

Formulacija funkcionalnih jestivih filmova obogaćenih polifenolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina

Antolić, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:022982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022

Mihaela Antolić

**FORMULACIJA
FUNKCIONALNIH JESTIVIH
FILMOVA OBOGAĆENIH
POLIFENOLNIM EKSTRAKTIMA
SEKUNDARNIH BILJNIH
SIROVINA**

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 prof. dr. sc. Draženke Komes te uz pomoć Danijele Šeremet, mag. ing.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina” (OPB-SLS/SPB-LCF).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

FORMULACIJA FUNKCIONALNIH JESTIVIH FILMOVA OBOGAĆENIH POLIFENOLNIM EKSTRAKTIMA SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA

Mihaela Antolić, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058210460

Sažetak:

Godišnje se na svjetskoj razini proizvodi velika količina sekundarnih biljnih sirovina, što za prehrambenu industriju predstavlja veliki izazov u smislu kružnog gospodarstva i njihove valorizacije. Cilj ovog rada bio je analizirati polifenolni sastav ekstrakata šest sekundarnih biljnih sirovina (kora banane, ljuska luka, ljuska oraha, ljuska kakovog zrna, mahuna graška, kora cikle) te polifenolne ekstrakte istih primijeniti u formulacijama jestivih filmova uz dodatak biljnih proteina (riža, kikiriki, bundeva). Za karakterizaciju polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata korištene su spektrofotometrijske metode i metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD). Kreirano je 28 funkcionalnih jestivih filmova za čiju je karakterizaciju korištena ista metodologija kao i za ekstrakte, a dodatno su određene i njihove fizikalne karakteristike (debljina, boja, tekstura). Najbolja bioaktivna svojstva pokazao je ekstrakt kore banane, kao i jestivi film formuliran s tim ekstraktom. Dodatak proteina kikirikija značajno je povećao udio polifenola i antioksidacijska svojstva filma baziranog na ekstraktu kore cikle. Sve ispitivane sekundarne biljne sirovine pokazale su se kao dobri izvori specifičnih polifenolnih spojeva i kao takve imaju značajan potencijal za širu primjenu u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: *antioksidansi, biljni proteini, jestivi filmovi, polifenoli, sekundarne biljne sirovine*

Rad sadrži: 47 stranica, 32 slike, 12 tablica, 62 literaturna 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: Danijela Šeremet, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković (zamjenski član)

Datum obrane: 21. srpnja 2022.

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

Graduate university study programme: Food Engineering

FORMULATION OF FUNCTIONAL EDIBLE FILMS ENRICHED WITH POLYPHENOLIC
EXTRACTS OF SECONDARY PLANT MATERIALS

Mihaela Antolić, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058210460

Abstract: Annually, a large amount of secondary plant materials is produced worldwide, which represents a great challenge for the food industry in terms of the circular economy and their valorization. The aim of this work was to analyze the polyphenolic composition of six extracts of secondary plant materials (banana peel, onion peel, walnut shell, cocoa bean shell, pea pod, beetroot peel) and to apply their polyphenolic extracts in the formulations of edible films with the addition of plant proteins (rice, peanuts, pumpkin). Spectrophotometric and high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) methods were used to characterize the polyphenol composition and antioxidant capacity of the extracts. 28 functional edible films were created for the characterization of which the same methodology was used as for the extracts, and their physical characteristics (thickness, color, texture) were also determined. The best bioactive properties were shown by the banana peel extract, as well as the edible film formulated with this extract. The addition of peanut protein significantly increased the content of polyphenols and antioxidant properties of the film based on beetroot extract. All examined secondary plant raw materials proved to be good sources of specific polyphenolic compounds and as such have significant potential for wider application in the food industry.

Keywords: *antioxidants, edible films, plant proteins, polyphenols, secondary plant materials*

Thesis contains: 47 pages, 32 figures, 12 tables, 62 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Draženka Komes, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Danijela Šeremet, mag. ing.*

Reviewers:

1. Božidar, Šantek, PhD, Full professor (president)
2. Draženka, Komes, PhD, Full professor (mentor)
3. Ksenija, Durgo, PhD, Full professor
4. Ksenija, Marković, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 21st, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SEKUNDARNE BILJNE SIROVINE	2
2.1.1. Kora banane	2
2.1.2. Ljuska luka	3
2.1.3. Mahuna graška	4
2.1.4. Kora cikle	5
2.1.5. Ljuska kakaovog zrna	7
2.1.6. Ljuska oraha	7
2.2. JESTIVI FUNKCIONALNI FILMOVI	8
2.3. ALGINAT	11
2.4. BILJNI PROTEINI	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL	13
3.1.1. Uzorci	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Priprema vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina	15
3.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina	15
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina DPPH metodom	16
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina ABTS metodom	17
3.2.5. Određivanje udjela polifenolnih spojeva HPLC metodom	18
3.2.6. Formulacija jestivih funkcionalnih filmova	20
3.2.7. Određivanje topljive suhe tvari jestivih funkcionalnih filmova	23
3.2.8. Određivanje debljine jestivih funkcionalnih filmova	23
3.2.9. Određivanje parametara boje jestivih funkcionalnih filmova	23
3.2.10. Određivanje teksture jestivih funkcionalnih filmova	23
3.2.11. Određivanje ukupnih polifenola u jestivim funkcionalnim filmovima	23
3.2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova DPPH metodom	23

3.2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova ABTS metodom	23
3.2.14. Određivanje polifenolnih spojeva u jestivim funkcionalnim filmovima HPLC metodom	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1 Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (DPPH i ABTS) u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina.....	25
4.2. Udio polifenola u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina (HPLC).....	26
4.3. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima bundeve, kikirikija i riže	27
4.4. Određivanje topljive suhe tvari, debljine i parametara boje jestivih funkcionalnih filmova.....	32
4.5. Tekstura jestivih funkcionalnih filmova.....	33
4.6. Udio ukupnih polifenola , antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH) u jestivim funkcionalnim filmovima	35
4. 7. Polifenoli u jestivim funkcionalnim filmovima određeni HPLC metodom	37
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Gotovo 90 milijuna t sekundarnih biljnih sirovina se godišnje proizvede u Europskoj uniji (EU), što predstavlja veliki problem, jer ako se njime pravilno ne gospodari i ako se ne poduzimaju odgovarajuće mjere zbrinjavanja, može doći do neželjenih posljedica, kako za okoliš, tako i za zdravlje ljudi i životinja (Sadh i sur., 2018a; Ravindran i Jaiswal, 2016). Sekundarne biljne sirovine uglavnom sadrže vanjske dijelove različitog voća i povrća, a upravo ti vanjski dijelovi su najbogatiji polifenolima. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se u biljkama sintetiziraju u svrhu obrane protiv fizioloških i okolišnih čimbenika te je u prehrani ljudi njihova dovoljna konzumacija od izrazitog značaja zbog njihovih antioksidacijskih svojstava. Nadalje, kao trend u prehrambenoj industriji ističe se dodavanje polifenolnih ekstrakata u različite prehrambene proizvode te se na taj način mogu povećati funkcionalne značajke istih. U tom kontekstu, sekundarne biljne sirovine sve više se promatraju kao obnovljivi neprehrambeni izvor polifenola.

Još jedan problem u prehrambenoj industriji predstavljaju i polimeri koji se koriste u procesu pakiranja različitih prehrambenih proizvoda. Komercijalni polimeri koji se koriste prilikom pakiranja prehrambenih proizvoda su neobnovljivi i nerazgradivi. Iz toga razloga uvelike se istražuju mogućnosti aplikacije jestivih filmova i premaza u prehrambenoj industriji. Jestivi filmovi i premazi su tanki, zaštitni, jestivi i biorazgradivi slojevi premazani ili omotani oko površine hrane te se kao takvi mogu obogatiti dodatkom polifenolnih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina.

Osim polifenolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina, jestivi funkcionalni filmovi se mogu dodatno nutritivno obogatiti dodatkom različitih biljnih proteina što dodatno može rezultirati sa širokim rasponom pozitivnih ishoda na ljudsko zdravlje.

Cilj ovog rada bio je formulirati i odrediti polifenolni sastav te fizikalne karakteristike (debljina, boja, tekstura) jestivih funkcionalnih filmova obogaćenih dodatkom polifenolnih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina i biljnih proteina. U tu svrhu korišteno je šest sekundarnih biljnih sirovina (kora banane, ljuska luka, kora cikle, mahuna graška, ljuska kakaovog zrna, ljuska oraha) u kombinaciji s tri biljna proteina (riža, kikiriki, bundeva).

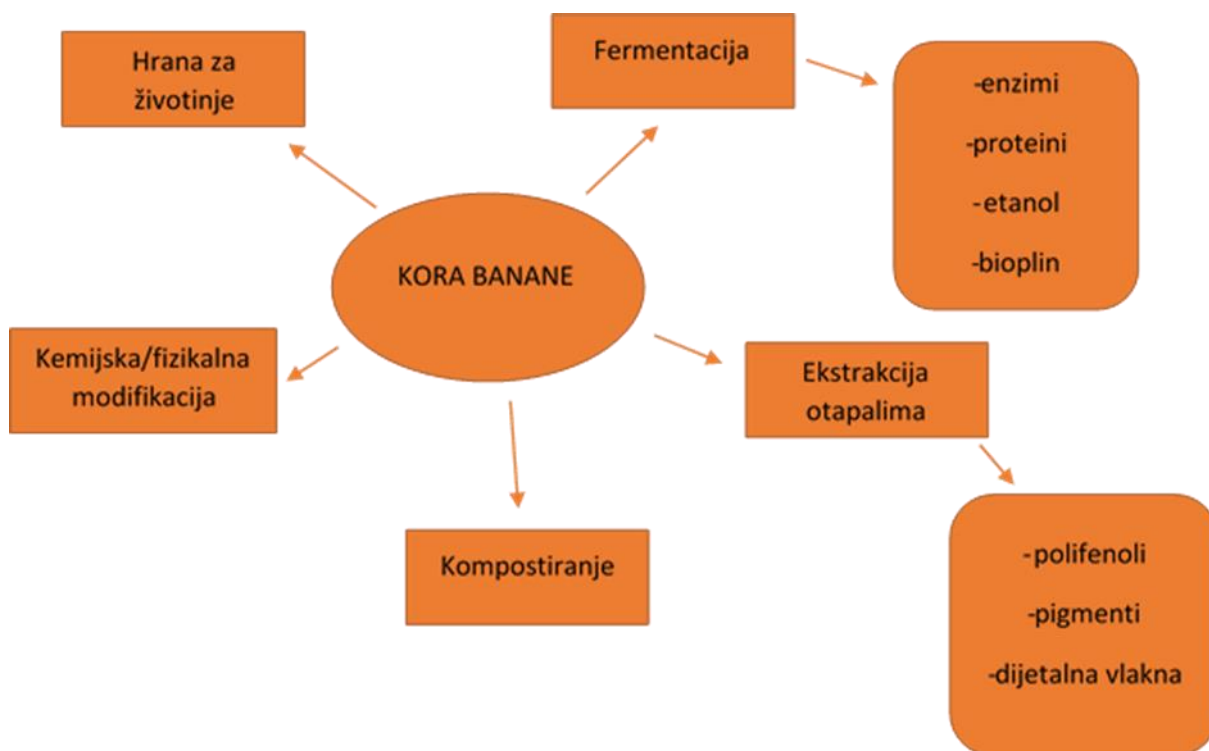
2. TEORIJSKI DIO

2.1. SEKUNDARNE BILJNE SIROVINE

Agroindustrijski nusproizvodi, tj. sekundarne biljne sirovine proizvode se u velikom udjelu u cijelom lancu proizvodnje hrane i kada se ne tretiraju na odgovarajući način, mogu negativno utjecati na okoliš i industrijsku ekonomiju (Lemes i sur., 2022; Vilas-Boas i sur., 2021). Sekundarne biljne sirovine najčešće uključuju kore, ljuske, sjemenke, mahune i peteljke koje se prilikom prerade odbacuju kao otpad (Sadh i sur., 2018b). Industrije proizvodnje sokova proizvode veliki udio različitih kora, kao što su kore citrusa, jabuka i slično, dok primjerice industrija kave proizvodi značajan udio otpada pulpe zrna kave (Sadh i sur., 2018b). Sekundarne biljne sirovine su vrlo bogat izvor bioaktivnih spojeva te je važno usvojiti i adaptirati procese koji povećavaju njihovu uporabu, što dalje omogućuje njihovu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Lemes i sur., 2022). Bioaktivni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji potiču farmakološke ili toksikološke učinke kod čovjeka i životinja kao što su antimikrobni, antioksidativni, antialergeni te antiinflamatorni učinci, a uključuju alkaloide, mikotoksine, pigmente, antibiotike, polifenole itd (Sadh i sur., 2018a). Kako se prehrana smatra vodećim čimbenikom rizika za razvitak raznih bolesti, posljednjih godina prisutno je povećano razmatranje bioaktivnih spojeva zbog njihovog povoljnog utjecaja na ljudsko zdravlje te njihova potencijalna primjena u razvitku novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Câmara i sur., 2020; Sadh i sur., 2018a). Za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz sekundarnih biljnih sirovina koriste se razne metode ekstrakcije sa organskim otapalima, međutim, sve je veća potreba za zelenim i održivim alternativama. Tehnologije zelene ekstrakcije koje su u fokusu su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim fluidima (Vilas-Boas i sur., 2021).

