdje se koriste za maskiranje nepoželjnih okusa lijekova. Postoji još potencijalnih ne-prehrambenih primjena jestivih filmova, a prikazani su na slici 8.

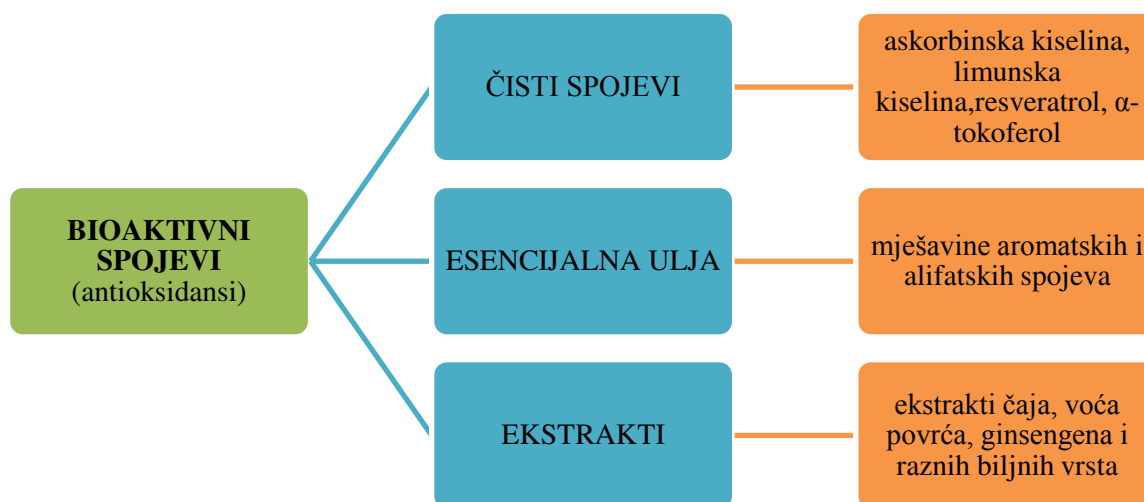


Slika 8. Primjena jestivih filmova u prehrambenim i neprehrambenim industrijama (Han i Gennadios, 2005)

2.6. FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI

Jestivi filmovi mogu služiti i kao nosioci bioaktivnih spojeva te se tako postižu funkcionalna svojstva hrane. Bioaktivni spojevi koji se inkorporiraju u filmove su razni antioksidansi. Prije primjene antioksidansa u filmovima, potrebno je odrediti njegovu antioksidacijsku aktivnost kao i njihov doprinos na određene karakteristike na apliciranoj hrani. Antioksidansi se mogu dodati kao čisti spojevi, esencijalna ulja ili kao ekstrakti. Poznato je da se kao čisti spojevi mogu dodavati askorbinska i limunska kiselina, resveratrol ili tokoferol. Askorbinska kiselina sprječava enzimatsko posmeđivanje voća tako da smanjuje stvaranje kinona koji nastaju djelovanjem enzima polifenol oksidaze. Dodatak resveratrola, α -tokoferola, vanilina, propil galata, fenola i natrijevog tripolifosfata pozitivno utječe na smanjenje lipidne peroksidacije. Funkcionalni jestivi filmovi s dodanim čistim antioksidansima produljuju rok trajanja hrane

koja je sklona oksidaciji. Esencijalna ulja su aromatična i pokazuju antimikrobna svojstva. Većina tih ulja mješavina je terpena, fenolnih kiselina te ostalih aromatskih i alifatskih spojeva. Sastav eteričnih ulja varira ovisno o vrsti ulja. Dodatkom esencijalnih ulja smanjuje se lipidna peroksidacija i produljuje se rok trajanja proizvoda. Esencijalna ulja su hidrofobne prirode, što im daje svojstvo poboljšanja zaštite od propusnosti vodene pare.



Slika 9. Bioaktivni spojevi korišteni u proizvodnji funkcionalnih filmova

Ekstrakti koji se dodaju jestivim filmovima mogu biti ekstrakt čaja, voća, povrća, ginsenga i drugih biljnih vrsta. Prema podacima iz znanstvenog rada Gómez-Estaca i suradnika (2007), filmovi obogaćeni origanom ili ekstraktom ružmarina uspješni su usporiti lipidnu oksidaciju na primijenjenom proizvodu (hladno dimljena riba). Primjenom ekstrakata pojačavaju se antioksidacijska svojstva filmova, poboljšava se kvaliteta i produljuje rok trajanja proizvoda te se usporava oksidacija lipida. U pravilu, antioksidacijski kapacitet filmova proporcionalan je količini dodanih bioaktivnih spojeva (Eça i sur., 2014).

Tablica 3. Pregled znanstvenih istraživanja o dobivanju jestivih filmova s inkorporiranim bioaktivnim sastojcima

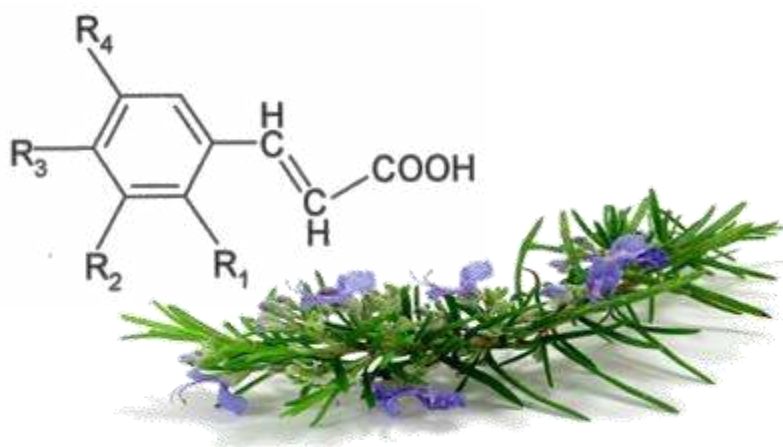
Materijal	Dodani sastojak	Referenca
Alginat	askorbinska i limunska kiselina	Robles-Sánchez i sur., 2013.
	ekstrakt ginsenga	Norajit i sur., 2010.
	Kalcij	Koushki i sur., 2015.

		Olivas i Barbosa-Canovas, 2008.
	pire jabuke	Rojas-Graù i sur., 2008.
	ulje češnjaka	Pranoto i sur., 2005.
	ulje origana	Benavides i sur., 2012.
Kitozan	α -tokoferol	Blanco-Fernandez i sur., 2013.
	celuloza	Hasegawa i sur., 1994.
	ekstrakt galangana	Mayachiew i sur., 2010.
	ekstrakt indijskog ogrozda	Mayachiew i sur., 2010.
	origano	Gómez-Estaca i sur., 2007.
	ekstrakt ružmarina	Gómez-Estaca i sur., 2007.
	esencijalno ulje lista cimeta, oleinska kiselina	Perdones i sur., 2014.
	kolagen	Zhang i sur., 1997.
	laktoferin	Brown i sur., 2008.
	oleinska kiselina	Vargas i sur., 2009.
	ulje cimeta	Xing i sur., 2011.
	želatina	Arvanitoyannis i sur., 1998.
	Pektin	instant zeleni čaj
		Ayala-Zavala i sur., 2013.
ulje lista cimeta		Melgarejo-Flores i sur., 2013.
Proteini sirutke		Mate i Krochta, 1996.

2.7. RUŽMARIN KAO IZVOR FUNKCIONALNIH SASTOJAKA

Velika pozornost među ljekovitim biljnim vrstama i začinima kao izvorima antioksidansa već nekoliko godina usmjerena je na ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.). Ružmarin je aromatična biljka koja ima dugu povijest upotrebe u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu kao začim, mijenjajući organoleptička svojstva hrane. Antioksidacijska aktivnost ružmarina zasniva se na karnozinskoj kiselini, karnozolu i ružmarinskoj kiselini, koji spadaju u skupinu polifenola. Osim navedenih spojeva, antioksidacijskoj aktivnosti ružmarina doprinose i druge komponente ružmarina kao što su karnozol kinon, neki flavonoidi, rozmanol, epiisorozmanol,

epirozmanol, rozmadial, metil karnozat. Svi ti spojevi su bioaktivni spojevi koji su našli primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zahvaljujući svojim pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka. Pokazalo se da bioaktivni spojevi ružmarina mogu djelovati protuupalno, antitumorski, kao i blagotvorno protiv neuroloških i metaboličkih poremećaja. Zadnjih godina povećan je interes za korištenjem prirodnih antioksidansa, među kojima je i ružmarinska kiselina. Prirodni antioksidansi zamjenjuju potencijalno toksične antioksidanse, poput propil galata, butirilan hidroksitoluena (BHT) i butirilan hidroksianisola (BHA) (Erkan i sur., 2008). Esencijalno ulje ružmarina sadrži komponente, kao što su 1-8-kineol, kamfor, α -pinen ili borneol, a također su povezane sa biološkim aktivnostima, ponajprije sa antioksidacijskim i antimikrobnim.



Slika 10. Grančica ružmarina, *Rosmarinus officinalis* L. te kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina karakterističnih za ružmarin (Anonymous 5, 2012; Macheix i sur., 1990)

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovom radu kao materijali za proizvodnju jestivih filmova korišteni su prirodni biopolimeri: kitozan (Acros organic, SAD), pektin (Cargill, Njemačka), alginat (Sigma-Aldrich, SAD) i proteini sirutke (Davisco Foods International, SAD) te ekstrakt ružmarina kao izvor bioaktivnih sastojaka za obogaćivanje filmova. Sušeni listovi i stabljika ružmarina kupljeni su od tvrtke Suban d.o.o., koji su ubrani tijekom 2015. godine u obalnom području Hrvatske.

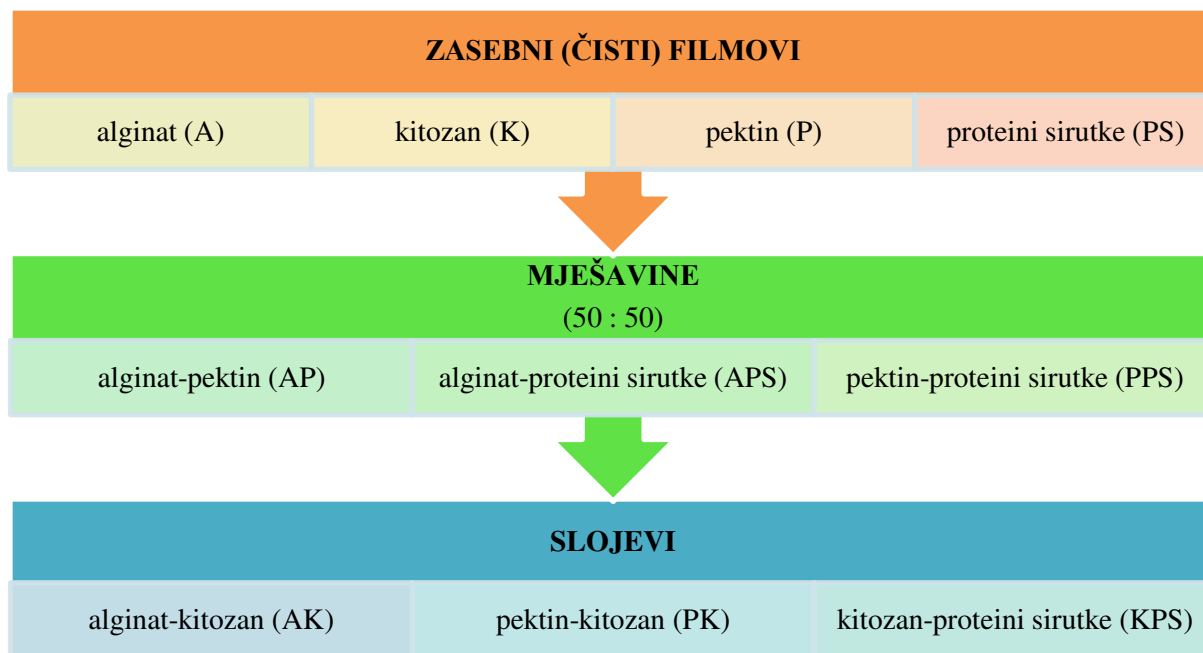
3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema ekstrakata ružmarina

Sušeni biljni materijal usitnjen je pomoću mlinca za domaćinstvo do veličine praškastog stanja te prosijan kroz sito veličine otvora 500 μm kako bi se postigla ujednačena veličina čestica. Ekstrakcija biljnog materijala provedena je miješanjem 20 g biljnog materijala s 500 mL destilirane vode prethodno zagrijane do 80 °C. Postupak ekstrakcije proveden je tijekom 30 min, nakon čega se uzorak profiltrira pomoću sita za čaj (gruba filtracija) te zatim primjenom vakuum sisaljke uz filter papir Whatman br.4.

3.2.2. Priprema jestivih filmova

Za formiranje filmova korištene su četiri vrste polimernih hidrokolooidnih materijala: kitozan (K), pektin (P), alginat (A) i proteini sirutke (PS) uz dodatak glicerola kao plastifikatora. Osim zasebnih, čistih filmova ovih materijala proizvedeni su filmovi dobiveni kombinacijom ovih materijala, i to kao mješavine ili slojevi, a kako je prikazano na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz dizajna eksperimentalnog dijela rada i uzoraka

Za proizvodnju filmova u staklene čaše odvažuje se određena količina hidrokolooidnih praškastih materijala kako bi se pripremile: 3% (w/v) otopine kitozana i pektina, 4% (w/v) otopina alginata te 5% (w/v) otopina proteina sirutke. Za pripremu filmova, odvagana količina biopolimera prelivena je prethodno pripremljenim ekstraktom ružmarina, dok su za pripremu kontrolnih filmova s navedenim materijalima suspenzije istih koncentracija pripremljene u destiliranoj vodi. U slučaju filmova s kitozonom pH otopine podešen je na 3,00 dodatkom octene kiseline. Pri toj pH vrijednosti moguće je potpuno otapanje kitozana. Proteine sirutke denaturiramo na 70°C, zatim hladimo 10 min te su kao takvi spremni za daljnji proces proizvodnje jestivih filmova od proteina sirutke. Nakon miješanja pripremljenih otopina na magnetskoj miješalici tijekom 12h, svim otopinama dodano je 1% (w/v) glicerola (plastifikatora), te je provedena homogenizacija na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi te kratkotrajno odzračivanje otopina (15 sek) u ultrazvučnoj kupelji kako bi se uklonili eventualno nastali mjehurići zraka.

