

Razvoj i karakterizacija biorazgradivih jestivih prevlaka od proteina sirutke s dodatkom koprive

Mareljić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:443435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Martina Mareljić

**RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA
BIORAZGRADIVIH JESTIVIH PREVLAKA
OD PROTEINA SIRUTKE S DODATKOM
KOPRIVE**

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

Neizmjerne se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Miji Kurek na nesebičnoj pomoći, stručnom vodstvu te brojnim savjetima i prijedlozima tijekom izrade rada. Posebno hvala na razumijevanju i strpljenju za situacije koje su se dogodile, izdvojenom vremenu i trudu koje mi je pružila tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala i izv. prof. dr. sc. Mariju Ščetar na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala mojim divnim roditeljima i braći koji su me podržavali tijekom čitavog obrazovanja. Hvala što ste vjerovali u mene i uvijek bili tu!

I na kraju, kolegici Heleni, sestričnima i ostaloj rodbini, od srca hvala na podršci tijekom studija!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA BIORAZGRADIVIH JESTIVIH PREVLAKA OD PROTEINA SIRUTKE S
DODATKOM KOPRIVE

Martina Mareljić univ. bacc. ing. techn. aliment.
0113136424

Sažetak: U vidu povećanja svijesti o ekološkom problemu nastalog sporom razgradnjom plastike i potrebom za zaštitom okoliša, istraživanja se orijentiraju prema pronalasku alternativne ambalaže koja bi poslužila kao zamjena plastičnoj ambalaži. Biorazgradivi filmovi i prevlake u uporabi su dulji niz godina te predstavljaju dobru alternativu tradicionalnoj ambalaži. U ovom radu pripremljeni su jestivi materijali od izolata proteina sirutke. Radi usporedbe i definiranja mogućnosti razvoja funkcionalnih filmova, dodane su različite koncentracije ekstrakta lista kojima su se filmovi obogatili. Ekstrakt lista koprive bogat je izvorom brojnih bioaktivnih komponenti poput polifenola kojima se pripisuje antioksidativno, antiupalno, antikancerogeno i bakteriostatsko djelovanje. Filmovi sa dodanim koncentracijama ekstrakta imaju veću debljinu, dobru barijeru prema vodenoj pari. Udio ukupnih fenola se povećao sa dodatkom veće koncentracije ekstrakta lista koprive. U jestivim filmovima i prevlakama udio ukupnih fenola pokazatelj je zaštitne uloge jer prisutni fenoli imaju povoljan učinak na zdravlje ljudi.

Ključne riječi: biorazgradivost, jestivi film, izolat proteina sirutke, ekstrakt lista koprive, fenoli

Rad sadrži: 40 stranica, 4 slika, 4 tablica, 85 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mia Kurek

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Mia Kurek (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tibor Janči (zamjenski član)

Datum obrane: 26. rujna 2024. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of food engineering
Laboratory for food packaging

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

DEVELOPMENT AND CHARACTERISATION OF BIODEGRADABLE EDIBLE COATINGS MADE OF
WHEY PROTEIN ISOLATE ENRICHED IN NETTLE

Martina Mareljčić univ. bacc. ing. techn. aliment

Abstract: In the form of increasing awareness of the environmental problem caused by the slow decomposition of plastic and the need to protect the environment, research is oriented towards finding alternative packaging that would serve as a replacement for plastic packaging. Biodegradable films and coatings have been in use for many years and represent a good alternative to classic packaging. In this labor, edible materials were prepared from whey protein isolate. In order to compare and define the possibility of developing functional films, different concentration of leaf extracts was added to enrich the film. Nettle leaf extract is a rich source of numerous bioactive components such as polyphenols, which are attributed antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and bacteriostatic effect. Films with added extract concentrations have a greater thickness, a good barrier to water vapor. The proportion of total phenols increases with the addition of a higher concentration of nettle leaf extract. In edible films and coatings, the proportion of total phenols is an indicator of the protective role because the phenols is an indicator of the protective role because the phenols have a beneficial effect on human health.