2.1.1. Kora banane

Banana (*Musaceae*) je tropsko voće koje se bere tijekom cijele godine. Općenito, biljka banane uzgaja se zbog svojih plodova, koji se konzumiraju svježi. U svijetu se svake godine proizvodi veliki udio banana, čak 102 milijuna t (Vu i sur., 2018). Međutim, u prehrambenoj industriji, nakon korištenja voćne pulpe, stvara se ogromna količina otpada u obliku lišća, pseudostema, stabljike i kore. Među njima, kora banane čini glavni dio voća, što čini 30 % - 40 % (w/w) svježeg voća banane. Udio od 36 milijuna t nastalog otpada kore banane dovodi do problema gospodarenja otpadom i njegovog sigurnog odlaganja (Vu i sur., 2018; Pathak i sur., 2016). Kako bi se smanjio udio otpada kore banane koji se nekontrolirano odlaže postoje različiti načini njegove valorizacije, a oni su shematski prikazani na slici 1.



Slika 1. Valorizacija kore banane (prema Pathak i sur., 2016)

Što se tiče kemijskog sastava, ugljikohidrati i prehrambena vlakna čine većinu suhe tvari kore banane, ali može se naći i značajan udio proteina, kalija, esencijalnih aminokiselina i polinezasićenih masnih kiselina. Kora banane također predstavlja izvrstan izvor polifenolnih spojeva, poput galokatehina i katekolamina, osobito dopamina, za čiji je udio utvrđeno da je mnogo veći u kori u usporedbi s pulpom banane (Kanazawa i Sakakibara, 2000). Kora banane se pokazala kao vrlo značajan izvor ferulinske kiseline (iz 100 g kore banane može se ekstrahirati 60 mg ferulinske kiseline) koja se dalje može koristiti kao supstrat u proizvodnji biovanilina koji je vrlo važna komponenta u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Saeed i sur., 2021). Nadalje kora banane je izrazito bogata prehrambenim vlaknima. Prehrambena vlakna u kori banane se dijele na netopljiva i topljiva prehrambena vlakna. Od netopljivih prehrambenih vlakana najviše su zastupljeni hemiceluloza (20,3 %), celuloza (18,7 %) i lignin (16,8 %), dok je od topljivih prehrambenih vlakana u kori banane najviše zastupljen pektin (15,9 %) (Pereira i sur., 2020).

2.1.2. Ljuska luka

Luk (*Allium cepa*) je po uzgoju drugi veliki važan hortikulturni usjev na svijetu, a Kina i Indija su glavne zemlje za uzgoj luka (Pal i Jadeja, 2018). Ukupna globalna proizvodnja luka u 2017.

godini iznosila je 98 milijuna t od čega je 10 milijuna t proizvedeno u Europi, što rezultira i velikim udjelom nastalog nusprodukta proizvodnje, odnosno ljuske luka (Ersoy i sur., 2019). Procjenjuje se da Indija svakodnevno proizvodi oko 300-500 kg ljuske luka. Nadalje, Kalifornija proizvodi 0,1 milijuna t otpada od luka, dok europske zemlje Španjolska, Nizozemska i Velika Britanija godišnje proizvode više od 0,5 milijuna t otpada od luka (Pal i Jadeja, 2018). U pravilu se prilikom prerade luka oko 37 % odbacuje kao otpad. Otpad od luka uključuje ljusku luka, dvije vanjske mesnate ljuske, korijenje, vrh i dno glavice luka, a također i premale, deformirane, bolesne ili oštećene glavice (Ersoy i sur., 2019). Taj otpad može imati štetne učinke na okoliš ako se ne odlaže pravilno, jer nije prikladan za daljnju uporabu u prehrambenoj industriji obzirom na jaku aromu luka, niti se može koristiti kao gnojivo. Stoga otpad od luka ostaje nedovoljno iskorišten čak i kao bogat izvor bioaktivnih spojeva kao što su fenoli, flavonoidi i flavanoli (Kumar i sur., 2022). Ljuska luka bogatija je ukupnim flavonoidima u usporedbi s jestivim mesom. Najzastupljeniji flavonoid prisutan u ljuski luka je kvercetin (Ersoy i sur., 2019). Kvercetin je koncentriran u suhoj ljuski luka gdje njegovi oksidacijski produkti, 3,4-dihidroksibenzoična kiselina i 2,4,6-trihidroksifenilglikozilna kiselina daju smeđu boju i pružaju lukovici zaštitu uslijed mikrobne infekcije tla (Ersoy i sur., 2019). Za kvercetin su opisana mnogobrojna zdravstveno - korisna svojstva, uključujući antioksidativna, protuupalna, antialergijska, antivirusna i antikancerogena djelovanja, kao i funkcija ublažavanja nekih kardiovaskularnih bolesti (tj. srčanih bolesti, hipertenzije i visokog kolesterola u krvi), pa čak i poremećaja raspoloženja (Ersoy i sur., 2019).

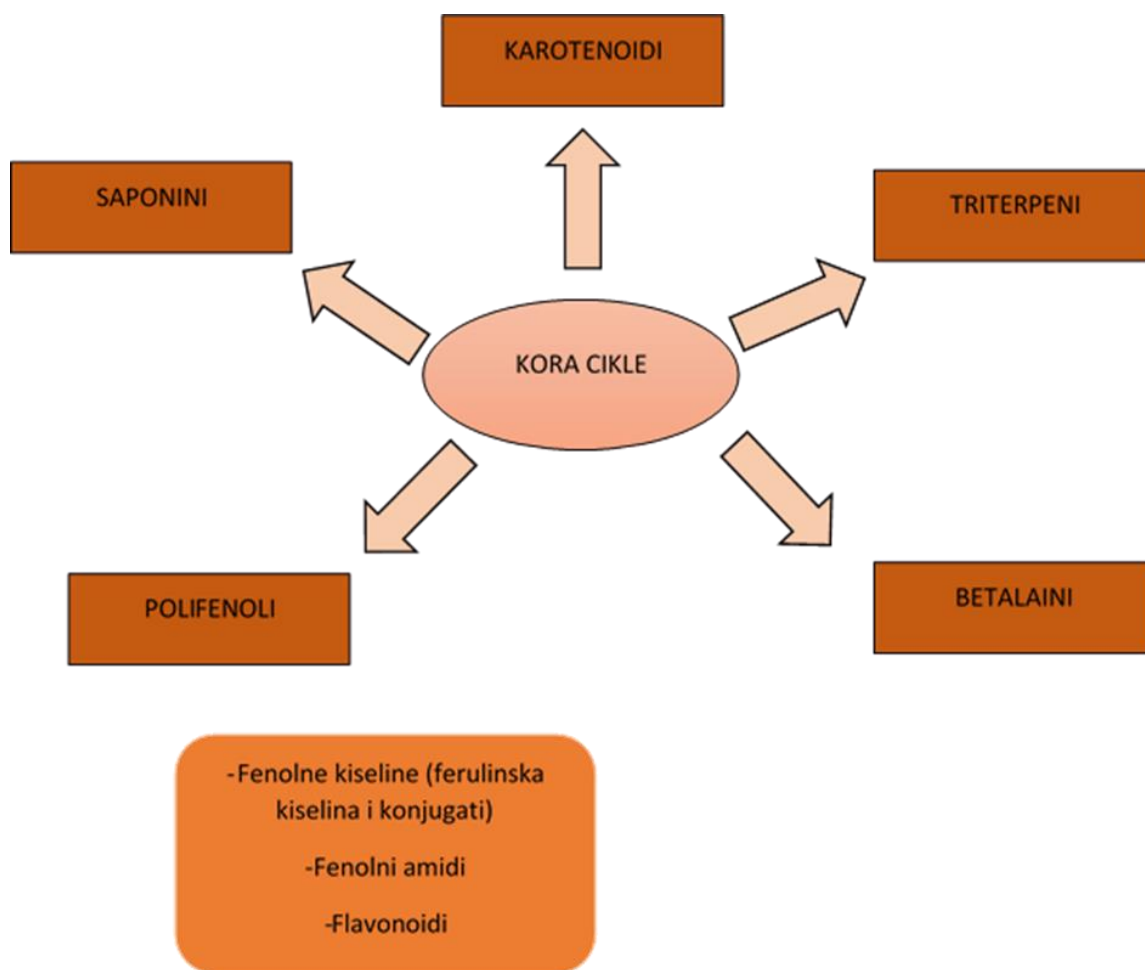
2.1.3. Mahuna graška

Mahuna graška je nusproizvod u proizvodnji zelenog graška (*Pisum sativum* L.). Prazne mahune graška čine 30–67 % mase ubranog proizvoda (cijele mahune) (Garg, 2015). Prema podacima FAO-a, svjetska proizvodnja zelenog graška u 2018. iznosila je 21,22 milijuna t, pri čemu je otprilike 4,25 % došlo iz Europske unije, a Francuska je bila vodeći proizvođač s otprilike 251 000 t (FAO, 2020). Mahune graška uglavnom se koriste za stočnu hranu, ali veliki udio polisaharida staničnih stijenki i sekundarnih metabolita promiče ih u vrijedne sekundarne sirovine za proizvodnju energije, materijala i kemikalija ili kao nove i nekonvencionalne izvore funkcionalnih sastojaka (Wadhava i sur., 2006). Osim njegove nutritivne važnosti, konzumacija graška povezana je s potencijalno korisnim svojstvima koja povoljno utječu na zdravlje, uključujući laksativni, adstrigentni, antifungalni i antikancerogeni učinak te povoljno utječe na prevenciju pretilosti i kardiovaskularnih bolesti (Zilani i sur., 2017). Unatoč značajnim podacima o kemijskom i bioaktivnom sastavu sjemenki graška, relativno se malo zna o sastavu

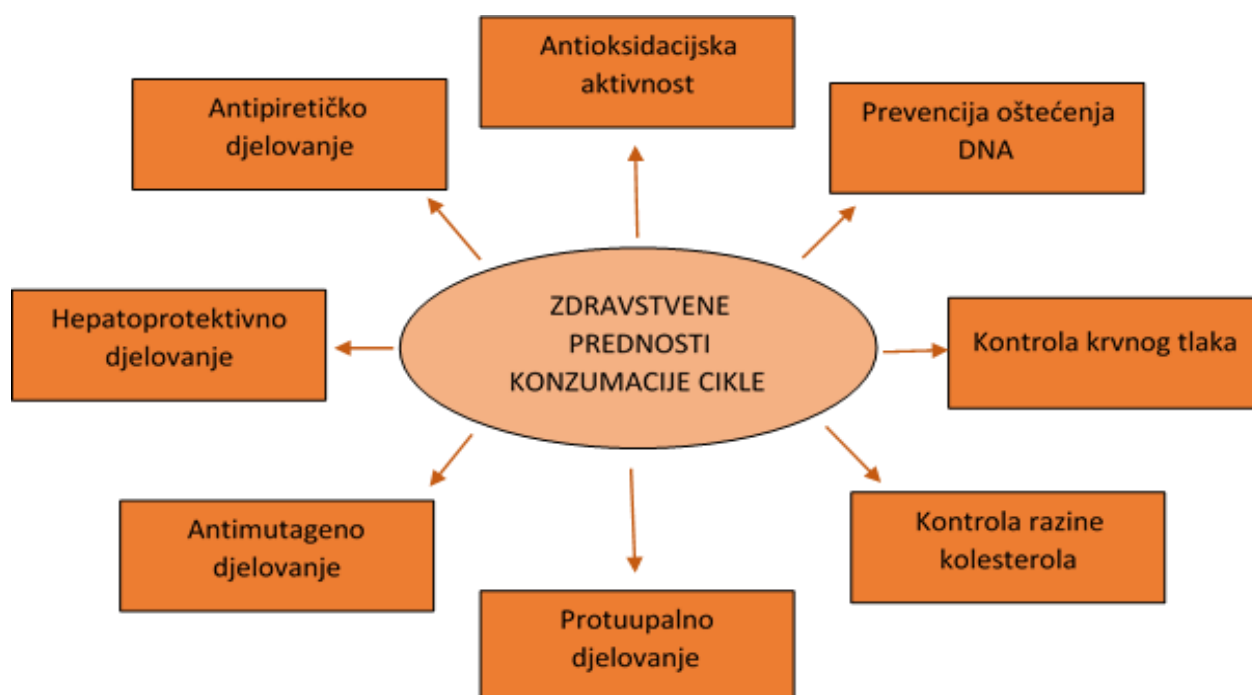
mahune graška, koja predstavlja glavni nusproizvod prerade graška (Mejri i sur., 2019). Prema nedavno provedenim istraživanjima mahune graška sadrže 51 % vlakana, 28,2 % ugljikohidrata, 14,2 % proteina, 4,5 % lipida i 4,5 % pepela što većinom čine K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn i Cu (silaznim redoslijedom), dok je profil masnih kiselina pokazao da su linolna, linolenska i palmitinska masna kiselina glavne komponente (Mejri i sur., 2019). Iskorištenje, tj. valorizacija mahuna graška, uključuje proizvodnju bioetanol, polisaharida i ugljikohidrata uz njihovu uporabu kao izvor prehrambenih vlakana (Mejri i sur., 2019). Općenito, postupci vodene ekstrakcije polifenolnih spojeva smatraju se najzelenijim pristupima za smanjenje utjecaja na okoliš i uporabu aktivnih molekula iz agroindustrijskog otpada. Vodeni polifenolni ekstrakti mahune graška mogli bi se koristiti kao inovativni sastojak mnogih funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Castaldo i sur. 2022).