U slučaju mješavina dvaju polimera pripremljene su mješavine omjera dvaju nosača 50 : 50, w/w, jednostavnim miješanjem dviju otopina, dok se u slučaju proizvodnje filmova u slojevima također zadržao jednak omjer materijala (50:50, w/w), odnosno, prvo je nanesen sloj jednog polimera nakon čega je nanesen sloj drugog polimera iste težine.

Iz ovako pripremljenih otopina formirani su filmovi lijevanjem u Petrijeve zdjelice (unutarnji promjer = 11,7 cm). U svaku Petrijevu zdjelicu izlijevano je 20 mL uzorka pomoću staklene pipete na analitičkoj vagi te je konačna masa svih Petrijevih zdjelica ujednačena kako bi se osigurala homogenost i jednoličnost filmova. U slučaju formiranja filmova u slojevima izlijevano je najprije 10 mL jednog polimera nakon čega je lijevano 10 mL drugog polimera. Nakon izlijevanja otopina, Petrijeve zdjelice se postave na ravnu površinu i filmovi se suše na temperaturi od 30°C tijekom 72 sata. Nakon sušenja, filmovi se uklanjaju iz Petrijevih zdjelica pomoću špatule i čuvaju u eksikatorima s osiguranim kontroliranim uvjetima vlage do analize.

3.2.3. Karakterizacija filmova

3.2.3.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari)

Udio vode i suhe tvari određen je gravimetrijskom metodom (određivanjem mase prije i nakon sušenja uzorka na 105°C do konstantne mase) prema AOAC metodi (1995).

Aparatura i pribor:

- 1) staklena čaša volumena 100 mL
- 2) aluminijske posude
- 3) magnetska miješalica
- 4) staklene pipete volumena 10 mL
- 5) pinceta, špatula
- 6) analitička vaga
- 7) sušionik
- 8) eksikator

Postupak rada:

Udjel vode odnosno suhe tvari određivan je u ekstraktu ružmarina te formiranim filmovima. U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s izarenim kvarcnim pijeskom izvaže se oko 5,00 g ekstrakta ili 1,00 g filmova na analitičkoj vagi. Nakon vaganja posudice s uzorcima suše se u sušioniku na 105°C do postizanja konstante mase. Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru,

posudice s osušenim uzorcima se ponovo važu na analitičkoj vagi. Sva mjerenja provedena su u paraleli a udjel vode i suhe tvari u ekstraktima i jestivim filmovima računa se pomoću jednadžbi:

$$\begin{aligned} \text{Voda (\%)} &= ((m_0 + m_1) - m_2) / m_1 * 100 \\ \text{Suha tvar (\%)} &= 100 - \text{Voda (\%)} \end{aligned}$$

[6]

gdje su:

m_0 - masa aluminijske posudice

m_1 - masa uzorka

m_2 - masa aluminijske posudice i uzorka nakon sušenja

3.2.3.2. Određivanje topljivosti filmova u vodi

Topljivost filmova u vodi određena je gravimetrijski metodom prema postupku Rangel-Marrón i suradnika (2013).

Aparatura i pribor:

- 1) aluminijska posudica za određivanje udjela suhe tvari
- 2) analitička vaga
- 3) pipete volumena 10 mL
- 4) sušionik
- 5) eksikator

Postupak rada:

Filmovi prethodno osušeni na 105°C izvagani su te su pektinski, kitozanski, alginatni te filmovi od proteina sirutke suspendirani u 30 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi, dok su kitozanski filmovi suspendirani u istom volumenu vode zakiseljene octenom kiselinom (pH=2). Nakon 24 h miješanja na magnetskoj miješalici (200 rpm), filmovi se uklanjaju iz otopine, a oko 5,00 g dobivene otopine izvaže se u osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu. Nakon vaganja lončići s uzorcima se suše na 105 °C do postizanja konstantne mase, hlade i ponovno se zabilježi masa. Sva mjerenja provedena su u paraleli.

Topljivosti filmova u vodi računa se pomoću jednadžbe:

$$\text{Topljivost u vodi (\%)} = ((m_0 + m_1) - m_2) / m_1 * 100$$

[7]

gdje su:

m_0 - masa aluminijskog lončića

m_1 - masa uzorka

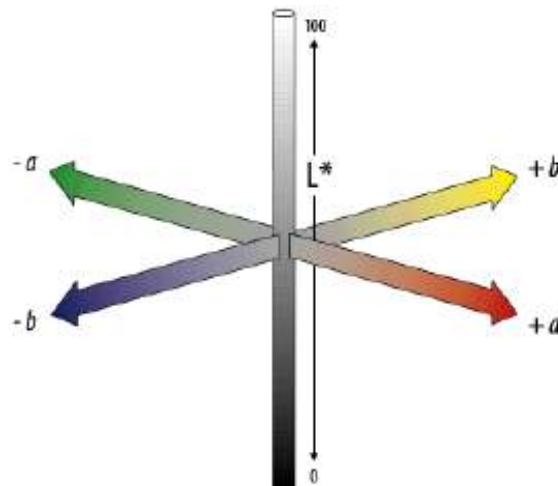
m_2 - masa aluminijskog lončića i uzorka nakon sušenja

3.2.3.3. Određivanje debljine filmova

Debljina filmova određena je pomoću digitalnog mikrometra (Helios-Preisser Digital Micrometer, Type 40 EX, Njemačka). Za svaki film debljina je određena na nekoliko različitih mjesta (min. 6) te u sredini filma, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost s pripadajućom devijacijom (μm).

3.2.3.4. Određivanje boje

CIE $L^*a^*b^*$ prostorni model boja je trodimenzionalni sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja u kojima su sudjelovali ljudi dobrog vida bez deformacije viđenja boja. Koordinate CIELAB sustava boja temelje se na Heringtonovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava.



Slika 12. CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja (Petrović i sur., 2013)

Raspon boja je crveno-zeleno za os a, raspon boja žuto-plavo za os b, te akromatska os L sa vrijednosti u rasponu od 0% (crna) do 100% (bijela). Brojčane vrijednosti u CIE L*a*b* kolornom sustavu prikazuju sve boje koje ljudsko oko može percipirati (Petrović i sur., 2013).

Postupak rada:

Boja jestivih filmova određena je pomoću kolorimetra pri čemu su dobivene L*, a* i b* vrijednosti. Za svaki pojedinačni film mjerenje je provedeno na nekoliko različitih mjesta, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom devijacijom. Rezultati se izražavaju kao vrijednost kolorimetrijske razlike (ΔE) (Petrović i sur., 2013). Kolorimetrijska razlika opisuje kvalitetu reprodukcije, odnosno pokazuje odstupanje reprodukcije od originala. Odstupanje boja može se provesti na osnovu vrijednosti kolorimetrijske razlike prema slijedećim kriterijima:

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

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

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

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

$\Delta E > 6$ = očigledna odstupanja boje

Vrijednost kolorimetrijske razlike se izračunava pomoću jednadžbe:

$$\begin{aligned} \Delta E &= \Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2 \\ \Delta L &= L_0 - L_1 \\ \Delta a &= a_0 - a_1 \\ \Delta b &= b_0 - b_1 \end{aligned} \quad [8]$$

gdje su:

L₀, a₀, b₀- vrijednosti referentne boje prema kojoj se mjeri odstupanje

L₁, a₁, b₁- vrijednosti ispitivanoga uzorka boje (Petrović i sur., 2013)

3.2.4. Određivanje bioaktivnog sastava jestivih filmova

Za određivanje bioaktivnog sastava filmova pripremljene su otopine svih uzoraka filmova u vodi, otapanjem 5 g filmova u 30 mL destilirane vode te miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom 24 h. U uzorke kitozanskih filmova dodana je octena kiselina u svrhu podešavanja odgovarajuće pH vrijednosti pri kojoj su ti filmovi topljivi u vodi. Dobivene otopine svih

filмова su nakon otapanja i pripreme ekstrakata centrifugirane na 5000 okretaja/min tijekom 5 min te je za analize korišten samo bistri supernatant.

3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibden i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari iz uzorka ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid, koji su plavo obojeni. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri 765 nm kroz 1 sat. Kao standard se koristi galna kiselina.

Reagensi:

- 1) Folin- Ciocalteu reagens (razrijeđen vodom u omjeru 1:2)
- 2) 20 %- tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Aparatura i pribor:

- 1) staklene epruvete
- 2) stalak za epruvete
- 3) pipete volumena 10 mL
- 4) mikropipete volumena 100 μL i 500 μL
- 5) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 6) spektrofotometar

Postupak rada:

U epruvetu se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 50 μL uzorka, 2,50 mL Folin-Ciocalteu reagens i 7,5 mL 20%-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20%-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja spektrofotometrijski na 765 nm. Istodobno sa uzorcima priprema se i slijepa proba, na isti način kao i uzorci samo što umjesto uzorka sadrži 50 μL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg

ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g čestica. Udio ukupnih polifenola računa se pomoću jednadžbe:

$$y = 0,001x - 0,0001$$

[9]

gdje su:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 765 nm

x- koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

3.2.4.2. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

ABTS metoda se temelji na redukciji plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. U ovom radu oksidacija otopine ABTS-a provodi se otopinom kalijevog persulfata. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti korištenog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Udjel reduciranog ABTS radikala antioksidansima izražava se kao funkcija koncentracije i vremena, te se mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala spektrofotometrijski na 734 nm. Dobiveni udjel reduciranog ABTS radikala uspoređuje se sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima. Protokol za primjenjivanje ove metode preuzet je iz originalnog rada Re i suradnika (1999).

Reagensi

- 1) etanol (96 %- tni)
- 2) 140 mM otopina kalijevog peroksodisulfata ($K_2S_2O_8$)
- 3) 7 mM otopina 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin- 6- sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS)
- 4) 6- hidroksi- 2,5,7,8- tetrametilkroman- 2- karboksilna kiselina (Trolox)

Aparatura i pribor

- 1) odmjerna tikvica volumena 100 mL
- 2) epruvete

- 3) stalak za epruvete
- 4) pipete volumena 0-10 mL
- 5) mikropipeta volumena 0-100 μL
- 6) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 7) spektrofotometar

Postupak rada

Otopina ABTS radikal-kationa priprema se oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 nM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μL 140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata te nadopuniti sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Pripremljenu otopinu potrebno je omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (min. 12-16 h), jer ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 pa neće doći do potpune oksidacije. Nakon odstajanja, otopina se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS radikal-kationa od 1%, tako da apsorbancija pripremljene otopine iznosi $0,7 \pm 0,2$. Alikvot od 40 μL uzorka pomiješa se u epruveti s 4 mL ABTS radikal-kationom, te se nakon 6 minuta spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 734 nm. Mjerenja se rade u dvije paralele za svaki uzorak, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Također se priprema i slijepa proba u koju umjesto uzorka dodajemo 40 μL destilirane vode. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔE , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Konačni antioksidacijski kapacitet u ispitivanim uzorcima izračunava se pomoću baždarnog pravca konstruiranog za standard Trolox-a (10) koji prikazuje ovisnost apsorbancije (ΔA) o koncentraciji standarda (mg L^{-1}):

$$y = 0,303x + 0,0006$$

[10]

gdje su:

x- antioksidacijski kapacitet uzorka ($\text{mmol Trolox-a L}^{-1}$)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm

3.2.4.3. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Protokol za ovu metodu preuzet je iz originalnog rada Matkowski i suradnika (2008). Metoda je preuzeta iz Poljske farmakopeje (6.izd., 2005), a korištena je za određivanje hidroksicimetnih kiselina u listu maslačka.

Reagensi:

- 1) 0,5 M HCl
- 2) Arnnow reagens- 10 % w/v vodena otopina natrijevog nitrita i natrijevog molibdata
- 3) 8,5 % vodena otopina natrijevog hidroksida

Aparatura i pribor

- 1) odmjerna tikvica volumena 300 mL
- 2) epruvete
- 3) stalak za epruvete
- 4) pipete volumena 0- 10 mL
- 5) mikropipete volumena 0- 100 μ L
- 6) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 7) spektrofotometar

Postupak rada

Uzorak volumena od 1 mL pomiješan je u epruveti sa 2 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2 mL Arnnowa reagensa, 2 mL otopine NaOH, te je dopunjen destiliranom vodom do 10 mL. Paralelno se priprema i slijepa proba koja sačinjava sve kao i pripremljena otopina za mjerenje, osim što se umjesto uzorka koristi 1 mL destilirane vode. Također, pripremaju se i dvije paralele svakog uzorka. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrom netom nakon pripreme otopine za mjerenje na 490 nm. Udjel hidroksicimetnih kiselina izražen je kao postotak uzevši u obzir apsorbanciju kafeinske kiseline, a izračunava se prema jednadži:

$$y = 0,0025x + 0,0054$$

[11]

gdje su:

x – koncentracija otopine kafeinske kiseline (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm

3.2.4.4. Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova

Otpuštanje bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova praćeno je izuzimanjem alikvota uzoraka iz odgovarajućeg medija u određenim vremenskim razmacima (0-24h). Kao medij za otpuštanje korištena je simulacijska otopina gastrointestinalnog trakta pri niskom pH (pH= 2,0). Kao parametri kojima se određivala kinetika otpuštanja mjereni su udjel ukupnih polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom te antioksidacijski kapacitet ABTS metodom. Za određivanje kinetike otpuštanja, približno 0,5 g usitnjenih filmova suspendira se u 30 mL medija. Čestice su konstatno miješane na magnetskoj miješalici (podešenoj na 100 rpm) te se u određenim vremenskim razmacima iz otopine izuzima po 2 mL tekućine. Uzorci se dalje uzimaju u određenim vremenskim razmacima do posljednjeg uzorkovanja u 24 satu. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet pomoću prethodno navedenih metoda a rezultati se izražavaju kao mg GAE/g filma ili mmol Trolox/g filma.