Keywords: biodegradability, edible film, whey protein isolate, nettle leaf extract, phenols

Thesis contains : 40 pages, 8 figures, 4 tables, 85 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Mia Kurek, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Mario Ščetar, PhD, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 26th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA I POVIJEST AMBALAŽE I PAKIRANJA HRANE	2
2.2. BIORAZGRADIVI AMBALAŽNI MATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE	3
2.3. JESTIVI FILMOVI I PREVLAKE ZA PAKIRANJE HRANE	4
2.4. MATERIJALI ZA IZRADU JESTIVIH FILMOVA I PREMAZA	6
2.4.1. Primjena jestivih filmova i prevlaka	7
2.4.1.2. <i>Proteini</i>	7
2.4.1.3. <i>Proteini sirutke</i>	7
2.5. AKTIVNO PAKIRANJE I FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI I PREVLAKA	8
2.5.1. Ugradnja bioaktivnih komponenti u jestive filmove	8
2.6. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA ZA PAKIRANJE HRANE	9
2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva	9
2.6.1.1. <i>Debljina jestivih filmova i prevlaka</i>	9
2.6.2. Barijerna svojstva	10
2.6.2.1. <i>Propusnost vodene pare i plinova</i>	10
2.6.3. Optička svojstva; sjaj, prozirnost i boja	11
2.7. POSTUPAK PROIZVODNJE JESTIVIH FILMOVA I PREVLAKA	11
2.8. ZAKONSKA REGULATIVA O JESTIVIM FILMOVIMA I PREVLAKAMA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. PRIPREMA FILMOVA/PREVLAKA	13
3.3. METODE	14
3.3.1. Određivanje svojstava filmogenih otopina	14
3.3.1.2. <i>Mjerenje pH vrijednosti biopolimernih otopina</i>	14
3.3.1.3. <i>Mjerenje viskoznosti otopine biopolimera</i>	14
3.3.2. Određivanje svojstava filmova	14
3.3.2.1. <i>Debljina filmova</i>	14
3.3.2.2. <i>Mjerenje propusnosti vodene pare kroz film</i>	14
3.3.2.3. <i>Mjerenje propusnosti kisika i ugljikovog dioksida kroz film</i>	15
3.3.2.4. <i>Određivanje boje</i>	16
3.3.2.5. <i>Određivanje transparentnosti</i>	16
3.3.2.7. <i>Određivanje ukupnih fenola u filmovima</i>	17

3.4. OBRADA PODATAKA	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. pH I VISKOZNOST BIOPOLIMERNOG FILMA	19
4.2. DEBLJINA FILMA I PROPUSNOST NA VODENU PARU.....	20
4.2.1. Debljina filma.....	20
4.2.2. Propusnost filmova na vodenu paru i brzina prijenosa vodene pare	21
4.3. BOJA I TRANSPARENTNOST FILMOGENIH OTOPINA	22
4.3.1. Boja filma	22
4.3.2. Transparentnost	24
4.4. UDIO UKUPNIH FENOLA	26
4.5. PROPUSNOST NA KISIK I UGLJIKOV DIOKSID	27
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. LITERATURA	33

1. UVOD

U današnjem okruženju, pakiranje je sveprisutan i bitan korak u distribuciji hrane od proizvođača do potrošača prilikom skladištenja i transporta (Robertson, 2013). Pakiranjem se hrana štiti od kontaminacije od različitih vanjskih utjecaja, zatim kvarenja, mehaničkih oštećenja tijekom transporta, dostave i skladištenja, gubitka mase, i prijenosa topline. Pakiranje hrane omogućava produljenje roka trajnosti pa je ono je ključ za osiguranje kvalitete i zdravstvene ispravnosti upakiranog proizvoda.