2.1.4. Kora cikla

Cikla (*Beta vulgaris*) je uvrštena u 10 vrsta povrća s najvećom antioksidativnom aktivnošću, uglavnom zbog crveno-ljubičastih pigmenata koji se nazivaju betacijanini, a posebno betanin (da Silva i sur., 2019; Vinson i sur., 1998). Budući da su primjenu betanina kao bojila hrane odobrili EFSA i FDA, a zbog porasta potražnje za prirodnim bojilima za hranu, globalna potrošnja ekstrakata cikla se povećala. Udio betaninskih i fenolnih spojeva u ciklu veća je u kori nego u mesu i kruni, što ukazuje na mogućnost ekstrakcije tih spojeva iz kore (slika 2) (Kujala i sur., 2000). Kora crvene cikla poznata je i po visokom udjelu ferulinske kiseline, koja je karakteristična i za ostale vrste koje sadrže betalaine (Kujala i sur., 2001). Betalaini su derivati betalamične kiseline koji su topivi u vodi i mogu se podijeliti u dvije grupe spojeva: betacijanini (crveno-ljubičasti) i betaksantini (žuto-narančasti). Glavni betacijanin u ciklu je betanin, koji čini do 90% crvenog pigmenta (Dhiman i sur. 2021). Pigmenti ekstrahirani iz cikla koriste se kao prehrambena bojila u prehrambenoj industriji i poznati su kao "crvena cikla" te se koriste za poboljšavanje crvene boje džema, želea, žitarica za doručak, slatkiša, juha, slastica, pasti od rajčice, itd., a u Europi i SAD-u se klasificira kao E-broj - E162 (Dhiman i sur. 2021). Zdravstvene prednosti konzumacije cikla su mnoge te su prikazane na slici 3.



Slika 2. Bioaktivne komponente kore cikla (prema Dhiman i sur. 2021)



Slika 3. Zdravstvene prednosti konzumacije cikla (prema Dhiman i sur., 2021)

2.1.5. Ljuska kakaovog zrna

Kakao (*Theobroma cacao* L.) se uglavnom proizvodi u zapadnoafričkim zemljama, najviše u Obali Bjelokosti i Gani (60 % od ukupnog kakaa na svijetu), ali se obično prerađuje u Europskoj uniji, Indoneziji, Sjedinjenim Američkim Državama i Brazilu (Cinar i sur., 2021). Zrna kakaa su važni izvori polifenolnih spojeva, kao što su flavan-3-oli (monomerni epikatehin, katehin, oligomeri i proantocijanidini) i flavonoli (kvercetinski glikozidi). Osim toga, zrna kakaa sadrže visoki udio metilksantina teobromina (Barbosa-Pereira i sur., 2018). Pokazalo se da konzumacija kakaa pozitivno utječe na ljudsko zdravlje zbog antioksidativnih svojstava ovih bioaktivnih spojeva. Posljednjih godina potrošnja kakaa se povećala i posljedično tome se velike količine ljuske kakaovog zrna proizvode kao nusproizvod (Barbosa-Pereira i sur., 2018). Iako ovaj nusproizvod predstavlja problem zbrinjavanja, također može biti izvor polifenolnih spojeva koji imaju veliki potencijal u industrijskim primjenama kao prehrambeni aditivi, sastojci ili dodaci visoke nutritivne vrijednosti (Martínez-Pinilla i sur., 2015). Ljuska kakaovog zrna sastoji se od lignin-celuloznog kompleksa posebno bogatog dijetalnim vlaknima (18 – 60 %) i drugim komponentama (Vásquez i sur., 2019). Kakaovac je važna sirovina u svijetu i glavni sastojak u proizvodnji čokolade. Međutim, cijeli plod kakaovca može se koristiti za proizvodnju širokog asortimana proizvoda, kao što su hrana za životinje, kakao maslac i prah, bezalkoholna pića, alkohol, džemovi, slastičarski proizvodi i kozmetika (Cinar i sur., 2021). Što se tiče ljudskog zdravlja, dokazano je da frakcije i ekstrakti ljuski kakaovog zrna pokazuju pozitivna svojstva, kao što je smanjenje incidencije kroničnih bolesti (pretilosti, dijabetesa i raka), veća kontrola u poremećajima prehrane te zaštitna aktivnost protiv ishemijskih oštećenja u ljudskim stanicama (Vásquez i sur., 2019).

2.1.6. Ljuska oraha

Ljuska oraha (*Juglans*) je tvrdi i zaštitni sloj koji ima barijernu ulogu između sjemena i njegove okoline (Xiao i sur., 2020). Među agro-industrijskim ostacima, ljuske oraha zauzimaju veliki udio jer se orašasti plodovi značajno konzumiraju u cijelom svijetu. Trenutna potražnja za orasima, zajedno s lješnjacima, vrlo je visoka zbog njihove višestruke alimentarne primjene (proizvodnja likera, ulja, nugata i čokolade) kao i uz njihovu izravnu potrošnju u prehrani (Morales i sur., 2022). Budući da jestivi dio oraha ne čini više od 50 - 60 % njihove ukupne mase, ukupni udio godišnje proizvedenih ljuski oraha je značajan. Svjetska proizvodnja cijelih oraha (zrna s ljuskom) u 2018. godini iznosila je oko 3,66 milijuna t, od čega se 5,63 % odnosilo na Europsku uniju, pri čemu je Rumunjska glavni proizvođač (gotovo 56 000 t), a slijedi Francuska (gotovo 37 000 t) (FAO, 2020). Budući da su ljuske oraha dio lignocelulozne

biomase, mogle bi se valorizirati biorafinerijskim pristupom kako bi se izdvojili njihovi različiti sastojci (Morales i sur., 2020). Iako su se nedavno počele koristiti kao prirodne boje u tekstilnoj industriji, zbog svog sastava ($\approx 30\%$ hemiceluloza, $\approx 20\%$ celuloze, $> 35\%$ lignina) s gledišta biorafinerije, ljuske oraha mogle bi biti obećavajući izvor lignina (Morales i sur., 2022). Nadalje, ljuske oraha dobri su izvori bioaktivnih spojeva koje imaju sposobnost smanjenja rizika od raka, kardiovaskularnih bolesti, alergija i molekularne oksidacije (Simsek i Süfer, 2021).

2.2. JESTIVI FUNKCIONALNI FILMOVI

Sustavi pakiranja hrane imaju različite funkcije, uključujući one povezane s informacijama, čuvanjem i skladištenjem proizvoda te marketingom. Njihova glavna funkcija je odvajanje hrane od okoline, smanjenje interakcije s faktorima kvarenja (kao što su mikroorganizmi, vodena para i kisik) i izbjegavanje gubitaka poželjnih spojeva (npr. hlapljivih spojeva koji najviše doprinose mirisu i okusu proizvoda), čime se produljuje rok trajanja hrane (Mohamed i sur., 2020). Problem u prehrambenoj industriji je taj da polimeri koji se koriste u pakiranju hrane su neobnovljivi i nerazgradivi. Iz toga razloga uvelike se istražuju mogućnosti aplikacije jestivih filmova i premaza u prehrambenoj industriji (Mohamed i sur., 2020). Jestivi filmovi i premazi su tanki, zaštitni, jestivi i biorazgradivi slojevi premazani ili omotani oko površine hrane. Za izradu jestivih filmova i premaza koriste se biopolimeri koji se mogu miješati sa plastifikatorima ili drugim aditivima koji su dopušteni za uporabu u prehrambenim proizvodima, kako bi se poboljšala fizička i funkcionalna svojstva jestivih filmova i premaza. Osnovni materijali koji se koriste za izradu jestivih filmova i premaza su proteini, polisaharidi i lipidi (Vukić i sur., 2017). Jestivi filmovi i premazi mogu pružiti sigurnost za svježiju hranu, a također mogu dati isti rezultat kao pakiranje u modificiranoj atmosferi (Mohamed i sur., 2020). Jedno od ključnih svojstava jestivih filmova je debljina filma. Debljina filma ovisi o viskozitetu pripremljene otopine filma tj. što je viskozitet filma veći, film se teže razlijeva i samim time je veća i debljina filma (Han, 2014).

Nadalje, jestivi filmovi se mogu proizvoditi na različite načine, a korištene tehnike proizvodnje su ekstruzija, lijevanje otopine jestivog filma, premazivanje, prskanje i uranjanje (Garcia i sur., 2016). U tablici 1 prikazane su neke vrste jestivih funkcionalnih filmova i njihove najznačajnije karakteristike.

Tablica 1. Vrste jestivih funkcionalnih filmova i njihove najznačajnije karakteristike

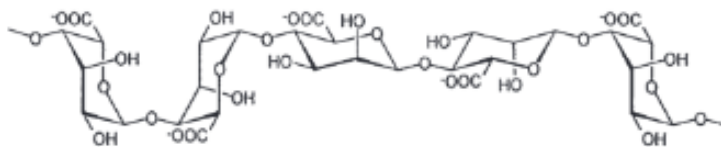
Vrsta jestivog funkcionalnog filma	Karakteristike
1. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore banane (Taweecat i sur., 2021; Medeiros i sur., 2020; Zhang i sur., 2019)	- debljina: 0.030 – 0.047 mm - parametri boje: $L^* = 49.6 \pm 51.1$, $a^* = 0.21 \pm 0.43$, $b^* = 1.26 \pm 1.4$ - udio ukupnih polifenola - 3.48 ± 0.15 mg/ml. - filmovi kompaktnog i hrapavog izgleda - koncentracija ekstrakta kore banane u filmu: 12 % (v/v)
2. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima ljuske luka (Thivya i sur., 2021)	- debljina: 0.087 – 0.126 mm. - parametri boje: $L^* = 31,27 \pm 0,53$, $a^* = 1,83 \pm 0,03$, $b^* = 8,27 \pm 0,27$ - udio ukupnih polifenola - 20.12 ± 44.55 mg GAE g⁻¹ - koncentracije ekstrakta ljuske luka: 0,2 i 0,5 %
3. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima ljuske kakovog zrna (Karača i sur., 2019)	- debljina: 0,165 – 0,362 mm - suha tvar filmova: 82.88 % - 87.11 % - udio teobromina u filmu na bazi alginata sa dodatkom ekstrakta ljuske kakaovog zrna: 593.25 ± 3.16 µg g⁻¹ - u funkcionalnim jestivim filmovima koji uz dodatak ekstrakta ljuske kakaovog zrna sadrže i dodatak biljnih proteina (npr. soje) dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenola u odnosu na kontrolu zbog nastajanja protein-polifenol kompleksa

Tablica 1. Vrste jestivih funkcionalnih filmova i njihove najznačajnije karakteristike (nastavak)

Vrsta jestivog funkcionalnog filma	Karakteristike
4. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima ljuske oraha (Villasante i sur., 2020)	- parametri boje: $L^* = 94.86$, $a^* = -0.11$, $b^* = 4.98$ - debljina: 0,076 mm - udjel ukupnih polifenola: 72.96 ± 0.02 mg GAE g⁻¹ s. tv. - koncentracije ekstrakata ljuske oraha u filmovima: 10 - 50 %
5. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore jabuke (Kumar i sur. 2020)	- Inhibicija oksidacije lipida i suzbijanje rasta mikroba na sirovim goveđim pljeskavicama. - Nema utjecaja na senzorske karakteristike sirove i kuhane goveđe pljeskavice.
6. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore naranče (Kumar i sur., 2020)	- Kombinacija kitozanskog filma s 2% koncentracije ekstrakta eteričnog ulja narančine kore bila je učinkovita u produljenju roka trajanja svježih škampa do 15 dana.
7. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore limuna (Kumar i sur., 2020)	- Dodavanje ekstrakta eteričnog ulja limunove kore (0,6 %) u jestive filmove koji su se primjenjivali na tofu i jagode značajno je uspjelo smanjiti njihovu razgradnju i kvarenje.
8. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore krumpira (Kumar i sur., 2020)	- Hladno dimljeni losos - populacija bakterijskog roda <i>Listeria</i> smanjila se sa 6,7 na 4,7 log CFU g⁻¹ do kraja skladištenja od 28 dana
9. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore manga (Yadav i sur., 2021)	- U provedenim istraživanjima produljen je rok trajanja rajčica (do 20 dana), crvenog čilija u prahu (do 180 dana) i badema.
10. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore šipka (Yadav i sur., 2021)	- Mango i rajčica – poboljšana fizikalno-kemijska svojstva, smanjeni gubitak vlage i produžen rok trajanja - Jezgra oraha - produžen rok trajanja smanjenjem lipidne peroksidacije te očuvane senzorske karakteristike

2.3. ALGINAT

Alginat (slika 4) je polisaharid koji ima linearnu strukturu koja se sastoji od β -D-manuronske kiseline i C-5 epimera α -L-glukoronske kiseline međusobno povezanih 1-4 glikozidnom vezom (Pawar, 2017).