3.2.5. Senzorska analiza

Senzorsko ocjenjivanje filmova provedeno je primjenom hedonistićke bodovne ljestvice, s ocjenama od 1-10, prema kojoj 10 oznaćava izrazito poželjnu kvalitetu, a 1 oznaćava defektan proizvod. U senzorskom ocjenjivanju sudjelovalo je 30 panelista, djelatnika i studenata Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta (podjednak broj osoba mušskog i ženskog spola, starosti između 25 - 40 godina) (Ozdemir i Floros, 2008).

Panelisti su prije samog ocjenjivanja raspravljali i upoznavali se sa sličnim uzorcima te sa skalom intenziteta, dok se nije postigao dogovor oko senzorskih atributa koji će biti ocjenjivani te njihove kvantifikacije. Uzevši u obzir prethodna iskustva panelista i znanstvene radove iste tematike, izabrani su atributi koji su se činili najpogodnijima za senzorsku karakterizaciju uzoraka.

Senzorskom analizom ocjenjivani su: izgled, boja, transparentnost, elastićnost i prihvatljivost. Rezultati senzorskog ocjenjivanja prikazani su kao srednja vrijednost i pripadajuća devijacija za svako ocjenjivano svojstvo.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proizvedeni su funkcionalni jestivi filmovi primjenom prirodnih biopolimera: alginata, kitozana, pektina i proteina sirutke te njihovih kombinacija u ekstraktu ružmarina kao izvoru funkcionalnih, bioaktivnih sastojaka. U svrhu poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava jestivih filmova uz čiste zasebne filmove svakog pojedinog biopolimera pripremljene su i kombinacije biopolimera kao mješavina: alginata i pektina (AP), alginata i proteina sirutke (APS) i pektina i proteina sirutke (PPS), te kao slojevi biopolimera: alginata i kitozana (AK), pektina i kitozana (PK) i kitozana i proteina sirutke (KPS). U ovom poglavlju prikazani su rezultati karakterizacije fizikalno-kemijskih, senzorskih svojstava te bioaktivnog sastava formuliranih filmova.

Osnovna fizikalno-kemijska svojstva (udjel suhe tvari (udjel vode), topljivost filmova u vodi te debljina filmova) prikazana su u tablici 4. Boja jestivih filmova ispitana je CIE $L^*a^*b^*$ prostornim modelom, a rezultati mjerenja prikazani su u tablici 5. Spektrofotometrijskim metodama određen je bioaktivni sastav formuliranih filmova i to; udjel ukupnih polifenola (FC metoda), udjel hidroksicimetnih kiselina (metoda za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina) i antioksidacijski kapacitet (ABTS metoda). Udjel ukupnih polifenola prikazan je na slici 16, udjel hidroksicimetnih kiselina na slici 17, te antioksidacijska aktivnost na slici 18. Provedena su i otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta filmova proizvedenih od zasebnih (slike 19 i 20), mješavina (slike 21 i 22) te slojeva biopolimera (slike 23 i 24) u vodi. Senzorska karakterizacija jestivih filmova koristeći hedonističku bodovnu ljestvicu, prikazana je na slici 25 a), b) i c).

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA FORMULIRANIH FILMOVA

Tablica 4. Udjel vode i suhe tvari, debljina te topljivost formuliranih filmova u vodi

Uzorci		Suha tvar (%)	Udjel vode (%)	Debljina filmova (μm)	Topljivost u vodi (%)
Zasebni filmovi	A	86,40 \pm 0,11	13,60 \pm 0,11	158,25 \pm 16,092	52,49 \pm 1,69
	P	86,00 \pm 2,03	14,00 \pm 2,03	173,25 \pm 31,46	41,60 \pm 13,08
	K	83,41 \pm 0,63	16,59 \pm 0,63	133,75 \pm 19,37	9,46 \pm 3,56
Mješavine	PS	85,40 \pm 1,54	14,60 \pm 1,54	135,75 \pm 19,45	17,09 \pm 5,96
	AP	85,04 \pm 3,37	14,96 \pm 3,37	288,25 \pm 11,48	42,78 \pm 12,48
	APS	82,26 \pm 3,09	17,74 \pm 3,09	241,33 \pm 20,39	28,51 \pm 6,44
	PPS	85,31 \pm 0,81	14,69 \pm 0,81	211,38 \pm 10,73	25,27 \pm 11,56
	KPS	84,90 \pm 3,72	15,10 \pm 3,72	214,13 \pm 19,30	24,45 \pm 18,60
Slojevi	AP	84,37 \pm 1,55	15,63 \pm 1,55	183,46 \pm 20,86	69,20 \pm 2,84
	PK	83,72 \pm 0,22	16,28 \pm 0,22	159,88 \pm 25,34	59,08 \pm 5,38
	KPS	86,44 \pm 0,41	13,56 \pm 0,41	190,63 \pm 30,98	42,46 \pm 0,54

Udjel vode u svim formuliranim filmovima kretao se u rasponu od 13,56 do 17,74 %. Između filmova proizvedenih od zasebnih, mješavina i slojeva biopolimera nisu uočene značajne razlike u udjelu vode, odnosno, suhe tvari. Promatrajući filmove proizvedene od zasebnih biopolimera najveći udjel suhe tvari pokazali su alginatni filmovi (86,40 %), dok najmanji udjel pokazuju filmovi formirani od mješavina biopolimera alginata i proteina sirutke (82,26 %). Posljedično, ti filmovi imaju najmanji (13,60 %), odnosno najveći udjel vode (17,74 %). Kod filmova proizvedenih od slojeva biopolimera, kombinacija kitozan-proteini sirutke pokazuju najveći udjel suhe tvari (86,44 %), tako da imaju i najmanji udjel vode (13,56 %). S obzirom na nedostatak jednolikog trenda u udjelu vode odn. suhe tvari, nije moguće izvesti zaključak o utjecaju pojedinog biopolimera na zadržavanje vode te filmogena svojstva proizvedenih filmova.

U istraživanju kitozanskih filmova sa dodatkom bioaktivnih spojeva laktoferina, koncentrata proteina sirutke i glikomakropeptida, Bourbon i suradnika (2011) došli su do zaključka da dodatak bioaktivnih spojeva povećava udjel vode u jestivim filmovima, pri čemu su vrijednosti iznosile 14,11- 15,53%. Film proizveden od zasebnog biopolimera kitozana sadržavao je 12,72% vode. Pošto je količina vode pokazatelj hidrofilnosti, a ona je veća što je veći sadržaj vlage (Bourbon i sur., 2011), jasno je da dodatkom bioaktivnih spojeva dolazi i do povećanja količine vode u jestivim filmovima. U usporedbi s ovim rezultatima, filmovi proizvedeni u ovom radu imaju neznatno veće vrijednosti udjela vode nego u istraživanju Bourbona i suradnika (2011), što može biti posljedica vrste i udjela primijenjenog plastifikatora te načina sušenja filmova.

Debljina filmova prema dobivenim rezultatima u značajnoj je ovisnosti o vrsti primijenjenog biopolimera. Kod filmova proizvedenih od zasebnih biopolimera najveću debljinu pokazuju pektinski filmovi (173,25 μm), dok kitozanski pokazuju najmanju vrijednost debljine (133,75 μm). Prema istraživanju Benavidesa i suradnika (2012), filmovi proizvedeni od zasebnog biopolimera alginata sa dodatkom esencijalnog ulja sa origanom kao izvorom bioaktivnih sastojaka imali su debljinu u rasponu od 36 do 42 μm . U usporedbi s rezultatima Benavidesa i suradnika (2012) filmovi proizvedeni u ovom radu značajno su veće debljine, što može biti posljedica kao i prije navedene vrste i udjela primijenjenog plastifikatora te prvenstveno konačne primjene filmova koja diktira njihova osnovna fizikalno-kemijska svojstva. Prema dobivenim rezultatima, filmovi formulirani od mješavina biopolimera posjeduju najveću debljinu sa vrijednostima $> 200 \mu\text{m}$. Filmovi formirani od mješavine alginata i pektina pokazali su najveću debljinu (288,25 μm) među svim formiranim filmovima. Formuliranjem

filmova od slojeva biopolimera, dobiveni su filmovi manje debljine, u rasponu od 159,88 μm za filmove od slojeva pektina i kitozana (PK) do 190,63 μm za filmove od slojeva kitozana i proteina sirutke (KPS). Usporedbom različitih biopolimera te njihovih kombinacija, pokazalo se da primjena pektina doprinosi debljini filmova, dok su filmovi formirani od kitozana općenito najmanje debljine, bilo zasebno ili u kombinacijama.

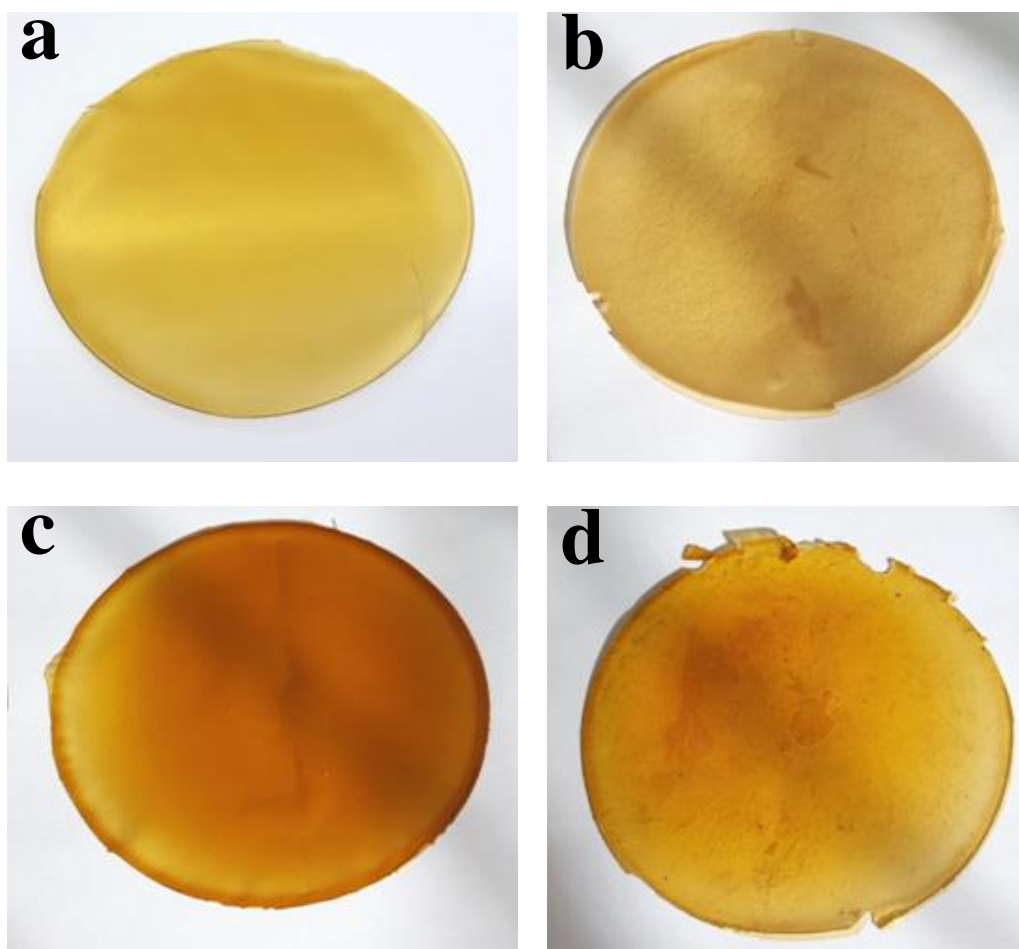
Analizirajući rezultate topljivosti u vodi jestivih filmova vidljive su značajnije razlike u vrijednostima u odnosu na vrijednosti za suhu tvar (udjel vode) i debljinu. Najveću topljivost u vodi kod čistih filmova pokazuju filmovi od alginata (52,49 %), dok najmanju pokazuju kitozanski filmovi (9,46 %). U istraživanju Bourbona i suradnika (2011) ispitana je i topljivost formuliranih filmova te se i ona pokazala većom kod filmova sa dodatkom bioaktivnih spojeva (43,89- 47,11 %) u odnosu na filmove proizvedene od zasebnog biopolimera kitozana (42,05 %). Zasebni, čisti kitozanski filmovi proizvedeni u ovom radu imali su značajno manju topljivost (9,56%), koja se kombinacijom s drugim biopolimerima povećavala. Kod filmova formuliranih od slojeva biopolimera, alginat-kitozanski filmovi najviše su topljivi u vodi (69,20 %), dok su kitozan-proteinski najmanje topljivi (42,46 %). Promatrajući filmove formirane kao mješavine, najveću topljivost pokazali su filmovi formulirani od mješavine alginata i pektina (42,78 %), a najmanju topljivost pokazuju filmovi formulirani od mješavine kitozana i proteina sirutke (24,45 %). Uspoređujući dobivene vrijednosti među formiranim skupinama filmova, vidljivo je da su čisti filmovi od kitozana i proteina sirutke, te filmovi formulirani kao mješavine i slojevi s ova dva biopolimera manje ili najmanje topljivi u vodi. Nadalje, filmovi formulirani od alginata, bilo čisti, mješavine ili slojevi, najviše su topljivi u vodi. Poznavanje topljivosti ovih filmova iznimno je bitno zbog njihove konačne primjene te postizanja odgovarajućih barijernih svojstava prema vanjskim utjecajima u doticaju s proizvodom. Prema dobivenim rezultatima, primjena alginatnih filmova preporučljiva je za proizvode koji se ispiru ili su u kontaktu s vodom te se predviđa njihovo uklanjanje s proizvoda, dok su kitozanski filmovi otporniji te namijenjeni proizvodima s potrebnim izraženijim barijernim svojstvima prema vodi.