Svojstva i kvalitetu namirnice moguće je očuvati jedino pakiranjem i pravilnim odabirom ambalažnih materijala, a razlikujemo nekoliko vrsta osnovnih ambalažnih materijala za pakiranje hrane (papir, staklo, metal, keramika, plastika, te složeni materijali) te ostale ambalažne materijale (biorazgradive, jestive i nanomaterijale). U ambalažnoj industriji, plastika je izvrstan materijal s izuzetno dobrim svojstvima koje je čine prvim izborom za brojne primjene, ali se zbog neprikladnog i neracionalnog zbrinjavanja plastičnog otpada zagađuje okoliš (Rujnić-Sokele, 2015). Formiranjem ekološke svijesti, a samim time i očuvanja okoliša, sve više industrija razvija potrebu za alternativnim sirovinama za proizvodnju ambalaže, gdje se ambalažni materijali proizvode od biomaterijala koji su pogodni za mikrobiološku razgradnju (Tokić i sur., 2011). U ovu kategoriju svrstavamo i jestive filmove i prevlake koji osim što poboljšavaju kvalitetu hrane i produljuju njezinu trajnost, utječu i na njezinu sigurnost i funkcionalnost (Galić, 2009). Ako ih obogatimo bioaktivnim tvarima, iste dobivaju obilježja funkcionalnog proizvoda. Ekstrakt lista koprive zbog fenolnih spojeva koje posjeduje ima djelotvoran učinak na ljudsko zdravlje. S druge strane, izolat proteina sirutke koji ima važnu funkciju u formiranju čvrstoće gela može bitno pospješiti okus i teksturu proizvoda zbog dobre topljivosti, vezanja vode i viskoznosti koje posjeduje.

Ciljevi ovog diplomskog rada bili su sljedeći :

- Priprema jestivih materijala od izolata proteina sirutke,
- Mogućnost dodavanja ekstrakta lista koprive u formulaciji od izolata proteina sirutke s ciljem razvoja funkcionalnih filmova,
- Karakterizacija i usporedba fizikalno-kemijskih, mehaničkih, barijernih svojstava pripremljenih filmova, te udio ukupnih fenola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA I POVIJEST AMBALAŽE I PAKIRANJA HRANE

Već od davnina ljudi su pronalazili i skupljali hranu u prirodi, nešto kasnije javila se potreba za čuvanjem hrane. Životinjska koža rabila se kao vrećica. Slama, kora drveta i lišće kao omoti, a za spremnike je poslužila kora drveta. Pretpostavlja se da je prva ambalaža bila posuda od mokre gline, a kasnije su se pojavile keramika, staklo i metal. Intenzivniji razvoj ambalaže dolazi sa povećanjem stupnja urbanizacije, povećanjem broja stanovništva što je stvorilo potrebu za skladištenjem hrane pa su se tako počele koristiti posude sve većih zapremnina, kao i proizvodnje pamučnih i jutenih vreća. Kao i u ostalim granama proizvodnje, industrijskom revolucijom dolazi do prekretnice i u području ambalažnih materijala, što je dovelo do njihovog značajnog razvoja, a isto tako i ambalaže i metoda pakiranja, a 20. stoljeće bilježi najveći opseg proizvodnje i primjene ambalažnih materijala i to ambalaže od prirodnih polimernih materijala (Vujković i sur., 2007).

Svojstva i kvaliteta ambalaže ovise o izboru ambalažnog materijala, odnosno hoće li on na adekvatan način kvalitativno i kvantitativno zaštititi namirnicu u cijelom lancu opskrbe hranom od proizvođača do krajnjeg potrošača. Također, vrsta ambalažnog materijala diktira i izbor tehnologije za proizvodnju ambalaže, njezin izgled, veličinu, oblik, namjenu i način uporabe te cijenu. Shodno tome, ambalažu prema ambalažnom materijalu možemo podijeliti na osnovne (papir, plastika, staklo, metal, keramika i složene (kombinirane) materijale) te ostale (biorazgradive, jestive i nanomaterijale) (Tkalec i sur., 2018). Ambalaža predstavlja sve proizvode koji su sačinjeni od različitog materijala različitog porijekla i koji su namijenjeni za očuvanje i zaštitu proizvoda tijekom skladištenja, transporta i dostave od proizvođača do krajnjeg potrošača (Vujković, 2007). Prema Pravilniku o mjeriteljskim zahtjevima za pakovine i boce kao mjerne spremnike, pakiranje je postupak stavljanja proizvoda u ambalažu odgovarajuće kakvoće, oblika i načina zatvaranja (NN90/2005). Četiri su osnovne kategorije funkcija pakiranja hrane: zaštitna, skladišno-transportna, prodajna i uporabna (jednostavnost, isplativost) (Robertson, 1993). Osim navedenih funkcija koje moraju biti međusobno povezane, uspješna ambalaža mora zadovoljiti i sljedeće zahtjeve:

- da je jednostavna, funkcionalna i učinkovita od proizvodnje preko rukovanja, transporta, skladištenja i distribucije;
- da je inovativna i da na najbolji mogući način prezentira upakiranu namirnicu;
- da štiti upakiranu namirnicu od rasipanja, mogućih kemijskih i mikrobioloških utjecaja, kvarenja, prijenosa topline;

- da ne reagira sa proizvodom, odnosno da mu ne mijenja njegova osnovna fizička, kemijska i senzorska svojstva;
- da očuva svježinu i kvalitetu namirnice;
- da ispunjava zakonsku regulativu, uključujući specifične, sanitarne i trgovačke propise;
- da je ekonomična, odnosno da u postupku pakiranja ne zahtjeva skupu i kompliciranu opremu;
- da je pogodna za recikliranje nakon uporabe kako bi što manje štetili okolišu.

Najčešće korišteni ambalažni materijali u prehrambenoj industriji su papir, staklo, metali i polimeri (polietilen (PE), polipropilen (PP), poli(etilen-tereftalat) (PET). Neki su ambalažni materijali izrađeni od nekoliko različitih polimernih materijala ili u kombinaciji s drugim materijalima, a nazivamo ih višeslojnim ambalažnim materijalima ili laminatima. Ispunjenje očekivanih funkcija ambalaže, a time i efikasnost i uspješnost pakiranja, ovisi o kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama ambalažnog materijala od kojeg je načinjen, ali i o svojstvima upakirane namirnice (Berk, 2018).

2.2. BIORAZGRADIVI AMBALAŽNI MATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE

Svjedoci smo izrazito velikog gomilanja otpada jer vrlo velik problem predstavlja zbrinjavanje ambalaže nakon uporabe. Povećanjem ekološke svijesti i potreba za zaštitom okoliša, ova tema, danas, postaje sve aktualnija. Najveći problem predstavlja polimerna ambalaža, koja je široko rasprostranjena u ambalažnoj industriji. Nju čini čitav niz rasprostranjenih sintetskih ambalažnih materijala koji su proizvedeni na osnovi petrokemikalija (polietilen, polipropilen, polistiren), a njihova najveća mana je to da su teško biorazgradivi ili nerazgradivi i samim time uzrokuju ozbiljne globalne i ekološke probleme današnjice. Degradacija tla predstavlja jedan od niza problema zbrinjavanja jer se većina iskorištene plastične ambalaže pokapa pod zemljom ili se spaljuje pa se pri tome oslobađaju izrazito otrovni dioksini (Han i sur., 2015). Zbog svega navedenog, tijekom 80-tih godina prošlog stoljeća sve se više pažnje počinje davati biorazgradivim materijalima koji se mogu sami razgraditi uz pomoć živih mikroorganizama, a poslužili bi kao alternativa nerazgradivoj ambalaži za koju je recikliranje neekonomično i nepraktično. Težnja je da se isti što više koriste u budućnosti, ali pri tome, treba imati na umu da je njihova potpuna zamjena nemoguća (Siracusa i sur., 2008). Plastika je tako proizveden sintetski materijal da ne može podleći biorazgradnji poput ostalih prirodnih polimera i tvari, zbog toga što je građena od velikih, dugačkih međusobno povezanih razgranatih lanaca. Stoga, možemo zaključiti da će ju teže razgraditi mikroorganizmi, zato se sve veća važnost pridodaje biopolimerima i biorazgradivim materijalima, građeni od prirodnih tvari koji su u određenim, optimalnim uvjetima (vlaga, temperatura i dostupnost kisika) sposobni podleći razgradnji uz prisustvo mikroorganizama