Slika 4. Struktura linearnog lanca alginata (prema Pawar, 2017)

Alginat se može dobiti iz dva prirodna izvora: iz morskih algi ili kao egzopolisaharid iz određenih sojeva bakterija kao npr. *Pseudomonas aeruginosa*, no alginati koji se trenutno koriste u komercijalne svrhe proizvode se samo od algi (Pawar, 2017). Industrijska proizvodnja alginata iznosi oko 30 000 t godišnje, od čega je otprilike manje od 10 % biosintetizirano (Puscaselu i sur., 2020). Važan je u biomedicini zbog mogućnosti formiranja stabilnih hidrogelova te je kao takav pronašao primjenu u prehrambenoj, tekstilnoj i papirnoj industriji (Pawar, 2017). U prehrambenoj industriji se najviše koristi zbog svojih gelirajućih i stabilizirajućih svojstava, ali se i poboljšana svojstva hrane mogu postići zbog interakcije sa različitim komponentama hrane kao što su pozitivno nabijene aminokiseline denaturiranih proteina (Draget, 2016). Alginat je biorazgradivi i biokompatibilni prirodni materijal koji može apsorbirati 200 - 300 puta više vode od vlastite težine (Puscaselu i sur., 2020).

Natrijev alginat predstavlja najčešću sol alginata. Natrijev alginat je lako dostupan, ekološki je prihvatljiv i relativno je jeftin za proizvodnju. To je, zajedno s nekoliko drugih prednosti kao što su biokompatibilnost i netoksičnost, dovelo do razvoja višestrukih primjena alginata u prehrambenoj i biomedicinskoj industriji (Puscaselu i sur., 2020). Međutim, zbog svojih karakteristika, alginat također ima niz ograničenja, kao što su loša stabilnost ili niska mehanička i barijerna svojstva, nekompatibilnost s teškim metalima i nestabilnost tijekom toplinske obrade. Ta se svojstva mogu poboljšati kombiniranjem alginata s drugim biopolimerima, posebno onima na bazi proteina, ili sintetičkim polimerima tijekom proizvodnje (Puscaselu i sur., 2020).

2.4. BILJNI PROTEINI

Biljni proteini su predmet sve većeg interesa istraživača i potrošača zbog njihovih potencijalnih benefita na ljudsko zdravlje, kao i njihovog pozitivnog utjecaja na okoliš. Proces proizvodnje

biljnih proteina sastoji se od sljedećih važnih koraka: ekstrakcije biljnih proteina, frakcioniranja biljnih proteina te modifikacije biljnih proteina, koje uključuju fizikalnu, kemijsku i biološku modifikaciju (Sim i sur. 2021).

Povećana konzumacija biljnih proteina može biti povezana sa širokim rasponom pozitivnih zdravstvenih ishoda kao što su poboljšano liječenje dijabetesa, povećana zaštita od određenih vrsta raka, pozitivan utjecaj na zdravlje probavnog sustava i bolja mogućnost upravljanja tjelesnom masom (Ahnen i sur., 2019).

Osim kao dodatak prehrani, biljni proteinski prahovi (npr. bundeve, kikirikija, riže, soje, graška itd.) se mogu koristiti u obogaćivanju funkcionalnih jestivih filmova, ali i drugih prehrambenih proizvoda. Proteinski prah bundeve dobar je izvor prehrambenih vlakana, minerala i proteina te se koristi u prehrambenoj industriji za obogaćivanje raznih vrsta proizvoda kao što su kruh i ostali pekarski proizvodi i tjestenine (Kuchtova i sur., 2017). Nadalje, proteini riže se smatraju nutritivno bogatijima zbog većeg sadržaja aminokiseline lizina od bilo kojih drugih proteina žitarica (Panesar i Kaur, 2016). Daleko najširu primjenu u prehrambenoj industriji imaju proteini soje. Proteini soje imaju probavljivost vrlo sličnu probavljivosti proteina mesa te kao i proteini riže, bogati su na aminokiselini lizinu i imaju izrazito dobra funkcionalna svojstva koja uključuju emulgacijska svojstva, dobro vezanje vode, precipitirajuća i agregacijska te gelirajuća svojstva (Li i sur., 2021). Proteini soje se uspješno mogu koristiti u proizvodnji i obogaćivanju ravnih rezanaca od cjelovitih žitarica. Naime, prema Cao i sur. (2021) rezanci od cjelovitih žitarica sa dodatkom proteina soje sadržavali su veći udio hlapljivih komponenata te su senzorski bili prihvatljiviji od rezanaca bez dodatka proteina soje. Nadalje, proteini graška mogu se smatrati visokokvalitetnim proteinima zbog uravnoteženog omjera aminokiselina (Boukid i sur., 2021). Globalno tržište proteina graška procijenjeno je na 215,5 milijuna američkih dolara u 2019. godini, a predviđa se da će se povećati za 7,6 % tijekom razdoblja od 2020. do 2027. godine (Boukid i sur., 2021). Komercijalno, proteini graška dostupni su kao brašno, koncentrat ili izolati, no uključivanje proteina graška u različite funkcionalne prehrambene proizvode i dalje je izazovan zadatak za prehrambenu industriju uglavnom zbog izražajnog i karakterističnog okusa proteina graška te utjecaja na funkcionalna i tehnološka svojstva (Boukid i sur., 2021).

Osim svih navedenih korisnih svojstava biljnih proteina, oni ponekad, ovisno o vrsti biljnog proteina, mogu imati relativno loša funkcionalna svojstva, od kojih se mogu izdvojiti loša topljivost, pjenjenje, smanjeni stupanj emulgiranja i loša gelirajuća svojstva, ograničavajući njihovu primjenu u raznim vrstama prehrambenih proizvoda (Sim i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U radu je korišteno šest vrsta sekundarnih biljnih sirovina: kora banane (oznaka: KB; Costanza Organic Bananas, Ekvador), ljuska crvenog luka (oznaka: CL; menza Superfaks, Zagreb, Republika Hrvatska), ljuska kakaovog zrna (oznaka: KL; Kandit d.o.o., Osijek, Republika Hrvatska) te kora cikle (oznaka: KC), ljuska oraha (oznaka: LO) i mahuna graška (oznaka: MG) podrijetlom iz domaćinstva. Sve sirovine (osim kore banane) su sušene na sobnoj temperaturi do udjela suhe tvari > 85 %. Kora banane je najprije blanširana (7 min) te liofilizirana. Sirovine su nakon postupaka sušenja usitnjene te je provedeno prosijavanje kroz sito veličina pora 450 µm. Za analize je korištena frakcija manja od 450 µm.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) ili HPLC čistoće.

Određivanje ukupnih polifenola

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- 1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (0,094 mM otopina), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), FLUKA (Njemačka)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), FLUKA (Njemačka)
- Destilirana voda
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

- Kalijev persulfat (140 mM otopina), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- Acetonitril, HPLC kvaliteta, Fischer Scientific (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Analitički standardi polifenolnih spojeva:
 - *dopamin, Sigma-Aldrich (SAD)
 - *(-)-epikatehin (> 90 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - *galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
 - *kafetin, Sigma-Aldrich (SAD)
 - *kvercetin (> 97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - *kvercetin-3-glukozid, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
 - *kvercetin-3,4'-diglukozid (> 85 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - *protokatehinska kiselina (> 97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
 - *taksifolin, Sigma-Aldrich (SAD)
 - *teobromin, Sigma-Aldrich (SAD)
- Mravlja kiselina, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Voda HPLC kvalitete

Formulacija jestivih funkcionalnih filmova

- Alginat, Sigma-Aldrich (SAD)
- Destilirana voda
- Glicerol
- Proteini bundeve, Galleria Internatzionale d.o.o. (Austrija)
- Proteini kikirikija, Galleria Internatzionale d.o.o. (Austrija)
- Proteini riže, Galleria Internatzionale d.o.o. (Austrija)

3.1.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Analizator teksture TA.HDPlus, Stable Micro Systems (Cardiff, Velika Britanija)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Waltham, SAD)
- Digitalni mikrometar, Helios-Preisser, Type 40 EX (Njemačka)
- Kolorimetar CM-3500D, Konica Minolta (Tokio, Japan)

- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, propipete, plastične šprice, mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,45 μm (13/45), HPLC posude za uzorke (vials) s čepovima
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete, Eppendorf epruvete, Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, laboratorijske boce, pipete, epruvete
- Laboratorijska tresilica Certomat RM, Sartorius (Göttingen, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik, Instrumentaria (Zagreb, Hrvatska)
- Laboratorijska vaga (GF-3000 EC), A&D Instruments (Japan)
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg (Wertheim, Njemačka)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Francuska)
- Digitalni refraktometar MA 871, Milwaukee Instruments (Mađarska)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- UV-Vis Spektrofotometar Genesys 10S, Thermo Scientific, (SAD)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od vakuum otplinjača, kvarterne pumpe, automatskog uzorkivača s injektorom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina

Ekstrakcija se provodi u vodenoj kupelji na 100 °C kroz 30 min koristeći 1g uzorka i 50 mL otapala. Kao otapalo koristi se destilirana voda. Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakti se hlade i centrifugiraju (9500 rpm, 4 °C, 10 min) te se provodi vakuum filtracija i filtrati se sakupljaju u Eppendorf epruvete od 50 mL te čuvaju u hladnjaku do provođenja daljnjih analiza. Za svaki uzorak ekstrakcija je rađena u paraleli.

3.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina

Princip metode

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola (UP) temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli) pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton

i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon provedene reakcije, spektrofotometrijski se određuje intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL pripremljenog vodenog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Pripremljeni uzorci se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci, samo umjesto 100 µL uzorka dodaje se isti volumen destilirane vode. Za svaki uzorak ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina rađene su dvije paralele.

Izračun

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina DPPH metodom

Princip metode

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. U prisutnosti elektron donora dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu, čija apsorbancija mora biti ~ 1. U epruvetu se otpipetira 100 µL pripremljenog vodenog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min po dodatku

otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μL metanola te 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Za svaki uzorak ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina rađene se dvije paralele.

Izračun

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarnе krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarnе krivulje:

$$y = 0,603x - 0,006$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarnе krivulje konstruirane za standard Trolox-a koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}) određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina ABTS metodom

Princip metode

Metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom ABTS radikala i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS^+ radikala, tako što se pomiješa 88 μL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Pripremljenu otopinu je potrebno omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Prije analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS^+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Volumen od 20 μL pripremljenog vodenog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina pomiješa se s 2 mL otopine ABTS⁺ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka, 20 μL vode pomiješa s istom količinom reagensa. Za svaki uzorak ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina rađene se dvije paralele.

Izračun

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

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

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}) određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku.