Tablica 5. Kolorimetrijski parametri boje formuliranih filmova

Uzorci		L^*	a^*	b^*	ΔE	Svjetlina	Opalescencija
Zasebni filmovi	A	23,69±0,66	0,21±0,10	5,62±0,22	5,17±0,22	3,16±0,15	11,47±0,39
	P	29,80±0,73	0,10±0,44	8,28±1,16	8,36±1,20	4,55±0,39	11,94±0,89
	K	18,68±1,24	2,09±0,32	6,43±1,42	107,78±5,77	2,34±0,05	13,56±2,21
	PS	23,89±1,44	0,59±0,96	9,76±0,33	86,84±7,02	1,56±0,09	9,44±2,11
Mješavine	AP	28,14±0,90	0,17±0,22	7,57±0,12	51,01±0,71	4,65±0,01	12,13±1,45
	APS	35,56±0,02	1,93±0,25	16,24±0,22	353,83±8,52	2,40±0,55	32,31±0,98
	PPS	31,24±1,00	1,03±0,17	11,33±0,68	130,12±9,13	1,95±0,26	16,54±1,09
	KPS	14,87±0,14	1,33±0,18	9,71±0,81	201,03±12,12	1,06±0,06	6,35±0,27
Slojevi	AK	15,68±6,51	3,10±0,63	7,32±1,13	13,23±5,42	1,56±1,20	12,86±8,86
	PK	27,01±3,85	3,76±2,26	10,88±7,19	10,71±8,07	3,60±1,63	23,40±8,77
	KPS	18,54±8,91	2,62±1,40	10,86±1,56	14,03±6,28	1,94±1,67	9,42±4,27

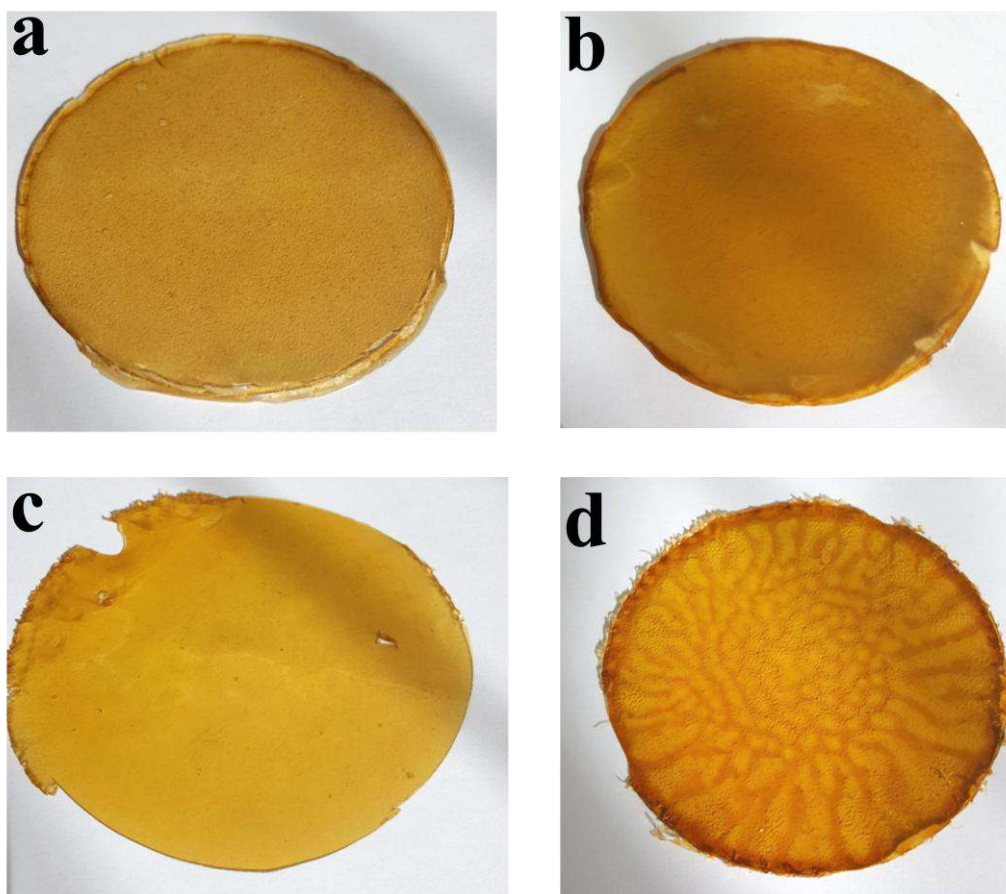
Rezultati ispitivanja kolorimetrijskih parametara na svim formuliranim uzorcima u ovom radu prikazani su u tablici 5. Dobivene vrijednosti za parametre L^* , a^* i b^* značajno se razlikuju za različito formulirane filmove, odnosno ovisno o načinu formiranja filмова (zasebni, mješavine ili slojevi biopolimera). Općenito, filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera pokazali su veće vrijednosti svjetline L^* , u odnosu na zasebne i filmove u slojevima. Filmovi proizvedeni od mješavine biopolimera alginat-pektin pokazali su najveću L^* vrijednost (35,56), što prema definiciji ovog parametra ukazuje da od svih ispitivanih filмова sadrže najviše blijedo-žute boje. Najmanja L^* vrijednost određena je za filmove koji u sastavu sadrže kitozan, pri čemu se posebice ističu filmovi proizvedeni od mješavine biopolimera u kombinaciji kitozan-proteini sirutke (14,87). Filmovi proizvedeni od slojeva biopolimera pokazuju najveće vrijednosti parametra a^* u odnosu na filmove proizvedene od zasebnih i mješavina biopolimera. Najveću vrijednost za spomenuti parametar pokazali su filmovi proizvedeni od slojeva biopolimera u kombinaciji pektin-kitozan (3,76) te se tako pokazali kao filmovi sa najzastupljenijom crvenom komponentom boje. Najmanju zastupljenost crvene boje pokazali su filmovi proizvedeni od zasebnog biopolimera pektina (0,10). Parametar b^* koji označava zelenu komponentu boje najprisutniji je kod filмова proizvedenih od mješavine biopolimera u kombinaciji alginat-proteini sirutke (16,24), te je općenito nešto veći za filmove proizvedene u slojevima. Prema dobivenim rezultatima za vrijednost ukupne razlike boje - ΔE , vidljiva je značajna razlika između pojedinih filмова proizvedenih od zasebnih, mješavina i slojeva biopolimera. Ovaj parametar pokazuje da filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera imaju značajno izraženiju ukupnu razliku boje u odnosu na druge dvije skupine spojeva. Posebice se pritom ističe film proizveden od mješavine biopolimera alginata i proteina sirutke za kojeg je određena najveća ukupna razlika boje ali i najveća opalescencija, te se pojava ovog svojstva može smatrati objašnjenjem za uočene izražene razlike u boji uzoraka. S obzirom na ovo svojstvo, pokazalo se da kombinacija biopolimera kitozana i proteina sirutke karakterizira filmove dobre transparentnosti ili male opalescencije, što prema rezultatima može biti posljedica manje opalescencije čistih, zasebnih filмова proizvedenih od ova dva materijala. Određivanje svjetline formuliranih filмова ukazalo je na najveće vrijednosti filмова koji u sastavu sadrže pektin, što je posljedica najveće numeričke vrijednosti ovog parametra za čisti zasebni film pektina (4,55). Ovi rezultati mogu se povezati i sa velikom vrijednosti parametra L^* za ovaj uzorak.

4.2. VIZUALNI IZGLED FORMULIRANIH FILMOVA



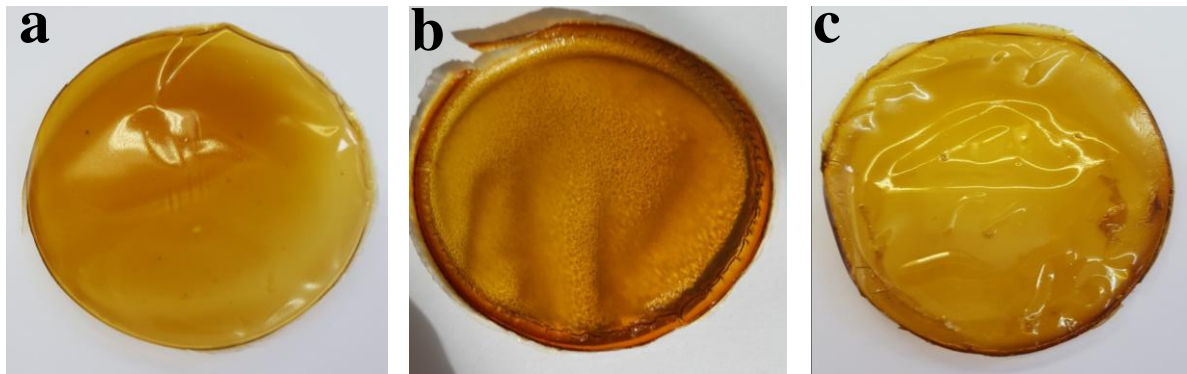
Slika 13. Digitalne fotografije filmova formuliranih u ekstraktu ružmarina i čistih zasebnih biopolimera a) alginata, b) pektina, c) kitozana i d) proteina sirutke

Prema vizualnim karakteristikama filmova, prikazanima na digitalnim fotografijama na slici 13, kitozanski filmovi (slika 13c) pokazali su se najtamnijima, dok su najsvjetliji alginatni filmovi (slika 13a). Ova dva filma također su imala i najbolje morfološke karakteristike površine filmova, odnosno najravniju površinu bez vidljivih neravnih dijelova ili napuklina. S obzirom na sjaj filmova, svi filmovi osim pektinskih (slika 13b) imali su zadovoljavajuć sjaj, pri čemu su se ipak izdvajali kitozanski i proteinski filmovi (slika 13d) s vrlo visokim sjajem.



Slika 14. Digitalne fotografije filmova formuliranih u ekstraktu ružmarina i od mješavina biopolimera u kombinacijama a) alginat-pektin, b) alginat-proteini sirutke, c) pektin-proteini sirutke i d) kitozan-proteini sirutke

Na slici 14 prikazane su digitalne fotografije filmova proizvedenih od mješavina biopolimera. Vizualna karakterizacija boje filmova na slici 14, pokazala je najsvjetliju boju filma proizvedenog od mješavine pektina i proteina sirutke (slika 14c), a najtamniju filma od mješavine alginata i proteina sirutke (slika 14b). Film proizveden od mješavine biopolimera u kombinaciji kitozan-proteini sirutke (slika 14d), pokazao je izrazito nejednoliku strukturu filma što može biti posljedica kompleksnosti matriksa filma, odnosno mogućih interakcija mješavine primijenjenih biopolimera. Filmovi proizvedeni od mješavine biopolimera alginat-proteini sirutke pokazali su najveći sjaj i glatkoću površine filma.

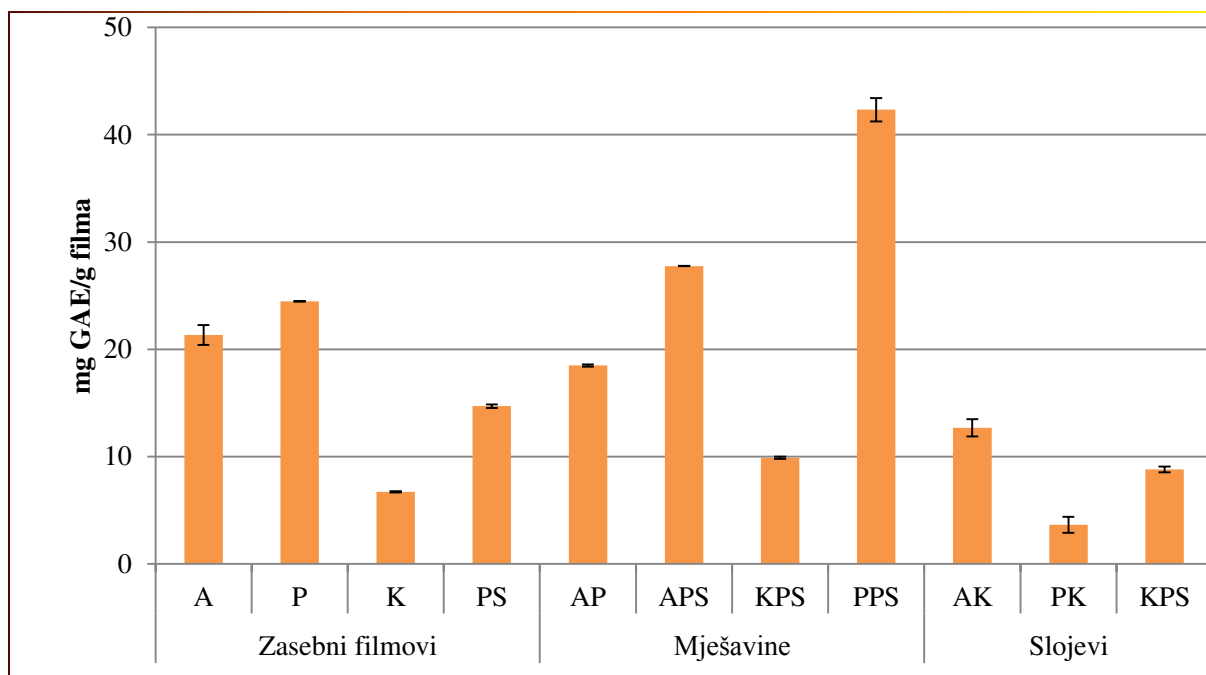


Slika 15. Digitalne fotografije filmova formuliranih u ekstraktu ružmarina i od slojeva biopolimera u kombinacijama a) alginat-kitozan, b) pektin-kitozan, c) proteini sirutke-kitozan

Slika 15 prikazuje digitalne fotografije filmova proizvedenih od slojeva biopolimera. S obzirom na ujednačenost debljine i boje filmova, filmovi proizvedeni od slojeva proteina sirutke i kitozana (slika 15c) pokazali su se najboljima, čemu je pridonijela i njihova mala debljina i povoljna teksturalna svojstva, posebice savitljivost. Pojava turbiditeta pri filmovima od alginata i kitozana (slika 15a) te pektina i kitozana (slika 15b), posljedica je mogućih ionskih interakcija između ovih biopolimera s obzirom na njihov polielektrolitski karakter. Film proizveden od slojeva biopolimera u kombinaciji pektin-kitozan (slika 15b) ima najlošiji vizualni izgled te, hrapavu površinu, što može biti dokaz najizraženijih prethodno navedenih interakcija te pojavom vidljivih precipitiranih aglomerat.