3.2.5. Određivanje udjela polifenolnih spojeva HPLC metodom

Pojedinačni polifenolni određeni su primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). U analizi je korištena kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm , 100 Å) (Agilent Technologies, SAD). Uzorak je injektiran u sustav automatskim injektorom u volumenu od 5 μL , a elucija je provedena gradijentno dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 1 % (v/v) mravlja kiselina u vodi; B - 1 % (v/v) mravlja kiselina u acetonitrilu) i pri protoku od 1 mL min^{-1} . Gradijent je uspostavljen kako slijedi: 0. min – 7 % B, 5. min – 7 % B, 45. min – 40 % B, 47. min - 70% B, 52. min - 70% B + 10 min ekvilibracije na početne uvjete analize. Temperatura kolone iznosila je 25 °C. Detekcija analita omogućena je primjenom detektora s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), snimanjem pri valnim duljinama 260, 278, 320, 350 i 370 nm, što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara različitih polifenolnih spojeva koji su analizirani ovom metodom. Identifikacija pikova na kromatogramima uzoraka provedena je usporedbom retencijskih vremena s poznatim čistim standardima, kao i

usporedbom apsorpcijskih spektara snimljenih u valnom području 190 - 400 nm. Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je korištenjem konstruiranih baždarnih pravaca za pojedini standard. Jednadžbe baždarnih pravaca s koeficijentima determinacije te valne duljine detekcije pojedinih standarada i koncentracijski raspon u kojem baždarni pravci vrijede, prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca za odabrane standarde, koncentracijski raspon u kojem vrijede te valne duljine detekcije pojedinih standarada

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	R ²	Valna duljina (nm)	Koncentracijski raspon (µg mL ⁻¹)
Teobromin	y=1,4188x-0,85	1	278	2-100
Kvercetin	y=16,177x-7,04	1	350	2-100
Kvercetin-3-glukozid	y=10,742x-4,62	0,9999	350	2-100
Kvercetin-3,4-diglukozid	y=5,3531x-2,77	1	260	2-100
Taksifolin	y=1,2115x-0,09	0,9999	278	2-100
Galna kiselina	y=14,957x-4,05	1	278	2-100
Protokatehinska kiselina	y=20,07x-5,56	1	260	2-100
Kafein	y=15,367x-2,55	0,9999	278	2-100
Epikatehin	y=3,3554x-0,57	1	278	2-100
Dopamin	y=3,8415x-2	1	278	2-100

3.2.6. Formulacija jestivih funkcionalnih filmova

Za formulaciju jestivih funkcionalnih filmova korišteni su vođeni ekstrakti sekundarnih biljnih sirovina (postupak izrade objašnjen u poglavlju 3.2.1.), alginat, proteini riže, proteini kikirikija i proteini bundeve te destilirana voda i glicerol. Ukupno je izrađeno 28 filmova, a njihove oznake i sastav prikazani su u tablici 3. Kontrolni uzorci jestivih filmova sadržavali su destiliranu vodu umjesto ekstrakta.

Tablica 3. Sastav izrađenih funkcionalnih jestivih filmova

Uzorak	Oznaka uzorka	Voda/Ekstrakt	Alginat	Proteini riže	Proteini kikirikija	Proteini bundeve	Glicerol
K O N T R O L A	K 1	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	K 2	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	K 3	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	K 4	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g
K O R A B A N A N E	KB K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	KB 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	KB 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	KB 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g
L J U S K A L U K A	CL K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	CL 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	CL 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	CL 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g
K O R A C I K L E	KC K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	KC 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	KC 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	KC 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g

Tablica 3. Sastav izrađenih funkcionalnih jestivih filmova (nastavak)

Uzorak	Oznaka uzorka	Voda/Ekstrakt	Alginat	Proteini riže	Proteini kikirikija	Proteini bundeve	Glicerol
M A H U N A G R A Š K A	MG K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	MG 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	MG 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	MG 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g
K A K A O V A LJ U S K A	KL K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	KL 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	KL 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	KL 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g
LJ U S K A O R A H A	LO K	19,2 g	0,8 g				0,2 g
	LO 1	19 g	0,8 g	0,2 g			0,2 g
	LO 2	19 g	0,8 g		0,2 g		0,2 g
	LO 3	19 g	0,8 g			0,2 g	0,2 g

Za pripremu otopina filmova na tehničkoj vagi se odvažuje 0,8 g alginata, 0,2 g biljnog proteina i dodaje se vodenog ekstrakta sekundarnih biljnih sirovina ili destilirane vode do 20 g, ovisno o kojem se jestivom funkcionalnom filmu radi. Također, u otopinu filmova se dodaje i 0,2 g glicerola te se tako pripremljena otopina ostavi miješati na magnetnoj miješalici preko noći.

Nadalje, tako pripremljena otopina jestivih funkcionalnih filmova, tj. 10 mL otopine, se izljeva u Petrijeve zdjelice promjera 11,7 cm i suši se na sobnoj temperaturi kroz 3 dana.

Biljni proteini koji su korišteni u izradi jestivih funkcionalnih filmova za potrebe ovog rada su proteini bundeve, kikirikija i riže iz ekološkog uzgoja proizvođača Galleria internazionale d.o.o komercijalnog naziva Nutrigold. Nutritivni sastavi proteinskih prahova bundeve, kikirikija i riže korištenih u izradi jestivih funkcionalnih filmova prikazani su u tablicama 4, 5 i 6.

Tablica 4. Nutritivna tablica proteinskog praha bundeve (Nutrigold, deklaracija proizvoda)

Energetska vrijednost		1606 kJ/382 kcal
Masti		10,75 g
-nezasićene masne kiseline		2,1 g
Ugljikohidrati		17,25 g
-šećeri		15 g
Bjelančevine		51,4 g
Sol		<0,05 g

Tablica 5. Nutritivna tablica proteinskog praha kikirikija (Nutrigold, deklaracija proizvoda)

Energetska vrijednost		1536 kJ/367 kcal
Masti		13,3 g
-nezasićene masne kiseline		1,67 g
Ugljikohidrati		26,6 g
-šećeri		6,67 g
Bjelančevine		53,3 g
Sol		0 g

Tablica 6. Nutritivna tablica proteinskog praha riže (Nutrigold, deklaracija proizvoda)

Energetska vrijednost		1660 kJ/392 kcal
Masti		4,5 g
-nezasićene masne kiseline		2,2 g
Ugljikohidrati		2,9 g
-šećeri		1,25 g
Bjelančevine		83 g
Sol		<0,05 g

3.2.7. Određivanje topljive suhe tvari jestivih funkcionalnih filmova

Topljiva suha tvar jestivih funkcionalnih filmova određena je direktnim mjerenjem na refraktometru na način da su pripremljeni filmovi prethodno otopljeni u destiliranoj vodi.

3.2.8. Određivanje debljine jestivih funkcionalnih filmova

Debljina jestivih filmova određena je pomoću uređaja za mjerenje debljine (mikrometra) na 6 različitih mjesta na filmu te je određena srednja vrijednost debljine svakog jestivog funkcionalnog filma.

3.2.9. Određivanje parametara boje jestivih funkcionalnih filmova

Na kolorimetru su određivani parametri L^* , a^* i b^* za jestive funkcionalne filmove. Za svaki parametar provedena su 3 mjerenja na temelju kojih je određena srednja vrijednost za svaki parametar.

3.2.10. Određivanje teksture jestivih funkcionalnih filmova

Određivanje teksture jestivih filmova provodilo se na analizatoru teksture. Uzorak širine 1 cm i dužine 2 cm se podvrgavao istezanju te su se dobili podaci za maksimalnu silu do trenutka pucanja, elastičnost i rad na temelju kojih se izračunala vlačna čvrstoća svakog jestivog funkcionalnog filma.

3.2.11. Određivanje ukupnih polifenola u jestivim funkcionalnim filmovima

Najprije se u plastičnu epruvetu odvaže 0,1 g uzorka jestivog funkcionalnog filma te se otopi u 2 mL destilirane vode. Tako pripremljeni uzorak se dalje analizira kako je opisano u poglavlju 3.2.2.

3.2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova DPPH metodom

Uzorak jestivog funkcionalnog filma se pripremi kako je opisano u poglavlju 3.2.11. te se u 500 μ L tako pripremljenog uzorka doda 2,5 mL etanola (96 %-tni) kako bi se alginat precipitirao u etanolu. Zatim se antioksidacijski kapacitet funkcionalnih filmova DPPH metodom dalje odredi na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.

3.2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova ABTS metodom

Uzorak jestivog funkcionalnog filma se pripremi kako je opisano u poglavlju 3.2.12. te se antioksidacijski kapacitet funkcionalnih filmova ABTS metodom dalje odredi na način koji je opisan u poglavlju 3.3.3.

3.2.14. Određivanje polifenolnih spojeva u jestivim funkcionalnim filmovima HPLC metodom

Prije provođenja HPLC analize potrebno je pripremiti uzorak na način da se najprije odvaže 0,1 g jestivog funkcionalnog filma te se doda 1 mL destilirane vode i 1 mL etanola (96 %-tni). Tako pripremljeni uzorak se centrifugira (9500rpm, 4 °C, 10 min), filtrira preko celuloznog mikrofiltera i dalje analizira na HPLC uređaju kako je opisano u poglavlju 3.2.5.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sekundarne biljne sirovine koje se u velikim količinama generiraju preradom osnovnih sirovina u prehrambenoj industriji danas privlače veliku pozornost zbog svog bogatog kemijskog sastava i potencijala ponovne primjene u prehrani ljudi. Najvažniji sastojci takvih materijala su polifenolni spojevi koji se ističu svojim antioksidacijskim i drugim pozitivnim učincima na zdravlje. Isto tako pažnju u formulaciji novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda privlače i biljni proteini koji također poboljšavaju nutritivna svojstva takvih prehrambenih proizvoda. Vodeni ekstrakti sekundarnih biljnih sirovina, koji predstavljaju izvor polifenola, se mogu koristiti prilikom formulacije jestivih funkcionalnih filmova. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost iskorištenja polifenolnih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina u izradi jestivih funkcionalnih filmova te formulirati jestive funkcionalne filmove obogaćene ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima riže, kikirikija i bundeve te odrediti njihove kemijske i fizikalne karakteristike.

Za formulaciju jestivih funkcionalnih filmova tj. za pripremu polifenolnih vodenih ekstrakata korišteno je šest različitih vrsta sekundarnih biljnih sirovina (kora banane, ljuska luka, kora cikle, mahuna graška, ljuska kakaovog zrna i ljuska oraha). Pripremljenim polifenolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina određen je udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet DPPH i ABTS metodama te polifenolni sastav HPLC metodom.

Za potrebe ovog rada izrađeno je 28 jestivih funkcionalnih filmova te se njihove fotografije nalaze u nastavku. Provedbom analiza određeni su sljedeći parametri jestivih funkcionalnih filmova: topljiva suha tvar, debljina, boja i tekstura filmova. Nadalje, za izrađene jestive funkcionalne filmove također je određen udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet DPPH i ABTS metodama te polifenolni sastav HPLC metodom. Svi rezultati prikazani su u tablicama u nastavku.

4.1 Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (DPPH i ABTS) u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina

Ekstrakcija polifenola iz šest sekundarnih biljnih sirovina provedena je uz vodu kao otapalo na 100 °C kroz 30 min. Dobiveni ekstrakti su bili podvrgnuti centrifugiranju (9500 rpm, 4 °C, 10 min) te vakuumskoj filtraciji. Provedene se analize udjela ukupnih polifenola te antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata te su dobiveni rezultati koji su prikazani u tablici 7. Od dobivenih rezultata valja istaknuti kako je vodeni ekstrakti kore banane imao daleko najveću vrijednost udjela ukupnih polifenola (501 mg GAE L⁻¹) te sukladno tome i

najveći antioksidacijski kapacitet (1,52 mmol Trolox L⁻¹ (DPPH); 2,34 mmol Trolox L⁻¹ (ABTS)). Prema Rebello i sur. (2014) udio ukupnih polifenola u kori banane iznosio je 29,2 mg g⁻¹ suhe tvari, dok je antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom iznosio 242,2 mmol Trolox g⁻¹ suhe tvari. Nadalje, najmanji antioksidacijski kapacitet (0,16 mmol Trolox L⁻¹ (DPPH); 0,47 mmol Trolox L⁻¹ (ABTS)) i najmanji udio ukupnih polifenola (61,85 mg GAE L⁻¹) je imao vodeni ekstrakt mahune graška.

Tablica 7. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina

Uzorak	Udio ukupnih polifenola (mg GAE L ⁻¹)	Antioksidacijska kapacitet– DPPH (mmol Trolox L ⁻¹)	Antioksidacijska kapacitet– ABTS (mmol Trolox L ⁻¹)
KB	507,1±9,75	1,52±0,0012	2,343±0,0029
CL	239,6±5	1,04±0,0068	1,686±0,0355
KC	272,6±3	1,31±0,0102	1,968±0,0236
MG	61,85±4,125	0,16±0,0027	0,469±0,0145
KL	152,85±0,875	1,12±0,0060	1,606±0,0062
LO	84,1±0,5	0,59±0,0031	0,925±0,0046

*KB – kora banane, CL – ljuska crvenog luka, KC – kora cikla, MG – mahuna graška, KL – kakaova ljuska, LO – ljuska oraha

4.2. Udio polifenola u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina (HPLC)

Provedbom HPLC analize vodenih ekstrakta sekundarnih sirovina uspješno su detektirani i kvantificirani određeni polifenolni spojevi karakteristični za ekstrakte ljuske crvenog luka (CL), ljuske kakaovog zrna (KL), kore banane (KB) te ljuske oraha (LO), dok je zbog kompleksnosti sastava kore cikla (KC) i mahune graška (MG) detekcija i kvantifikacija karakterističnih polifenolnih spojeva izostala. Svi rezultati su prikazani u tablici 8 i izraženi u µg mL⁻¹. U vodenom ekstraktu kore banane identificiran je dopamin (156,76 µg mL⁻¹), dok su ekstraktu ljuske crvenog luka identificirani kvercetin, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3,4-diglukozid i taksifolin, od kojih je u najvećoj koncentraciji bio identificiran kvercetin-3,4-diglukozid (47,29 µg mL⁻¹). Za usporedbu Gonzalez – Montelongo i sur. (2010) su ustvrdili kako je koncentracija dopamina u kori banane iznosila 1,72 mg g⁻¹ suhe tvari, dok je u ljuski luka prema Kumar i sur. (2022) udio kvercetina ekstrahiranog vrućom vodom iznosio 25,78 mg g⁻¹ suhe tvari, a kvercetin-3,4-diglukozida ekstrahiranog etanolom 444,7 mg g⁻¹ suhe tvari. Nadalje, prisustvo teobromina, kafeina i epikatehina zabilježeno je u ljuski kakaovog zrna, od kojih je u najvećoj koncentraciji bio prisutan teobromin (1060,79 µg mL⁻¹), dok je u ekstraktu ljuske oraha bilo dokazano prisustvo galne (1,15 µg mL⁻¹) i protokatehinske kiseline (3,22 µg mL⁻¹). Mellina i sur. (2020) proveli su istraživanje između ostalog i na temu ekstrakcije polifenolnih spojeva

potpomognute mikrovalovima iz ljuske kakovog zrna te su odredili prisustvo teobromina (5,10-7,62 mg g⁻¹), kafeinske kiseline (0,66-0,89 mg g⁻¹) i epikatehina (1,07-2,03 mg g⁻¹).

Tablica 8. Udio polifenola u vodenim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina (HPLC metoda)

	KB	CL	KC	MG	KL	LO
Teobromin	-	-	-	-	1060,79±18,71	-
Kvercetin	-	5,59±1,67	-	-	-	-
Kvercetin-3-glukozid	-	4,28±0,08	-	-	-	-
Kvercetin-3,4-diglukozid	-	47,29±1,21	-	-	-	-
Taksifolin	-	27,35±0,35	-	-	-	-
Galna kiselina	-	-	-	-	-	1,15±0,07
Protokatehinska kiselina	-	-	-	-	-	1,77±0,01
Kafein	-	-	-	-	10,56±0,11	-
Epikatehin	-	-	-	-	3,22±0,01	-
Dopamin	156,76±1,06	-	-	-	-	-

*KB – kora banane, CL – ljuska crvenog luka, KC – kora cikla, MG – mahuna graška, KL – kakaova ljuska, LO – ljuska oraha

4.3. Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima bundeve, kikirikija i riže

Jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni polifenolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima izrađeni su prema tablici 3 te se njihove fotografije nalaze u nastavku ovog poglavlja (slika 5 – slika 32). Po završetku sušenja svi izrađeni filmovi su se jednostavno odvajali od Petrijeve zdjelice u koju su bili izlijevani. Prilikom sušenja kod nekih filmova je došlo do pucanja površine te se može istaknuti kako je do pucanja najviše dolazilo kod filmova koji su u svom sastavu sadržavali dodatak proteinskog praha riže. Jestivi funkcionalni filmovi bez dodatka biljnih proteina su imali glatku i sjajniju površinu od onih filmova koji su u svom sastavu sadržavali biljne proteine riže, kikirikija i bundeve.



Slika 5. Funkcionalni jestivi film K1



Slika 6. Funkcionalni jestivi film K2



Slika 7. Funkcionalni jestivi film K3



Slika 8. Funkcionalni jestivi film K4



Slika 9. Funkcionalni jestivi film KB K



Slika 10. Funkcionalni jestivi film KB 1



Slika 11. Funkcionalni jestivi film KB 2



Slika 12. Funkcionalni jestivi film KB 3

*K-kontrola, KB-kora banane



Slika 13. Funkcionalni jestivi film
CL K



Slika 14. Funkcionalni jestivi film CL
1



Slika 15. Funkcionalni jestivi film
CL 2



Slika 16. Funkcionalni jestivi film
CL 3



Slika 17. Funkcionalni jestivi film
KC K



Slika 18. Funkcionalni jestivi fim
KC 1



Slika 19. Funkcionalni jestivi film
KC 2



Slika 20. Funkcionalni jestivi film
KC 3

*K-kontrola, CL-ljuska crvenog luka, KC-kora cikle



Slika 21. Funkcionalni jestivi film MG K



Slika 22. Funkcionalni jestivi film MG 1



Slika 23. Funkcionalni jestivi film MG 2



Slika 24. Funkcionalni jestivi film MG 3



Slika 25. Funkcionalni jestivi film KL K



Slika 26. Funkcionalni jestivi film KL 1



Slika 27. Funkcionalni jestivi film KL 2



Slika 28. Funkcionalni jestivi film KL 3

*K-kontrola, MG-mahuna graška, KL-ljuska kakaovog zrna



Slika 29. Funkcionalni jestivi film LO K



Slika 30. Funkcionalni jestivi film LO 1



Slika 31. Funkcionalni jestivi film LO 2



Slika 32. Funkcionalni jestivi film LO 3

*K-kontrola, LO-ljuska oraha

4.4. Određivanje topljive suhe tvari, debljine i parametara boje jestivih funkcionalnih filmova

Po završetku formulacije i izrade jestivih funkcionalnih filmova određeni su parametri topljive suhe tvari, debljine i boje koji su prikazani u tablici 9. Suha tvar filmova kretala se u rasponu od 67,13 % do 95,83 % (uključujući kontrole), pri čemu je najmanji udio suhe tvari sadržavao jestivi funkcionalni film obogaćen polifenolnim ekstraktom kore cikla i proteina kikirikija (KC 2), a najveći udio suhe tvari sadržavao je jestivi funkcionalni film obogaćen polifenolnim ekstraktom ljuske luka i proteina bundeve (89,03 %; CL 3). Debljina izrađenih jestivih funkcionalnih filmova je bila u rasponu cca. od 30 μm do 150 μm ovisno o sastavu filmova. Najveću debljinu su imali oni funkcionalni jestivi filmovi koji su u svom sastavu imali dodatak proteina bundeve. Određena debljina jestivih funkcionalnih filmova se u vrijednostima slaže sa podacima koji su dostupni u literaturi, a prikazani su u tablici 1.

Tablica 9. Topljiva suha tvar, debljina i parametri boje jestivih funkcionalnih filmova

Uzorak	Suha tvar (%)	Debljina (μm)	L*	a*	b*
K 1	92,71	110,67 $\pm$ 14,48	92,56 $\pm$ 0,35	-0,44 $\pm$ 0,01	4,48 $\pm$ 0,32
K 2	74,99	105,33 $\pm$ 23,50	87,95 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,04	12,74 $\pm$ 0,5
K 3	86,10	153,33 $\pm$ 3,94	88,20 $\pm$ 1,38	-0,28 $\pm$ 0,07	9,56 $\pm$ 0,41
K 4	90,79	56,67 $\pm$ 12,68	89,54 $\pm$ 0,14	-1,74 $\pm$ 0,02	10,12 $\pm$ 0,16
KB K	94,62	63,67 $\pm$ 5,34	86,01 $\pm$ 0,99	-0,48 $\pm$ 0,03	9,55 $\pm$ 0,97
KB 1	81,82	90,67 $\pm$ 10,61	80,53 $\pm$ 0,39	0,63 $\pm$ 0,07	15,85 $\pm$ 0,31
KB 2	80,22	119,33 $\pm$ 33,5	83,95 $\pm$ 0,38	-0,25 $\pm$ 0,04	13,06 $\pm$ 0,50
KB 3	85,20	138,83 $\pm$ 15,87	81,01 $\pm$ 0,36	-1,00 $\pm$ 0,04	15,07 $\pm$ 0,60
CL K	95,83	33,83 $\pm$ 5,87	79,15 $\pm$ 0,82	3,64 $\pm$ 0,40	24,92 $\pm$ 0,73
CL 1	82,05	104,00 $\pm$ 11,08	75,32 $\pm$ 1,09	6,26 $\pm$ 0,59	25,02 $\pm$ 0,43
CL 2	82,85	121,67 $\pm$ 17,83	75,71 $\pm$ 1,27	4,73 $\pm$ 0,65	25,59 $\pm$ 1,01
CL 3	89,03	89,67 $\pm$ 12,22	73,09 $\pm$ 0,82	4,61 $\pm$ 0,37	27,61 $\pm$ 0,38
KC K	95,20	40,17 $\pm$ 5,15	55,91 $\pm$ 1,84	28,88 $\pm$ 2,34	8,96 $\pm$ 1,48
KC 1	74,05	81,33 $\pm$ 5,53	52,45 $\pm$ 0,44	25,85 $\pm$ 0,52	9,55 $\pm$ 0,33
KC 2	67,13	71,67 $\pm$ 4,31	58,92 $\pm$ 0,72	15,00 $\pm$ 0,41	20,44 $\pm$ 0,67
KC 3	75,07	124,17 $\pm$ 14,74	61,89 $\pm$ 0,48	6,01 $\pm$ 0,23	26,75 $\pm$ 0,37
MG K	87,07	47,33 $\pm$ 5,50	89,77 $\pm$ 0,46	-0,27 $\pm$ 0,03	10,90 $\pm$ 0,93
MG 1	79,40	77,67 $\pm$ 6,94	83,46 $\pm$ 1,04	-0,97 $\pm$ 0,03	19,35 $\pm$ 1,81
MG 2	82,84	90,00 $\pm$ 5,23	86,38 $\pm$ 0,17	-0,18 $\pm$ 0,02	14,36 $\pm$ 0,23
MG 3	87,26	123,67 $\pm$ 14,60	82,65 $\pm$ 0,19	-1,99 $\pm$ 0,07	15,99 $\pm$ 3,84
KL K	93,52	40,83 $\pm$ 4,37	77,94 $\pm$ 0,68	5,68 $\pm$ 0,48	19,96 $\pm$ 0,75
KL 1	77,37	62,33 $\pm$ 4,82	77,07 $\pm$ 0,26	4,46 $\pm$ 0,10	19,29 $\pm$ 0,45
KL 2	85,80	79,50 $\pm$ 5,88	78,91 $\pm$ 0,48	3,00 $\pm$ 0,16	17,92 $\pm$ 0,17
KL 3	85,51	92,50 $\pm$ 4,50	77,65 $\pm$ 0,27	2,69 $\pm$ 0,07	18,49 $\pm$ 0,27
LO K	87,50	30,50 $\pm$ 4,11	86,86 $\pm$ 0,18	0,30 $\pm$ 0,01	7,08 $\pm$ 0,24
LO 1	76,53	76,00 $\pm$ 3,56	80,30 $\pm$ 0,70	1,65 $\pm$ 0,13	14,66 $\pm$ 0,48
LO 2	81,75	69,67 $\pm$ 4,75	81,26 $\pm$ 0,77	2,30 $\pm$ 0,14	12,90 $\pm$ 0,89
LO 3	75,63	104,67 $\pm$ 6,65	79,35 $\pm$ 0,7	0,51 $\pm$ 0,15	13,54 $\pm$ 0,58

*K-kontrola, KB-kora banane, CL-ljuska crvenog luka, KC-kora cikla, MG-mahuna graška, KL-ljuska kakaovog zrna, LO-ljuska oraha

4.5. Tekstura jestivih funkcionalnih filmova

Na uređaju za određivanje teksture određeni su sljedeći parametri: maksimalna sila (N), elastičnost (mm) i rad (mJ) te je na osnovu tih rezultata i površine uzorka (200 mm) određena i vlačna čvrstoća za svaki uzorak. Dobiveni rezultati se nalaze u tablici 10. Najveće vrijednosti vlačne čvrstoće pokazali su jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni polifenolnim ekstraktom mahune graška i proteina kikirikija te jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni polifenolnim ekstraktom ljuske oraha i proteina bundeve ($0,18 \text{ N (mm}^2\text{)}^{-1}$). Prema podacima dostupnima u literaturi rastezna snaga filmova obogaćenima ekstraktima ljuske luka kretala se u rasponu od 7,05 do 18,37 MPa (Thivya i sur., 2021), dok se rastezna snaga funkcionalnih filmova s dodatkom kore banane kretala od 0,14 do 0,7 MPa (De Faria Arquela i sur., 2019).