4.3. BIOAKTIVNI SASTAV FORMULIRANIH FILMOVA

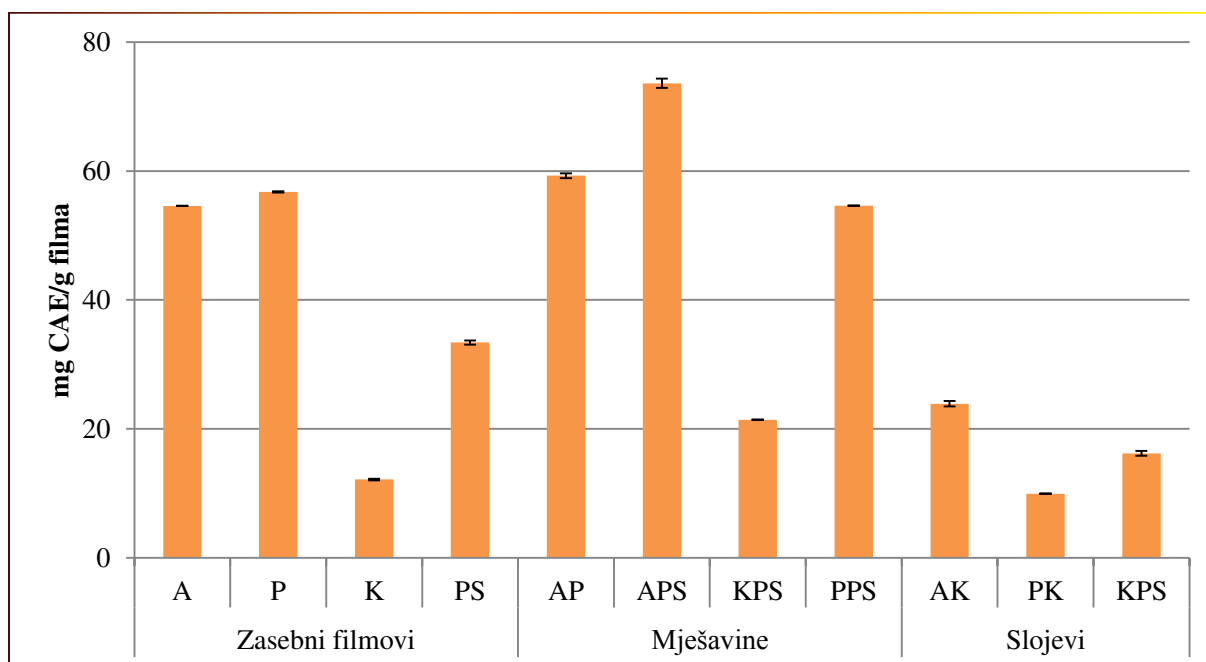
4.3.1. Udjel bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet filmova formuliranih s ekstraktom ružmarina



Slika 16. Udjel ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) u filmovima formuliranim u ekstraktu ružmarina

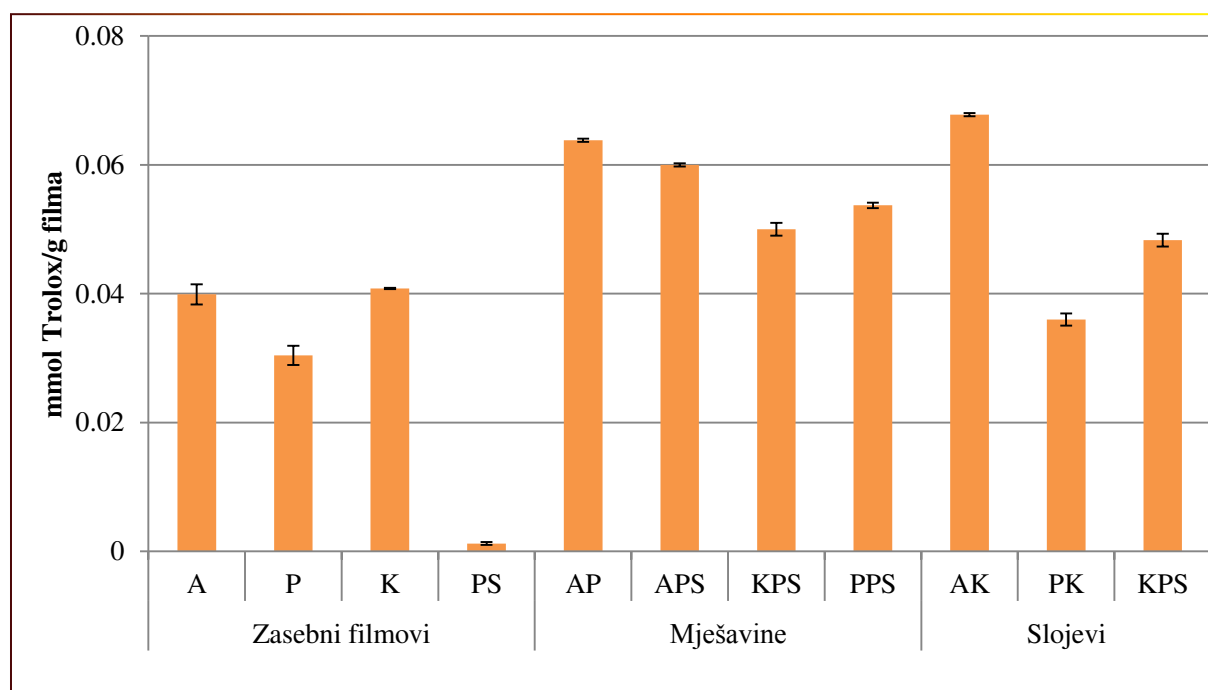
Slika 16 prikazuje udjel ukupnih polifenola u formuliranim funkcionalnim filmovima pripremljenim od različitih zasebnih biopolimera, njihovih mješavina i slojeva. Usporedbom svih formuliranih filmova, vidljivo je da filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera sadrže najveći udjel ukupnih polifenola, pri čemu se najviše ističe mješavina pektina i proteina sirutke (42,33 mg GAE/g filma), što može biti posljedica najvećeg udjela ukupnih polifenola i čistih zasebnih filmova proizvedenih od ova dva materijala. Kod filmova proizvedenih iz zasebnih biopolimera najveći udjel ukupnih polifenola pokazao je pektinski film, a najmanji kitozanski film. Filmovi proizvedeni od zasebnih biopolimera sadrže manji udjel ukupnih polifenola od filmova pripremljenih od mješavina biopolimera, ali veći od filmova pripremljenih od slojeva biopolimera. Kod filmova proizvedenih od slojeva biopolimera, kombinacija alginata i kitozana pokazala je najveći udjel, dok je kombinacija pektina i

kitozana pokazala najmanji udjel ukupnih polifenola (3,63 mg GAE/g filma), ne samo među filmovima proizvedenih od slojeva biopolimera, već i među svim formuliranim filmovima. Usporedbom teoretskih vrijednosti udjela ukupnih polifenola u filmovima proizvedenih od mješavina biopolimera, izračunatih kao zbroj udjela ukupnih polifenola u filmovima od jednakih zasebnih biopolimera, nisu primijećene značajnije razlike u odnosu na eksperimentalne vrijednosti. S obzirom da je udjel ukupnih polifenola u filmovima formuliranim od slojeva biopolimera znatno manji od teoretskih vrijednosti, rezultati ukazuju na filmove formulirane od mješavina biopolimera kao najbolji način postizanja bioaktivno bogatih, funkcionalnih filmova. S obzirom na vrstu biopolimera, može se primijetiti da prisutnost proteina sirutke u filmovima proizvedenim i od mješavina i slojeva biopolimera rezultira većim udjelom ukupnih polifenola, što može biti posljedica interakcije proteina s Folin-Ciocalteu reagensom za određivanje udjela ukupnih polifenola te prividnim povećanjem udjela ukupnih polifenola. Također, filmovi proizvedeni od kitozana, ili u kombinaciji s kitozonom imaju manji udjel ukupnih polifenola kao posljedica manje topljivosti kitozanskih filmova u vodi.



Slika 17. Udjel hidrokscimetnih kiselina (mg CAE/g filma) u filmovima formuliranim u ekstraktu ružmarina

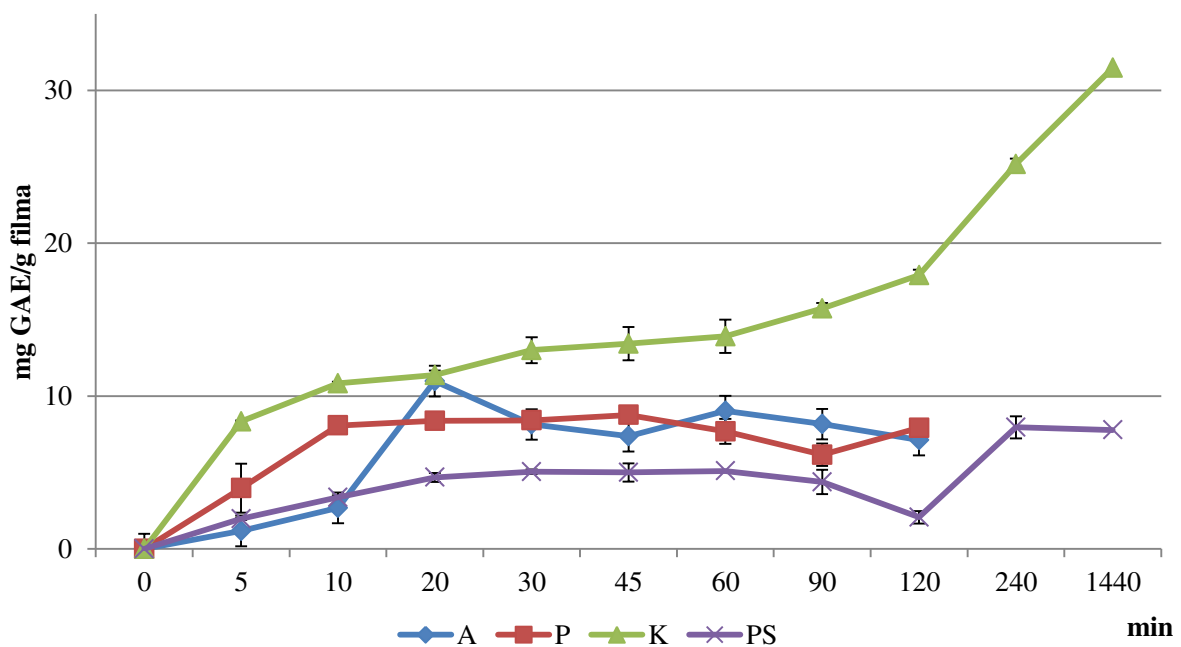
Kao i u slučaju udjela ukupnih polifenola, primijećen je jednak trend udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina u formuliranim filmovima (slika 17) pokazalo je da je najveći udjel hidroksicimetnih kiselina određen u filmovima dobivenim od mješavina biopolimera, nakon čega slijede filmovi proizvedeni od zasebnih polimera te naposljetku filmovi od slojeva biopolimera. Od svih ispitivanih filmova, film proizveden od mješavine alginata i proteina sirutke sadržavao je najveći udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina (73,59 mg CAE/g filma), dok je najmanji udjel ovih spojeva određen u filmu proizvedenom od slojeva pektina i kitozana (9,95 mg CAE/g filma), jednako kao i u slučaju udjela ukupnih polifenola. Čisti kitozanski filmovi, kao i kombinacija ostalih biopolimera s kitozonom ponovno je rezultirala namjnjim udjelom ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Kod filmova proizvedenih od slojeva biopolimera u kombinacijama alginat- kitozan (AK), pektin- kitozan (PK) i kitozan- proteini sirutke (KPS), vidljivo je da je prisutnost kitozana dala filmove s najmanjim udjelom hidroksicimetnih kiselina. Filmovi proizvedeni od zasebnih biopolimera alginata i pektina sadrže veliki udjel ispitivanih kiselina, te je posljedično korištenje ova dva biopolimera u mješavinama rezultiralo dobivanjem filmova sa visokim udjelima hidroksicimetnih kiselina (AP, APS, KPS, PPS).



Slika 18. Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox/g filma) filmova formuliranih u ekstraktu ružmarina

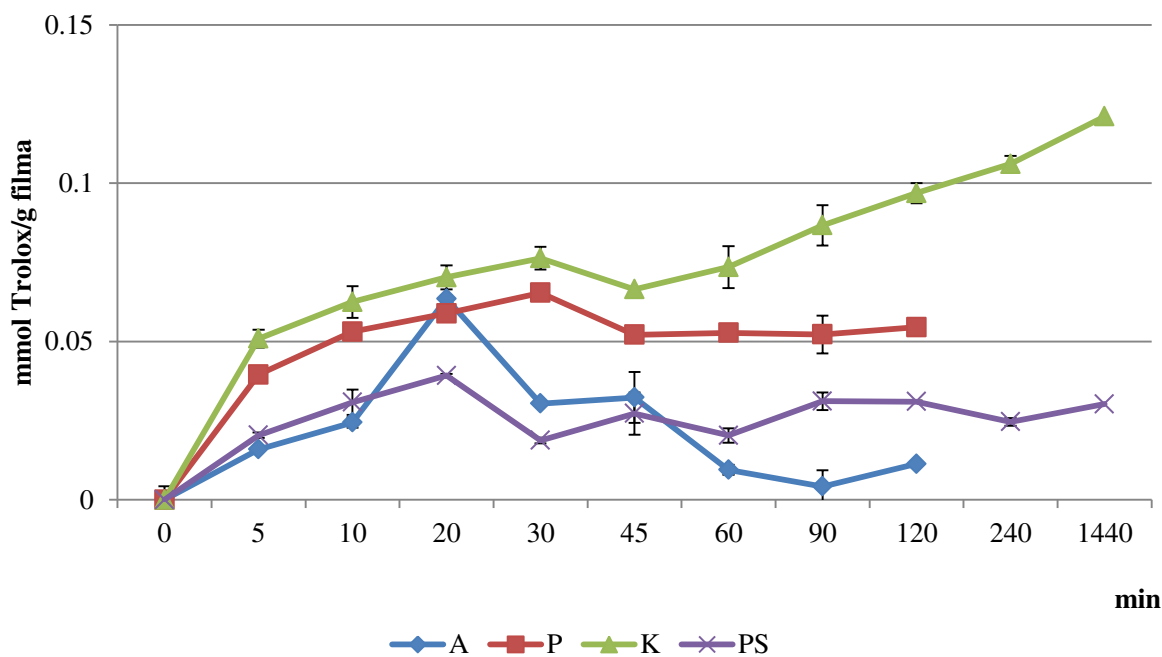
Ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta pokazalo je značajno drugačiji trend i poredak uzoraka u odnosu na prethodno određene udjele ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina. Najveća razlika uočena je kod filmova proizvedenih od slojeva biopolimera, koji su karakterizirani najmanjim udjelima ukupnih polifenola hidrokscimetnih kiselina, ali visokim antioksidacijskim kapacitetom. Filmovi proizvedeni od slojeva alginata i kitozana pokazali su najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta među svim formuliranim filmovima (0,067 mmol Trolox/g filma). Najmanja vrijednost kod svih ispitivanih uzoraka određena je u filmovima proizvedenim od zasebnog biopolimera proteina sirutke (0,001 mmol Trolox/g filma). Kombiniranje biopolimera, u mješavinama i slojevima, rezultiralo je povećanjem antioksidacijskog kapaciteta, uz izuzetak kombinacije pektina i kitozana formuliranim kao slojevi, gdje se antioksidacijski kapacitet smanjio. Iako su proteini sirutke pokazali najmanji antioksidacijski kapacitet, njihovim kombiniranjem sa ostalim biopolimerima proizvedeni su filmovi sa visokim antioksidacijskim kapacitetom.

4.3.2. Kinetika otpuštanja bioaktivnih spojeva iz formuliranih filmova u simuliranim uvjetima gastro-intestinalnog trakta



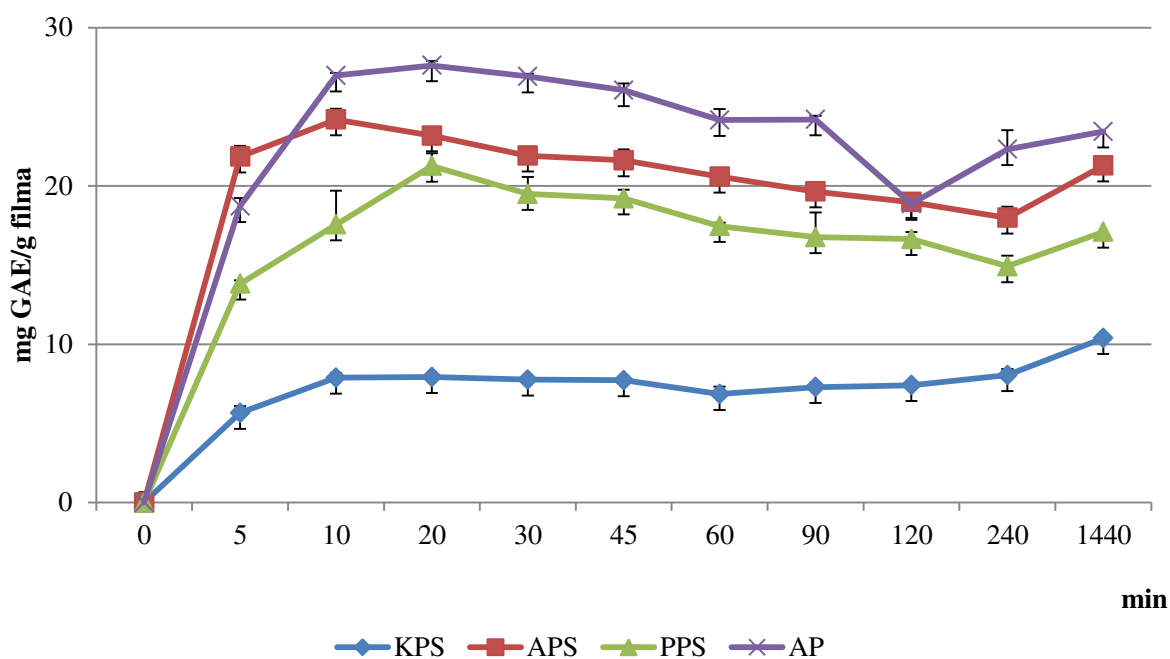
Slika 19. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) iz filmova proizvedenih od zasebnih biopolimera

Prema rezultatima otpuštanja ukupnih polifenola iz filmova formiranih od zasebnih biopolimera primijećuje se jednak profil postepenog otpuštanja ukupnih polifenola iz alginatnog, pektinskog i proteinskog filma do 30 minute, nakon čega se postiže ravnotežno stanje. Otpuštanje iz kitozanskog filma pokazalo je najpovoljniji profil, prema kojem se ukupni polifenoli otpuštaju kontinuirano tijekom 24 h, nakon čega je izmjereno 31,47 mg ukupnih polifenola/g filma. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola pokazala je i manje fluktuacije udjela ovih spojeva tijekom mjerenja iz alginatnih, pektinskih i proteinskih filmova što može biti posljedica nepažljivog i nepravilnog rukovanja uzorcima ili mogućih interakcija reagensa i analita koji su prouzročili pogreške u mjerenju. Usporedbom udjela ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) u filmovima formuliranim u ekstraktu ružmarina (slika 16) i otpuštanje ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) u filmovima formuliranim u ekstraktu ružmarina (slika 19) zanimljivo je primijetiti kako kitozanski filmovi sa skoro najmanjim udjelom ukupnih polifenola, od svih ispitivanih uzoraka, imaju najveću količinu otpuštenih ukupnih polifenola. S obzirom da je eksperiment otpuštanja proveden u simuliranoj otopini gastrointestinalnog trakta sa prisustvom probavnih enzima te niskog pH (pH= 1,5), ovakav medij pogodovao je kitozanskim filmovima koji pri niskom pH imaju veću topljivost te se uslijed degradacije filma omogućilo otpuštanje polifenolnih spojeva.



Slika 20. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox/g filma) iz filmova proizvedenih od zasebnih biopolimera

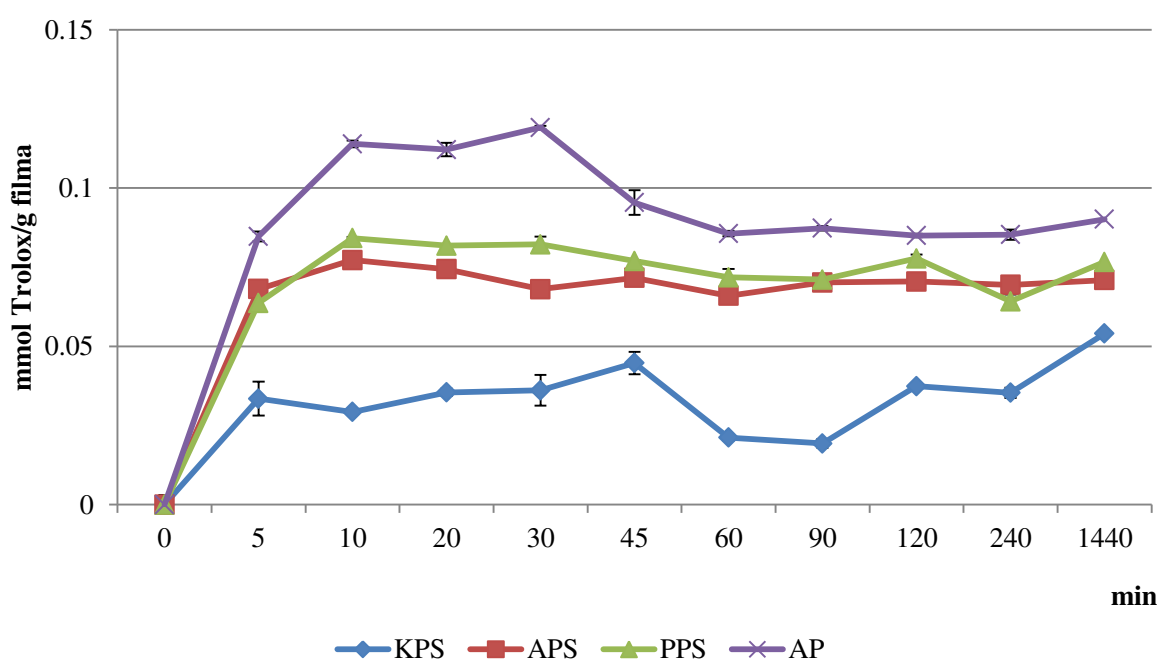
Antioksidacijski kapacitet medija pri određivanju profila otpuštanja iz zasebnih filmova slijedi jednaku tendenciju kao i udjel ukupnih polifenola. Filmovi formulirani od proteina sirutke pokazali su najmanji, dok su kitozanski filmovi pokazali najveći antioksidacijski kapacitet prilikom otpuštanja. Alginatni, pektinski i proteinski filmovi ponovno su vrlo brzo otpustili spojeve s izraženim antioksidacijskim djelovanjem, tijekom prvih 30 minuta, dok se kod kitozanskih filmova postiglo kontinuirano otpuštanje što rezultira i postepenim povećanjem antioksidacijskog kapaciteta do 0,121 mmol Trolox/g filma nakon 24h.



Slika 21. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) iz filmova proizvedenih od mješavina biopolimera

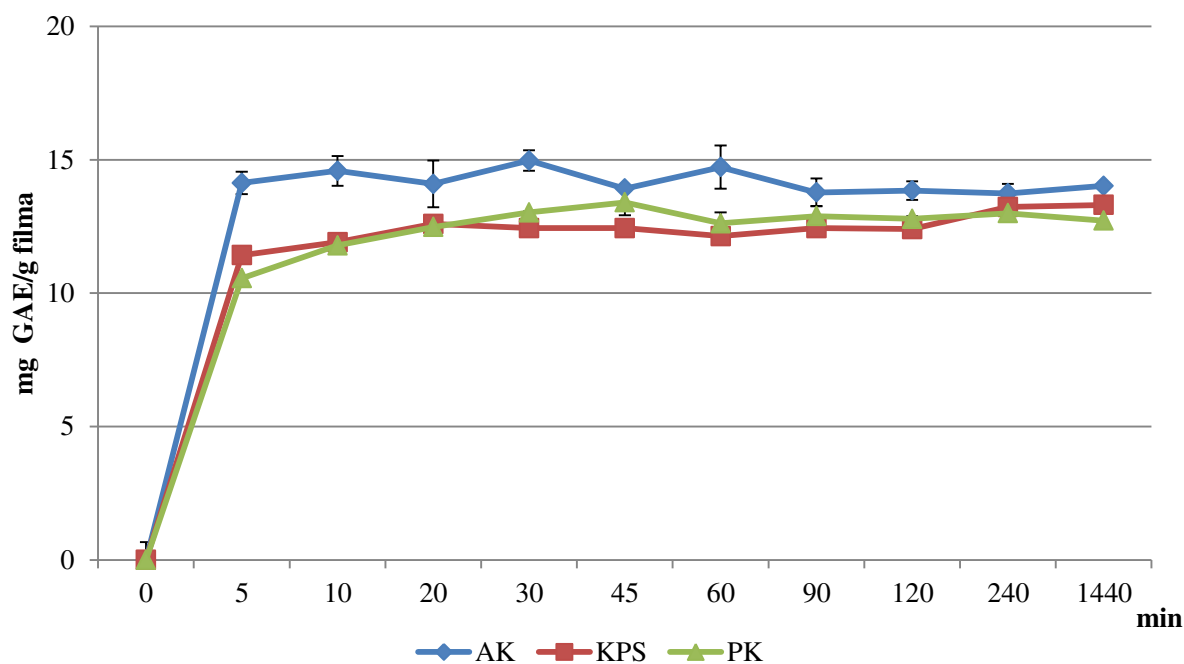
Filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera pokazali su bržu kinetiku otpuštanja ukupnih polifenola u odnosu na filmove od čistih, zasebnih biopolimera. U ovom slučaju, većina ukupnih polifenola otpuštena je tijekom prvih 10 minuta, osim pri filmu dobivenom od mješavine pektina i proteina sirutke u kojem se brzo otpuštanje događa tijekom prvih 20 minuta, nakon čega se postiže ravnotežno stanje. Pad vrijednosti udjela ukupnih polifenola primijećen kod nekih uzoraka posljedica je nestabilnosti ukupnih polifenola u mediju za otpuštanje, pri čemu polifenoli vjerojatno podliježu različitim reakcijama polimerizacije ili interakcije s drugim komponentama matriksa te nemaju mogućnost reakcije sa reagensom. Filmovi proizvedeni od mješavine biopolimera u kombinaciji alginat-pektin pokazali su

najveću količinu otpuštenih ukupnih polifenola, koja je iznosila od maksimalnih 27,61 do konačnih 23,44 mg GAE/g filma. Na slici 16 vidljivo je da filmovi proizvedeni od zasebnih biopolimera alginata i pektina sadrže najveći udjel ukupnih polifenola, što upućuje na zaključak da miješanjem ova dva polimera nije došlo do reakcija koje bi utjecale na zadržavanje ukupnih polifenola u matriksu filma. Najmanji udjel ukupnih polifenola pokazao je film proizveden od mješavine u kombinaciji kitozan-proteini sirutke (10,38 mg GAE/g filma). Ispitivanjem udjela ukupnih polifenola (slika 16) pokazalo se da ovi filmovi sadrže najmanji udjel, što može biti razlog i ovdje ostvarenih najmanjih rezultata.