Tablica 10. Tekstura jestivih funkcionalnih filmova

Uzorak	Maksimalna sila (N)	Elastičnost (mm)	Rad (mJ)	Vlačna čvrstoća (N (mm ²) ⁻¹)	Površina uzorka
K 1	30,83±3,46	-1,13±0,21	7237,17±2096,67	0,15±0,02	200
K 2	22,26±0,35	-0,18±0,03	914,70±0,82	0,11±0,00	200
K 3	19,79±1,84	-0,20±0,05	4470,90±1452,96	0,10±0,01	200
K 4	31,03±1,10	-0,19±0,02	4691,97±1822,91	0,16±0,00	200
KB K	24,97±1,19	-0,19±0,09	1001,63±252,22	0,13±0,01	200
KB 1	15,51±0,37	-0,03±0,01	1223,88±519,89	0,08±0,00	200
KB 2	12,28±0,51	-0,04±0,02	-44,24±337,05	0,06±0,00	200
KB 3	5,10±0,06	-1,99±0,98	622,85±11,94	0,03±0,00	200
CL K	26,93±1,08	-0,21±0,01	1310,26±171,95	0,14±0,01	200
CL 1	13,86±5,36	-0,06±0,03	905,40±219,24	0,07±0,03	200
CL 2	28,84±1,11	-1,77±0,79	973,01±183,07	0,14±0,01	200
CL 3	30,12±1,13	-1,39±0,65	575,25±30,63	0,15±0,01	200
KC K	5,40±0,70	-0,03±0,01	542,03±120,98	0,03±0,00	200
KC 1	26,80±0,18	-0,09±0,03	695,21±43,44	0,13±0,00	200
KC 2	2,98±0,98	-0,04±0,00	472,93±33,86	0,02±0,00	200
KC 3	7,48±0,61	-0,06±0,02	568,35±0,63	0,04±0,00	200
MG K	6,49±1,18	-0,04±0,00	775,92±9,40	0,03±0,01	200
MG 1	29,95±1,47	-0,44±0,12	2463,32±661,82	0,15±0,01	200
MG 2	35,66±0,85	-0,23±0,05	879,23±635,10	0,18±0,00	200
MG 3	19,09±8,06	-2,63±1,04	778,08±51,81	0,10±0,04	200
KL K	4,29±0,11	-0,03±0,02	1430,52±23,31	0,02±0,00	200
KL 1	3,12±0,88	-0,10±0,05	668,52±167,90	0,02±0,00	200
KL 2	19,30±4,21	-2,41±1,15	1505,93±127,67	0,10±0,02	200
KL 3	19,44±6,65	-0,13±0,04	1159,55±330,69	0,10±0,03	200
LO K	21,24±0,62	-0,05±0,02	-626,42±427,13	0,11±0,00	200
LO 1	1,61±0,25	-0,06±0,00	-66,32±41,31	0,01±0,00	200
LO 2	24,10±0,31	-0,53±0,16	2452,23±830,11	0,12±0,00	200
LO 3	34,95±0,28	-0,12±0,06	411,01±337,01	0,18±0,00	200

*K-kontrola, KB-kora banane, CL-ljuska crvenog luka, KC-kora cikle, MG-mahuna graška, KL-ljuska kakaovog zrna, LO-ljuska oraha

4.6. Udio ukupnih polifenola , antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH) u jestivim funkcionalnim filmovima

Provođenjem analiza udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova dobiveni su rezultati koji su prikazani u tablici 11. Moglo se pretpostaviti kako će rezultati za udjele ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet funkcionalnih filmova obogaćenih ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima po vrijednostima slijediti one dobivene za ekstrakte sekundarnih biljnih sirovina. Ta pretpostavka se potvrdila provedbom analiza ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta jestivih funkcionalnih filmova te su jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima kore banane imali najveće vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, dok su jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima mauhune graška imali najmanje vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta. Značajan udio ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet uz jestive funkcionalne filmove obogaćene ekstraktima kore banane pokazali su i jestivi funkcionalni filmovi obogaćeni ekstraktima ljuske crvenog luka i kore cikle u kombinaciji sa biljnim proteinima riže, kikirikija i bundeve. Prema podacima iz literature koji su prikazani u tablici 1, prilikom formulacija jestivih funkcionalnih filmova sa dodatkom biljnih proteina (npr.soje) došlo je do smanjenja vrijednosti udjela ukupnih polifenola u takvim filmovima u odnosu na kontrolu. Takvo smanjenje se objašnjava nastankom kompleksa protein-polifenol. No, provedbom analize ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta na formuliranim jestivim funkcionalnim filmovima takvi rezultati su izostali. Naime, došlo je do povećanja udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta kod svih jestivih funkcionalnih filmova obogaćenih ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina i biljnim proteinima u odnosu na kontrole koje nisu sadržavale biljne proteine.

Tablica 11. Udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH) u jestivim funkcionalnim filmovima

Uzorak	Udjel ukupnih polifenola (mg GAE g ⁻¹ s. tv.)	Antioskidacijska kapacitet DPPH (mmol Trolox g ⁻¹ s. tv.)	Antioksidacijska kapacitet ABTS (mmol Trolox g ⁻¹ s. tv.)
K 1	0,56±0,15	2,06±0,1	5,24±0,00
K 2	4,11±0,67	2,81±0,51	0,97±0,76
K 3	5,65±0,49	2,89±0,12	1,79±1,61
K 4	5,25±0,54	2,21±0,95	3,51±1,67
KB K	13,00±1,38	34,88±1,34	44,19±3,89
KB 1	13,27±1,07	43,42±1,06	51,51±8,95
KB 2	17,40±1,00	63,96±2,55	76,76±0,24
KB 3	16,90±0,46	28,60±0,45	38,28±4,48
CL K	8,52±0,06	23,67±1,23	37,69±0,75
CL 1	9,13±0,18	24,84±0,79	33,28±3,58
CL 2	14,68±0,68	20,24±0,22	31,73±1,12
CL 3	9,93±0,67	16,30±1,76	26,69±2,85
KC K	9,12±0,18	15,16±0,79	17,98±0,20
KC 1	11,28±0,21	20,83±1,06	29,69±4,21
KC 2	19,44±0,97	21,65±0,43	31,61±5,14
KC 3	11,77±1,29	16,57±1,09	23,30±2,41
MG K	4,84±1,64	1,54±0,22	8,05±1,75
MG 1	6,02±0,14	4,37±0,69	5,22±3,66
MG 2	6,37±0,00	4,17±0,66	25,50±10,92
MG 3	8,11±0,16	4,08±0,21	8,93±0,64
KL K	5,81±0,08	1,87±0,49	4,46±2,35
KL 1	6,97±1,84	7,72±1,00	9,12±1,98
KL 2	10,77±0,24	10,90±1,05	7,46±2,29
KL 3	8,97±0,47	5,90±0,54	0,38±0,21
LO K	5,32± 0,96	5,48±0,11	4,23±1,07
LO 1	6,19±0,27	2,30±0,51	5,81±0,51
LO 2	7,76±0,21	2,65±0,12	8,44±0,00
LO 3	9,61±1,04	2,11±0,62	4,90±3,22

*K-kontrola, KB-kora banane, CL-ljuska crvenog luka, KC-kora cikla, MG-mahuna graška, KL-ljuska kakaovog zrna, LO-ljuska oraha

4. 7. Polifenoli u jestivim funkcionalnim filmovima određeni HPLC metodom

Kako su HPLC analizom ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina uspješno identificirani i kvantificirani određeni polifenolni spojevi u ekstraktima kore banane, ljuske crvenog luka, ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha, daljnja HPLC analiza polifenolnog sastava filmova provedena je samo za filmove koji su u svojim formulacijama sadržavali te iste ekstrakte. U tablici 12 prikazani su rezultati HPLC analize polifenolnih spojeva jestivih funkcionalnih filmova sa dodatkom ekstrakta kore banane, ljuske crvenog luka, ljuske kakaovog zrna te ljuske oraha. Svi rezultati su izraženi u mg g^{-1} topljive suhe tvari filmova. U filmovima s dodatkom polifenolnog ekstrakta kore banane detektiran i kvantificiran je dopamin ($9,77 - 11,49 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.). Od filmova obogaćenih ekstraktom ljuske crvenog luka, najveći udio kvercetina ($7,02 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.) i taksifolina ($9,82 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.) imao je film koji u svom sastavu sadrži i dodatak proteina kikirikija. Nadalje, jestivi funkcionalni film obogaćen ekstraktom ljuske kakaovog zrna i proteinima riže je sadržavao teobromin u koncentraciji od $8,74 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv, a u svima jestivim funkcionalnim filmovima sa dodatkom ekstrakta ljuske oraha detektirana je galna kiselina u koncentracijskom rasponu od $0,13$ do $0,25 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv. Prema istraživanju koje su proveli Karača i sur. (2019) u kreiranim jestivim funkcionalnim filmovima na bazi ekstrakta kakaovog praha sa dodatkom proteina soje, pšenice i konoplje HPLC analizom identificirani i kvantificirani su teobromin ($427,36 - 1506,20 \mu\text{g g}^{-1}$) i kafein ($51,23 - 130,96 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tablica 12. Polifenolni spojevi u jestivim funkcionalnim filmovima određeni HPLC metodom

Uzorak	Teobromin	Kvercetin	Kvercetin- 3-glukozid	Kvercetin- 3,4,- diglukozid	Taksifolin	Galna kiselina	Protokatehinska kiselina	Kafein	Epikatehin	Dopamin
KB K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,49
KB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,77
KB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,46
KB 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,72
CL K	-	7,81	0,72	7,79	4,57	-	-	-	-	-
CL 1	-	4,99	0,62	1,20	3,62	-	-	-	-	-
CL 2	-	7,02	2,13	0,51	9,82	-	-	-	-	-
CL 3	-	6,52	2,23	2,50	-	-	-	-	-	-
KL K	77,28	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-
KL 1	8,74	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-
KL 2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,67	-
KL 3	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LO K	-	-	-	-	-	0,25	0,21	-	-	-
LO 1	-	-	-	-	-	0,13	0,10	-	-	-
LO 2	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-
LO 3	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-	-

*K-kontrola, KB-kora banane, CL-ljuska crvenog luka, KC-kora cikle, MG-mahuna graška, KL-ljuska kakaovog zrna, LO-ljuska oraha

5. ZAKLJUČCI

1. Od svih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina, ekstrakt kore banane imao je najveći udio ukupnih polifenola ($507,1 \text{ mg GAE L}^{-1}$) te najveći antioksidacijski kapacitet ($1,52 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (DPPH); $2,34 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (ABTS)). Prema dobivenim rezultatima dalje su slijedili ekstrakti kore cikla, ljuske luka, ljuske kakaovog zrna, ljuske oraha, dok je ekstrakt mahune graška imao najmanji udio ukupnih polifenola ($61,85 \text{ mg GAE L}^{-1}$) i najmanju antioksidacijski kapacitet ($0,16 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (DPPH); $0,47 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (ABTS)).
2. HPLC analizom u ekstraktima pojedinih sekundarnih biljnih sirovina određeni su pojedini specifični, dominantni spojevi: u ekstraktu kore banane dopamin ($156,76 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), u ekstraktu ljuske luka kvercetin-3,4-diglukozid ($47,29 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), u ekstraktu ljuske kakaovog zrna teobromin ($\mu\text{g mL}^{-1}$), a u ekstraktu ljuske oraha galna ($1,15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) i protokatehinska kiselina ($1,77 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).
3. Među formuliranim jestivim filmovima s ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina najbolja biokativna svojstva imao je film obogaćen korom banane, dok je najniži udio polifenola i antioksidacijska svojstva pokazivao film obogaćen ekstraktom mahune graška.
4. Kada se uzme u obzir i dodatak biljnih proteina u jestive funkcionalne filmove prema dobivenim rezultatima se može zaključiti kako je najveći porast udjela ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet u odnosu na kontrolu (KC K) ($9,12 \text{ mg GAE L}^{-1}$; $15,16 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (DPPH); $17,98 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (ABTS)) pokazao jestivi funkcionalni film obogaćen ekstraktom kore cikla i proteinima kikirikija (KC 2) ($19,44 \text{ mg GAE L}^{-1}$; $21,65 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (DPPH); $31,61 \text{ mmol Trolox L}^{-1}$ (ABTS)).
5. Dodatak proteina utjecao je na promjenu udjela polifenolnih spojeva karakterističnih za pojedinu biljnu sirovinu. Među funkcionalnim jestivim filmovima obogaćenih ekstraktom kore banane dopamin je u najvećem udjelu određen u filmu formuliranom uz dodatak proteina bundeve ($10,72 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$), dok je kvercetin dominirao u filmu obogaćenom ekstraktom ljuske luka uz dodatak proteina kikirikija ($7,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$). Među jestivim funkcionalnim filmovima obogaćenih ekstraktom ljuske kakaovog zrna najveći udio teobromina određen je u filmu s dodatkom proteina riže ($8,74 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$).
6. Sekundarne biljne sirovine kore banane, ljuske luka, kore cikla, mahune graška, ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha predstavljaju vrijedne izvore polifenolnih spojeva te se njihovi ekstrakti mogu uspješno koristiti u formulaciji jestivih funkcionalnih filmova te

je potrebno provoditi daljnja istraživanja i unaprijediti formulacije jestivih funkcionalnih filmova kako bi se u budućnosti otvorila mogućnost implementacije istih u proizvodnji raznih funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