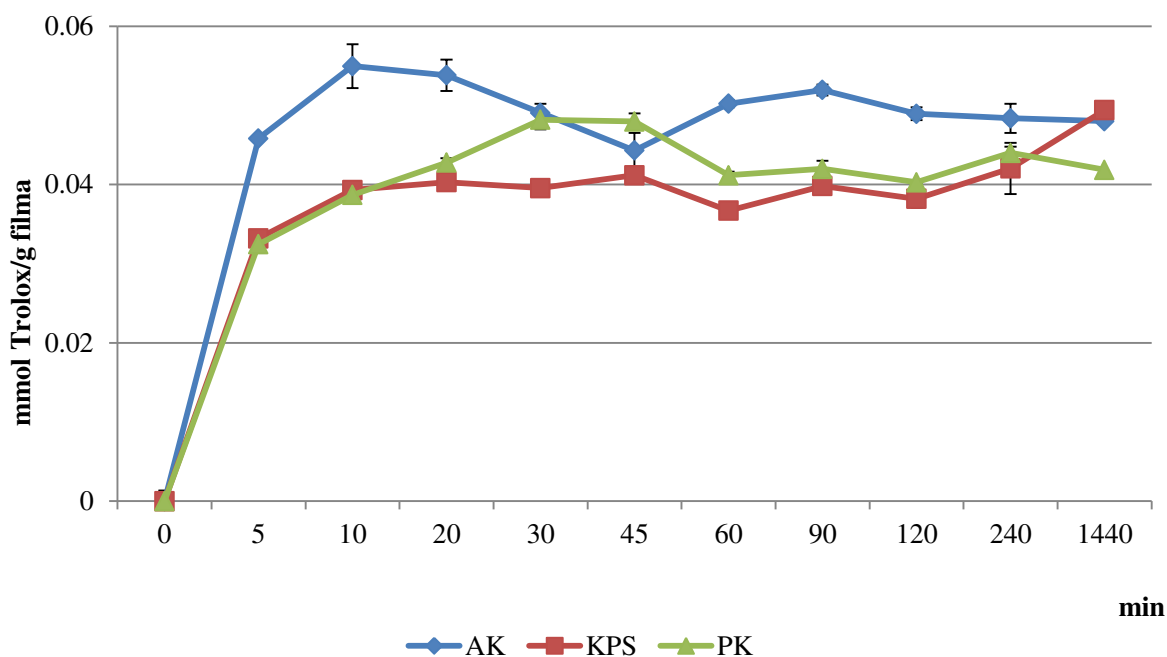
Slika 22. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox/g filma) iz filmova proizvedenih od mješavina biopolimera

Rezultati dobiveni mjerenjem otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz filmova proizvedenih od mješavina biopolimera (slika 22) pokazali su isti trend kao i udjel ukupnih polifenola, odnosno neznčajne razlike između uzoraka i njihovih profila otpuštanja. Filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera u kombinaciji kitozan-proteini sirutke ponovno su pokazali najmanji antioksidacijski kapacitet, što može biti posljedica stvorenih interakcija između ova dva biopolimera i na taj način omogućavanja boljeg zadržavanja bioaktivnih spojeva unutar filma.



Slika 23. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg GAE/g filma) iz filmova proizvedenih od slojeva biopolimera

Tijekom otpuštanja ukupnih polifenola iz filmova formiranih od slojeva biopolimera nije bilo značajnih razlika niti među različitim kombinacijama filmova, ni među određenim profilima otpuštanja. Naime, kako je vidljivo na slici 23, udjel ukupnih filmova otpušten iz sve tri ispitivane kombinacije filmova iznosile su <15 mg GAE/g filma, bez značajnih razlika između pojedinih vrsta filmova. Skoro 90% udjela ukupnih polifenola iz sva tri filma otpušteno je tijekom prvih 5 min, nakon čega se postiže ravnotežno stanje te nema daljnjeg otpuštanja. Usporedbom otpuštanja ukupnih polifenola kod filmova proizvedenih od zasebnih biopolimera (slika 19) sa rezultatima slike 23, vidljiv je pozitivan utjecaj kitozana kao sastojka u filmovima proizvedenim od slojeva biopolimera. Ovakav rezultat primijećen je i pri otpuštanju iz čistog kitozanskog filma.

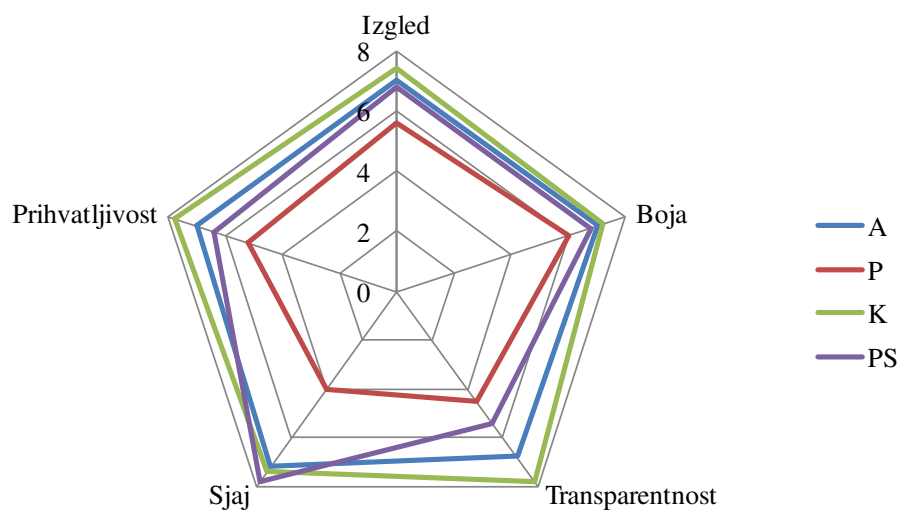
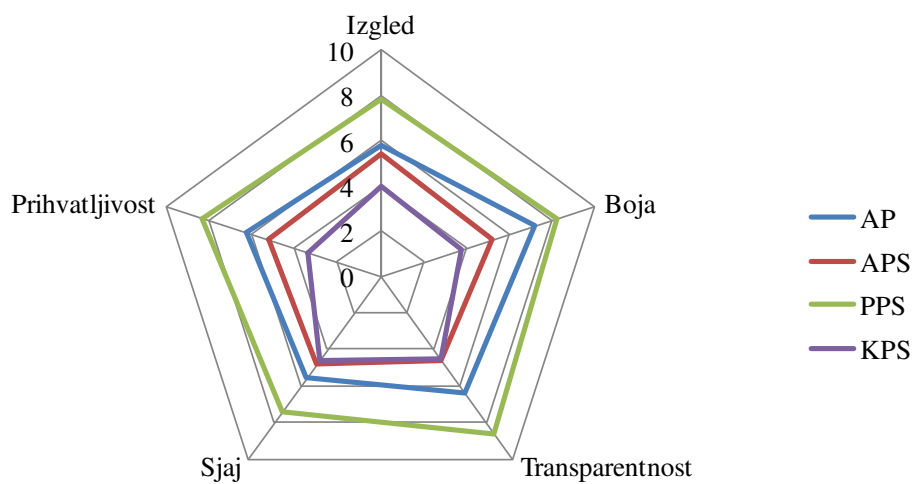
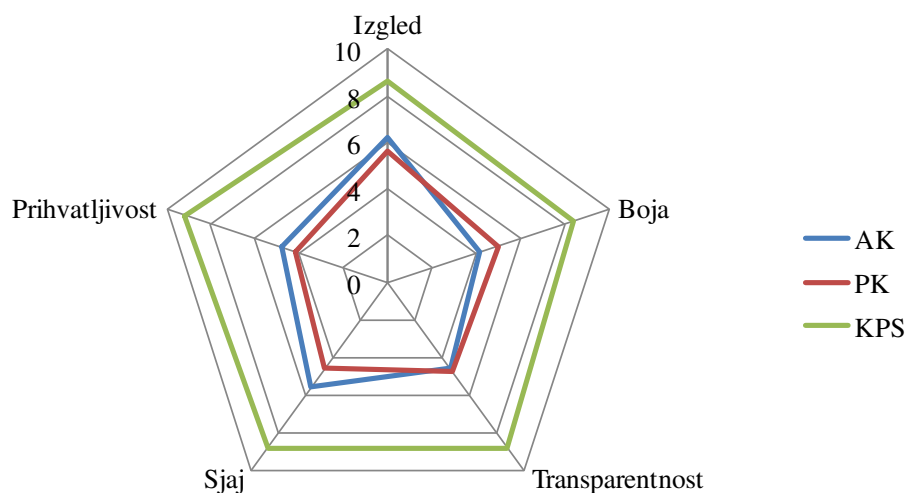


Slika 24. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox/g filma) iz filmova proizvedenih od slojeva biopolimera

Rezultati dobiveni mjerenjem otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz filmova proizvedenih od slojeva biopolimera (slika 24) pokazali su isti trend kao i udjel ukupnih polifenola, odnosno neznačajne razlike između uzoraka i njihovih profila otpuštanja. Općenito su rezultati eksperimenta određivanja kinetike otpuštanja pokazali najpovoljnije profile otpuštanja za filmove formulirane ili od zasebnih (kitozan) ili od mješavina biopolimera.

4.4. SENZORSKA SVOJSTVA FORMULIRANIH FILMOVA

Senzorske karakteristike ispitivane za formulirane filmove, i to; izgled, boja, transparentnost, sjaj i prihvatljivost pružile su uvid u preferencije potrošača prema vizualnim karakteristikama filmova. Među filmovima proizvedenim od zasebnih biopolimera (slika 25a), najbolje je ocijenjen kitozanski film, za sve parametre osim sjaja, koji je općenito najbolje ocijenjen za filmove proizvedene od proteina sirutke (7,8), dok su isti filmovi primjerice karakterizirani vrlo lošom transparentnošću (5,4). Među svim ispitivanim filmovima pektinski filmovi su najlošije ocijenjeni s vrlo niskim ocjenama za sva ispitivana svojstva.

a**b****c**

Slika 25. Senzorska analiza filmova proizvedenih od zasebnih (a), mješavina (b) i slojeva (c) biopolimera

Filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera (slika 25b) pokazali su velike razlike u senzorskim svojstvima ovisno o kombinaciji biopolimera. Senzorsko ocjenjivanje pokazalo je da je najbolje ocijenjen film proizveden od mješavine biopolimera u kombinaciji pektin-proteini sirutke. Ovi filmovi ocijenjeni su najvećim ocjenama za svojstva izgleda, boje i sjaja te transparentnosti i prihvatljivosti. Nakon ovog filma, prema senzorskoj prihvatljivosti slijede filmovi dobiveni od mješavine biopolimera u kombinaciji alginat-pektin, koji su karakterizirani najboljom ocjenom za boju filmova. Prema rezultatima senzorskog ocjenjivanja najlošiji su filmovi dobiveni od mješavine kitozana i proteina sirutke, što je već prethodno potvrđeno diskusijom tijekom karakterizacije digitalnih fotografija navedenih uzoraka.

Kod filmova proizvedenih od slojeva biopolimera (slika 25c), prema rezultatima senzorskog ocjenjivanja, film proizveden od mješavine kitozana i proteina sirutke pokazao se najbolje ocijenjenim za sve karakteristike. Navedeni film pokazao je brojčano najveće i statistički značajno veće vrijednosti senzorskih ocjena za sve ispitivane parametre u usporedbi s preostala dva filma iz ove skupine uzoraka. Filmovi proizvedeni od slojeva u kombinacijama alginat-kitozan i pektin-kitozan vrlo su loše ocijenjeni, pri čemu je prihvatljiviji ipak bio film dobiven od kombinacije alginata i kitozana.

Općenito, senzorska karakterizacija svih filmova pokazala je da je vizualno najbolji film proizveden od slojeva biopolimera kitozana i proteina sirutke, nakon čega slijedi film of zasebnog čistog kitozana. S obzirom da je ista kombinacija biopolimera u mješavini (KPS) bila vrlo loše senzorski ocijenjena, rezultati upućuju da način formuliranja filmova te moguće interakcije između samih biopolimera imaju velik utjecaj na konačna svojstva proizašlih filmova, pri čemu se preferira primjena ili zasebnih ili biopolimera u slojevima.

5. ZAKLJUČCI

1. Udjel vode i suhe tvari formuliranih filmova u ovisnosti je o vrsti biopolimera, dok način formiranja filmova (mješavine ili slojevi biopolimera) nemaju utjecaj na ova osnovna fizikalno-kemijska svojstva.
2. Filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera pokazali su najveću (280 μm), a filmovi proizvedeni od zasebnih biopolimera najmanju (130 μm) debljinu filmova.
3. Primjena kitozana i proteina sirutke rezultira filmovima manje debljine, dok prisutnost pektina povećava debljinu filmova.
4. Najbolja topljivost u vodi određena je za filmove proizvedene od slojeva biopolimera, dok s obzirom na vrstu biopolimera primjena alginata i pektina rezultira visokom, a primjena kitozana slabijom topljivošću.
5. S obzirom na vizualna svojstva određena kolorimetrijskim mjerenjima i senzorskim ocjenjivanjem, najbolji vizualni izgled pokazali su filmovi proizvedeni od slojeva biopolimera u kombinaciji kitozan-proteini sirutke, koji su dali senzorski najprihvatljivije filmove.
6. Filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera sadržavali su najveće udjele ukupnih polifenola, hidrosicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet, dok su najmanje vrijednosti ovih parametara određene u filmovima proizvedenim od slojeva biopolimera.
7. Najveći udjeli ukupnih polifenola, hidrosicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta određeni su u filmovima proizvedenim od mješavine biopolimera u kombinaciji alginat-proteini sirutke, a najmanji u filmovima proizvedenim od slojeva biopolimera u kombinaciji pektin-kitozan.
8. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz proizvedenih filmova u vodi pokazala je vrlo brzo otpuštanje ovih parametara iz filmova proizvedenih od slojeva biopolimera (5 min), nakon čega slijede filmovi proizvedeni od mješavina biopolimera (10 min), dok je najsporije otpuštanje (do 30min) određeno iz filmova dobivenih od zasebnih, čistih biopolimera.

9. Najbolji profil otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određen je za čisti zasebni film od kitozana, iz kojeg se otpuštanje odvijalo kontinuirano tijekom 24h. Filmovi proizvedeni od zasebnog polimera alginata imaju najlošiji profil otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta od svih ispitanih uzoraka.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2004) Carbohydrates, <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/Carbohydrates.htm>, Pristupljeno 1. lipnja 2017.

Anonymous 2 (2017) Phaeophyceae: Brown Algae, <<http://www.seaweed.ie/algae/phaeophyta.php>>, Pristupljeno 5. lipnja 2017.

Anonymous 3 (2009) Hayley Sacks, https://academics.skidmore.edu/wikis/bi_385_methods/index.php/Hayley_Sacks, Pristupljeno 3. lipnja 2017.

Anonymous 4 (2015) Whey And Disease, <http://www.oneworldwheyprotein.com/whey-and-disease/>, Pristupljeno 3. lipnja 2017.

Anonymous 5 (2012) Ružmarin (Lat. Rosmarinus officinalis L.), <http://herba-laboratorij.hr/prirodni-sastojci/cijena/ruzmarin-lat.-rosmarinus-officinalis-1>, Pristupljeno 3. lipnja 2017.

Arvanitoyannis, I. S., Nakayama, A., Aiba, S. (1998) Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polym.* **37**, 371-382.

Ayala-Zavala, J. F., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Leyva, J. M., Ortega-Ramírez, L. A., Carrasco-Lugo, D. K., Pérez-Carlón, J. J., Melgarejo-Flores, B. G., González-Aguilar, G. A., Miranda, M. R. A. (2013) Pectin-Cinnamon Leaf Oil Coatings Add Antioxidant and Antibacterial Properties to Fresh-Cut Peach. *Flavour Frag. J.* **28**, 39-45.

Baldwin, E. A., Nisperos, N. O., Baker, R. A. (1995) Use of edible coatings to preserve quality of lightly and slightly processed products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 509-524.

Banker, G. S. (1966) Film coating theory and practice. *J. Pharm. Sci.* **55**, 81-89.

Begin, A., Van Calsteren, M. (1999) Antimicrobial films produced from chitosan. *Intl. J. Biol. Macromol.* **26**, 63-67.

Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J. E. (2012) Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect on the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J. Food Eng.* **110**, 232-239.

Bertuzzi, M. A., Slavutsky, A. M. (2016) Standard and New Processing Techniques Used in the Preparation of Films and Coatings at the Lab Level and Scale-Up. U: *Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications* (Garcia, M. P. M., Gomez-Guillen, M. C., Lopez-Caballero, M., Barbosa-Canovas, G. V., ured.), Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, str. 3-23.

Blanco-Fernandez, B., Rial-Hermida, M. I., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2013) Edible Chitosan/Acetylated Monoglyceride Films for Prolonged Release of Vitamin E and Antioxidant Activity. *J. Appl. Polym. Sci.* **129**, 626-635.

Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A. (2011) Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *J. Food Eng.* **106**, 111-118.

Bourtoom, T. (2008) Edible films and coatings: characteristics and properties. *Food Res. Int.* **15**(3), 237-248.

Brown, A. C., Wang, B., Oh, J. H. (2008) Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *J. Food Protect.* **71**, 319-324.

Brunner, J. R. (1981) Milk proteins. U: *Food proteins* (Whitaker, J. R., Tannenbaum, S. R., ured.), The Avi Publishing Company, Westport, str. 175-208.

Cisneros-Zevallos, L., Krochta, J. M. (2002) Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables: understanding relative humidity effects. *J. Food Sci.* **67**(8), 2792-2797.

Dangaran, K., Tomasula, P. M., Qi, P. (2009) Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. U: *Edible Films and Coatings for Food Applications* (Embuscado, M. E., Huber, K. C., ured.), Springer, New York, str. 25-56.

Daniels, R. (1973) *Edible Coatings and Soluble Packaging*, Noyes Data Corporation, Park Ridge.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J-A., Voilley, A. (1998) Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Crit. Rev. Food Sci.* **38**, 299-313.

deWit J. N., Klarenbeek, G. (1983) Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.* **67**, 2701-2710.

Donhowe, G. I., Fennema, O. R. (1994) Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions, and testing methods. U: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality (Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., ured.), Technomic Publishing, Lancaster, str. 1-24.

Dybing, S. T., Smith, D. E. (1991) Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality: a review. *Cult. Dairy Prod. J.* **57**, 4-12.

Eça, K. S., Sartori, T., Menegalli, F. C. (2014) Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Braz. J. Food Technol.* **17**, 98-112.

Ellis, R. P., Cochrane, M. P., Dale, M. F. B., Duffus, C. M., Lynn, A., Morrison, I. M., Prentice, R. D., Swanston, J. S., Tiller, S. A. (1998) Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* **77**, 289-311.

Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* **110**, 76-82.

Espitia, P. J. E., Du, W. X., Avena-Bustillos, R. J., Soares, N. F. F., McHugh, T. H. (2013) Edible films from pectin: Physical-machanical and antimicrobial properties- A review. *Food Hydrocolloid.* **35**, 287-296.

Galić, K. (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, str. 23-31.

Garcia, M. P. M., Gomez-Guillen, M. C., Lopez-Caballero, M., Barbosa-Canovas, G. V. (2016) Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications, Taylor & Francis, Boca Raton.

- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C. (2007) Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* **105**, 511-520.
- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J. L. (1993) Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of and edible wheat gluten film. *J. Food Sci.* **58**(1), 206-211.
- Guilbert, S., Gontard, N. (2005) Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 263-275.
- Guilbert, S., Gontard, N., Gorris, L. G. M. (1996) Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **29**, 10-17.
- Han, J. H. (2005) Innovations in Food Packaging, Elsevier Science & Technology Books, London
- Han, J. H., Gennadios, A. (2005) Edible films and coatings: a review. U: Innovations in Food Packaging, (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 239-259.
- Hasegawa, M., Isogai, A., Kuga, S., Onabe, F. (1994) Preparation of cellulose-chitosan blend film using chloral/dimethylformamide. *Polymer* **35**, 983-987.
- Hong, S. I., Han, J. H., Krochta, J. M. (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.
- Jolie, R. P., Duvetter, T., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr. Res.* **345**(18), 2583-2595.
- Kang, H. J., Jo, C., Kwon, J. H., Kim, J. H., Chung, H. J., Byun, M. W. (2007) Effect of a pectin-based edible coating containing green tea powder on the quality of irradiated pork patty. *Food control* **18**, 430-435.
- Kester, J. J., Fennema, O. R. (1986) Edible films and coatings: A review. *Food Technol-Chicago* **40**(12), 47-59.

- Koushki, M. R., Azizi, M. H., Azizkhani M., Koohy-Kamaly, P. (2015) Effect of Different Formulations on Mechanical and Physical Properties of Calcium Alginate Edible Films. *J. Food Qual. Hazards Control* **2**, 45-50.
- Krochta, J. M. (2002) Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. U: Proteins-based Films and Coatings (Gennadios, A., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 1-41.
- Lacroix, M., Cooksey, K. (2005) Edible films and coatings from animal-origin proteins. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 301-312.
- Lacroix, M., Tien, C. L. (2005) Edible films and coating from non.starch polysaccharides. U: Innovations in Food Packaging, (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 338-355.
- Lourdin, D., Bizot, H., Colonna, P. (1997a) "Anti-plasticization" in starch-glycerol films?. *J. Appl. Polym. Sci.* **63**, 1047-1053.
- Liu, Z. (2002) Starch: from granules to biomaterials. U: Recent Research Developments in Applied Polymer Science (Pandalai, S. G., ured.), Research Signpost, Trivandrum, str. 189-219.
- Liu, Z. (2005) Edible films and coatings from starches. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 318-332.
- Macheix, J. J, Fleuriot, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton.
- Mate, J. I., Krochta, J. M. (1996) Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and α -Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3001-3004.
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypula, E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J. Med. Plants Res.* **2**, 321-330.
- Mayachiew, P., Devahastin, S., Mackey, B. M., Niranjana, K. (2010) Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. *Food Res. Int.* **43**, 125-132.

McHugh, T. H., Krochta, J. M. (1994) Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *JAOCS* **71**, 307-312.

Melgarejo-Flores, B. G., Ortega- Ramírez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., González-Aguilar, G. A., Miranda, M. R. A., Ayala-Zavala, J. F. (2013) Antifungal Protection and Antioxidant Enhancement of Table Grapes Treated with Emulsions, Vapors and Coatings of Cinnamon-Leaf Oil. *Postharvest Biol. Tec.* **86**, 321-328.

Morr, C. V., Ha, E. Y. W. (1993) Whey protein concentrates and isolates: Processing and funkcional properties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **33**, 431-476.

Norajit, K., Kim, K. M., Ryu, G. H. (2010) Comparative Studies on the Characterization and Antioxidant Properties of Biodegradable Alginate Films Containing Ginseng Extract. *J. Food Eng.* **98**, 377-384.

Olivas, G. I., Barbosa-Canovas, G. V. (2008) Alginate-calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT-Food Sci. Technol.* **41**, 359-366.

Ozdemir, M., Floros, J. D. (2008) Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *J. Food Eng.* **84**, 116-123.

Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilssonk, N. H., Mortenseny, G. (1999) Potential of biobased materials for food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 52-68.

Perdones, Á., Vargas M., Atarés, L., Chiralt, A. (2014) Physical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Chitosan-Cinnamon Leaf oil Films as Affected by Oleic Acid. *Food Hydrocolloid.* **36**, 256-264.

Perez-Gago, M. B., Nadaud, P., Krochta, J. M. (1999) Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *J. Food Sci.* **64**(6), 1034–1037.

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

Philips, G. O., Williams, P. A. (2000) Handbook of Hydrocolloids, CRC Press, Cambridge

Pranoto, Y., Salokhe, V. M., Rakshit, S. K. (2005) Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Res. Int.* **38**, 267-272.

Protzman, T. F., Wagoner, J. A., Young, A. H. (1967) US Patent 3344216.

Rangel-Marrón, M., Montalvo-Paquini, C., Palou, E., López-Malo, A. (2013) Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and water vapor permeability of sodium alginate edible films. *Recent Advances in Chemical Engineering, Biochemistry and Computational Chemistry* 72-78.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231-1237.

Rhim, J. W., Shellhammer, T. H. (2005) Lipid-based edible films and coatings. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 362-380.

Rindlav-Westling, A., Hulleman, S. H. D., Gatenholm, P. (1997) Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydr. Polym.* **34**, 25-30.

Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G., Martín-Belloso, O. (2013) Influence of Alginate-Based Edible Coatings as Carrier of Antibrowning Agents on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Kent Mangoes. *LWT- Food Sci. Technol.* **50**, 240-246.

Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008) Effect of Natural Antibrowning Agents on Color and Related Enzymes in Fresh-Cut Fuji Apples as an Alternative to the Use of Ascorbic Acid. *J. Food Sci.* **73**, 267-272.

Sawyer, L., Kontopidis, G., Wu, S. Y. (1999) Beta-lactoglobulin – a three-dimensional perspective. *Internation J. Food Sci. Tech.* **34**, 409-418.

Sears, J. K., Darby, J. R. (1982) Mechanism of Plasticizer Action. John Wiley & Sons, New York.

- Seixas, F. L., Turbiani, R. B., Salomao, P. G., Souza, R. P., Gimenes, M. L. (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chem. Eng. Trans.* **32**, 1693-1698.
- Singh, R., Singh, N. (2005) Quality of packaged foods. U: Innovations in Food Packaging (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 24-40.
- Singleton, V. L., Rossi, J, A, J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J. M. (2010) Food hydrocolloid edible films and coatings. U: Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures (Hollingworth, C. S., ured.), Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 41-80.
- Sothornvit, R., Krochta, J. M. (2001) Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films. *J. Food Eng.* **50**(3), 149–155.
- Sothornvit, R., Krochta, J. M. (2005) Plasticizers in edible films and coatings. U: Innovations in Food Packaging, (Han, J. H., ured.), Elsevier Science & Technology Books, London, str. 403-428.
- Thomas, D. J., Atwell, W. A. (1997) Starches, Eagan Press, St Paul.
- Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., Nishi, N. (1997) Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromol. Symp.* **120**, 1-9.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009) Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloid.* **23**, 536-547.
- Wanstedt, K. G., Seideman, S. C., Connelly, L. S., Quenzer, N. M. (1981) Sensory attributes of precooked, calcium alginate-coated pork patties. *J. Food Protect.* **44**, 732-735.
- Wolf, I. A., Davis, H. A., Cluskey, J. E., Gundrum, L. J., Rist, C. E. (1951) Preparation of films from amylose. *Ind. Eng. Chem.* **43**, 915-919.

Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., Tang, Y. (2011) Effects of Chitosan Coating Enriched with Cinnamon Oil on Qualitative Properties of Sweet Pepper (*Capiscum annum L.*). *Food Chem.* **124**, 1443-1450.

Zhang, Q., Liu, L., Ren, L., Wang, F. (1997) Preparation and characterization of collagen-chitosan composites. *J. Appl. Polym. Sci.* **64**, 2127-2130.