6. LITERATURA

1. Ahnen RT, Jonnalagadda SS, Slavin JL (2019). Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. *Nutrition Reviews*. doi:10.1093/nutrit/nuz028.
2. Barbosa-Pereira L, Guglielmetti A, Zeppa G (2018) Pulsed Electric Field Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cocoa Bean Shell and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Tech*, **11**, 818–835. doi:10.1007/s11947-017-2045-6.
3. Boukid F, Rosell CM, Castellari M (2021) Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re)formulate innovative foods and beverages. *Trends Food Sci Tech*, **110**, 729–742. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.040.
4. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**, 25 - 30.
5. Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RCG, Gonçalves JL, Granato D, Pereira JAM, Barros L, Ferreira I (2020) Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods* **10**, 37. <https://dx.doi.org/10.3390/foods10010037> .
6. Cao Z, Liu Y, Zhu H, Li Y, Xiao Q, Yi C (2021). Effect of Soy Protein Isolate on Textural Properties, Cooking Properties and Flavor of Whole-Grain Flat Rice Noodles. *Foods*, **10**(5), 1085. doi:10.3390/foods10051085.
7. Castaldo L, Izzo L, Gaspari A, Lombardi S, Rodríguez-Carrasco Y, Narváez A, Grosso M, Ritieni A (2022) Chemical Composition of Green Pea (*Pisum sativum* L.) Pods Extracts and Their Potential Exploitation as Ingredients in Nutraceutical Formulations. *Antioxidants*, **11**, 105. <https://doi.org/10.3390/antiox11010105>.
8. Cinar ZÖ, Atanassova M, Tumer TB, Caruso G, Antika G, Sharma S, Pezzani R (2021) Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. *J Food Compos Anal*, **103**, 104115. doi:10.1016/j.jfca.2021.104115.
9. da Silva DVT, dos Santos Baião D, de Oliveira Silva F, Alves G, Perrone D, Del Aguila EM, Paschoalin VMF (2019) Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules*, **24**, 458.

10. De Faria Arquelau PB, Silva VDM, Garcia MAVT, de Araújo RLB, Fante CA (2018). Characterization of edible coatings based on ripe “Prata” banana peel flour. *Food Hydrocolloid*, **89**, 570-578. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.11.029.
11. Dhiman A, Suhag R, Chauhan DS, Thakur D, Chhikara S, Prabhakar PK (2021) Status of beetroot processing and processed products: Thermal and emerging technologies intervention. *Trends Food Sci Tech*, **114**, 443–458. doi:10.1016/j.tifs.2021.05.042.
12. Draget, K. I. (2016). Alginates: Fundamental Properties and Food Applications. Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03182-6>.
13. Ersoy ŞK, Tütem E, Başkan KS, Apak R (2019). Valorization of Red Onion Peels for Quercetin Recovery Using Quercetin-Imprinted Polymer. *J Chromatogr Sci*. doi:10.1093/chromsci/bmz079.
14. FAO. (2020). Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> .
15. Garcia MPM, Gomez-Guillen MC, Lopez-Caballero M, Barbosa-Canovas GV (2016) Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications, Taylor & Francis, Boca Raton.
16. Garg, M. (2015). Nutritional evaluation and utilization of pea pod powder for preparation of jaggery biscuits. *Food ProcesTechn*, **6**, 1–4.
17. González-Montelongo R, Lobo MG, González M (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem*, **119**(3), 1030–1039. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08012>.
18. Han, J. H. (2014). Edible Films and Coatings. Innovations in Food Packaging, 213–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>.
19. Kanazawa K, Sakakibara H (2000) High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. *J. Agric. Food Chem*, **48**, 844–848.
20. Karača S, Trifković K, Martinić A, Đorđević V, Šeremet D, Vojvodić Cebin A, Komes D (2019). Development and Characterization of Functional Cocoa (Theobroma cacao L.) Based Edible Films. *Int J Food Sci Tech*, **55**, 1326-1335. doi:10.1111/ijfs.14407.

21. Kuchtova V, Kohajdova Z, Karovicova J, Mesterova E (2017). The Potencial Use of Pumpkin Pomace in Cereal Products. *Chemicke Listy*, **110**, 808-811.
22. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K (2000) Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5338–5342.
23. Kujala T, Loponen J, Pihlaja K (2001) Betalains and Phenolics in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Peel Extracts: Extraction and Characterisation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **56**, 343–348. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-5-604>.
24. Kumar M, Barbhai MD, Hasan M, Punia S, Dhumal S, Rais N, Chandran D, Kothakota A, Tomar M, Satankar V, Senapathy M, Dey A, Sayed AAS, Gadallah FM, Amarowicz R, Mekhemar M (2022) Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. *Biomed Pharmacother* **146**. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112498>.
25. Kumar H, Bhardwaj K, Sharma R, Nepovimova E, Kuča K, Dhanjal DS, Kumar D (2020). Fruit and Vegetable Peels: Utilization of High Value Horticultural Waste in Novel Industrial Applications. *Molecules*, **25**(12), 2812. doi:10.3390/molecules25122812.
26. Lemes AC, Egea MB, Oliveira JGD, Gauterio GV, Ribeiro BD, Coelho MAZ (2022) Biological Approaches for Extraction of Bioactive Compounds From Agro-industrial By-products: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, 802543. doi:10.3389/fbioe.2021.802543.
27. Li YP, Sukmanov VA, Ma HJ (2021) The Effect of high pressure on soy protein functional features: A review. *J Chem Techn*, **29**, 77-91. doi:10.15421/082104.
28. Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R (2015) The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Front Pharmacol*, **6**, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00030>.
29. Medeiros Silva VD, Coutinho Macedo MC, Rodrigues CG, Neris dos Santos A, de Freitas e Loyola AC, Fante CA (2020). Biodegradable edible films of ripe banana peel and starch enriched with extract of *Eriobotrya japonica* leaves. *Food Bioscience*, 100750. doi:10.1016/j.fbio.2020.100750.

30. Mejri F, Ben Khoud H, Njim L, Baati T, Selmi S, Martins A, Hosni K (2019). In vitro and in vivo biological properties of pea pods (*Pisum sativum* L.). *Food Bioscience*, **32**, 100482. doi:10.1016/j.fbio.2019.100482.
31. Mohamed SAA, El-Sakhawy M, El-Sakhawy MA-Monem, (2020). Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review, *Carbohydrate Polymers*, 116178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>.
32. Morales A, Labidi J, Gullón P (2022) Integral valorisation of walnut shells based on a three-step sequential delignification. *J Environ Manage*, **310**, 114730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114730>.
33. Ough C. S., Amerine M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc. str. 196 – 221.
34. Pal CBT i Jadeja GC (2018) Deep Eutectic Solvents-based Extraction of Polyphenolic Antioxidants from Onion (*Allium cepa* L.) Peel. *J Sci Food Agr*. doi:10.1002/jsfa.9395.
35. Panesar PS, Kaur S (2016). Rice: Types and Composition. Encyclopedia of Food and Health, 646–652. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00596-1>.
36. Pathak PD, Mandavgane SA, Kulkarni BD (2016) Valorization of banana peel: a biorefinery approach. *Rev Chem Eng*. doi:10.1515/revce-2015-0063.
37. Pawar SN (2017). Chemical Modification of Alginate. *Seaweed Polysaccharides*, 111–155. doi:10.1016/b978-0-12-809816-5.00008-6.
38. Pereira MAF, Monteiro CRM, Pereira GN, Júnior SEB, Zanella E, Ávila PF, Poletto P (2020). Deconstruction of banana peel for carbohydrate fractionation. *Bioproc Biosyst Eng*. doi:10.1007/s00449-020-02442-1.
39. Ravindran, R., Jaiswal, A.K. (2016) Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology* **34**(1): 58-69.
40. Re i sur. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
41. Rebello LPG, Ramos AM, Pertuzatti PB, Barcia MT, Castillo-Muñoz N, Hermosín-Gutiérrez I (2014). Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant

phenolic compounds. *Food Res Int*, 55, 397–403.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.039>.

42. Sadh PK, Kumar S, Chawla P, Duhan JS (2018a) Fermentation: A Boon for Production of Bioactive Compounds by Processing of Food Industries Wastes (By-Products). *Molecules* **23**(10), 2560. doi:10.3390/molecules23102560.
43. Sadh, P.K., Duhan, S. & Duhan, J.S. (2018b) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>.
44. Saeed S, Ur Rehman Baig U, Tayyab M, Altaf I, Irfan M, Raza SQ, Mehmood T (2021). Valorization of banana peels waste into biovanillin and optimization of process parameters using submerged fermentation. *Biocatal Agricult Biotechnol*, **36**, 102154. doi:10.1016/j.bcab.2021.102154.
45. Sim SYJ, Chiang JH, Henry CJ (2021) Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap. *Foods*, **10**, 1967. <https://doi.org/10.3390/foods10081967>.
46. Simsek M, Süfer Ö (2021) Infusion of walnut (*Juglans regia* L.) shell tea: multi response optimization and antioxidant potential. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **20**, 100278.
47. Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 1179.
48. Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**: 152.
49. Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 - 158.
50. Taweechat C, Wongsooka T, Rawdkuen S (2021). Properties of Banana (Cavendish spp.) Starch Film Incorporated with Banana Peel Extract and Its Application. *Molecules*, **26**(5), 1406. doi:10.3390/molecules26051406.
51. Thivya P, Bhosale YK, Anandakumar S, Hema V, Sinija VR (2021). Development of active packaging film from sodium alginate/carboxymethyl cellulose containing shallot

- waste extracts for anti-browning of fresh-cut produce. *International Journal of Biological Macromolecules*, **188**, 790–799. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.039.
52. Vásquez ZS, de Carvalho Neto DP, Pereira GVM, Vandenberghe LPS, de Oliveira PZ, Tiburcio PB, Soccol CR (2019) Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Manage*, **90**, 72–83. doi:10.1016/j.wasman.2019.04.030.
 53. Vilas-Boas AA, Pintado M, Oliveira ALS (2021) Natural Bioactive Compounds from Food Waste: Toxicity and Safety Concerns. *Foods* **10**, 1564. doi:10.3390/foods10071564.
 54. Villasante J, Martin-Lujano A, Almajano MP (2020). Characterization and Application of Gelatin Films with Pecan Walnut and Shell Extract (*Carya illinoensis*). *Polymers*, **12**(6), 1424. doi:10.3390/polym12061424.
 55. Vinson, JA, Hao Y, Su X, Zubik L (1998) Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *J Agric Food Chem* , **46**, 3630–3634.
 56. Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods* **40**: 238-248.
 57. Vukić M, Grujić S, Odzaković B (2017). Application of Edible Films and Coatings in Food Production. *Advances in Applications of Industrial Biomaterials*, 121–138. doi:10.1007/978-3-319-62767-0_7.
 58. Zhang W, Li X, Jiang W (2019). Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.275.
 59. Zilani MNH, Sultana T, Rahman SMA, Anisuzzaman M, Islam MA, Shilpi JA (2017) Chemical composition and pharmacological activities of *Pisum sativum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**, 171. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1699-y>.
 60. Wadhawa M, Kausal S, Bakshi MPS (2006) Nutritive evaluation of vegetable as complete feed for goat bucks. *Small Ruminant Research*, **64**, 279–284.

61. Xiao N, Bock P, Antreich SJ, Staedler YM, Schonenberger J, Gierlinger N (2020) From the Soft to the Hard: Changes in Microchemistry During Cell Wall Maturation of Walnut Shells. *Front Plant Sci*, **11**, 466. doi:10.3389/fpls.2020.00466.
62. Yadav A, Kumar N, Upadhyay A, Pratibha, Anurag R K (2021). Edible Packaging from Fruit Processing Waste: A Comprehensive Review. *Food Rev Int*, 1–32. doi:10.1080/87559129.2021.1940198.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Vlastoručni potpis