(Tokić i sur., 2011). Također, EU direktiva nalaže da biorazgradivi ambalažni otpad mora podnijeti kemijsko, fizičko, termalno ili biološko razlaganje. Kada su svi parametri u optimalnim uvjetima zadovoljeni, možemo očekivati da će doći do razgradnje ambalažnog materijala (Siracusa i sur., 2008). Biorazgradivost je sposobnost korištenja ugljika od strane mikroorganizama koji su normalno prisutni u prirodi (određene vrste bakterija, algi i gljivica) i njegovo pretvaranje u ugljikov dioksid, biomasu i vodu. Definirana je kao značajna promjena u kemijskoj strukturi materijala unutar specifičnih okolišnih uvjeta, a rezultira gubitkom strukture i ostalih svojstava karakterističnih za taj materijal (Švegović, 2022). Iako je razvoj biomaterijala posljednjeg desetljeća u naglom usponu, u kontekstu pakiranja hrane, ovi materijali često nemaju zadovoljavajuća barijera i mehanička svojstva, te su vrlo često osjetljivi na vodu, te je stoga zamjena plastičnih materijala istima još uvijek gotovo nemoguća. Ipak, porastom ekološke svijesti i spoznajom o pozitivnim stranama biorazgradivih materijala, oni zasigurno predstavljaju potencijal za budućnost. U svrhu postizanja odgovarajućih barijernih i mehaničkih svojstava za pakiranje prehrambenih proizvoda, poželjno ih je kombinirati sa drugim biopolimerima (Versino i sur., 2023).

2.3. JESTIVI FILMOVI I PREVLAKE ZA PAKIRANJE HRANE

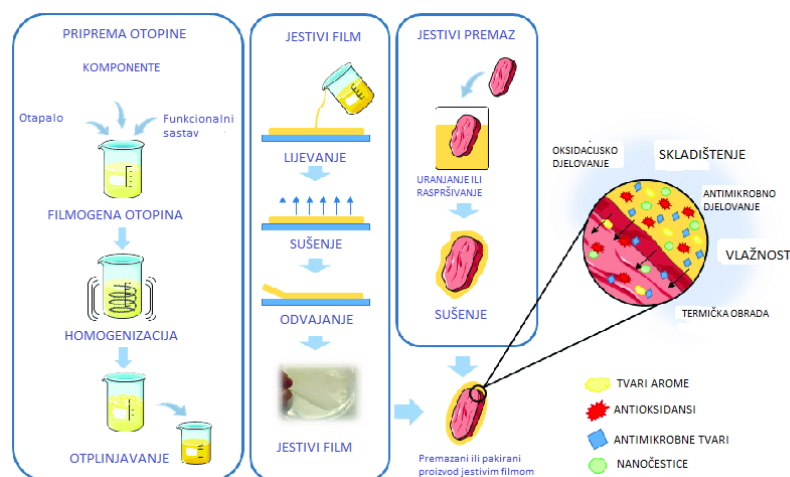
Proizvodnja plastične ambalaže u stalnom je porastu, a velike količine upotrebljavaju kao jednokratna ambalaža za određene proizvode. Od toga, male količine plastične ambalaže se recikliraju pa se većina plastične i slične ambalaže ne zbrinjava na optimalan i racionalan način i tako završava nezbrinuto u prirodi (Arsimendi i sur., 2013). Kako bi to spriječili, proučavaju se primjene jestive i ekološki prihvatljive ambalaže koja bi poslužila kao alternativa konvencionalnoj s ciljem zadovoljavanja potreba potrošača i proizvođača za zdravom, sigurnom i prirodnom hranom (Stefănescu i sur., 2022).

Jestivi filmovi predstavljaju zaštitni, samostojeći i biorazgradiv sloj materijala, napravljen od prehrambenih materijala koji se oblaže na proizvod, čineći tako barijeru između hrane i okoline. Pojam „jestivi“ govori da je izrađen od biomaterijala koji se svakodnevno upotrebljavaju u prehrani i smatraju se sigurnima za konzumaciju, dok izraz „filmovi“ karakterizira materijale koji imaju sposobnost stvoriti kontinuiranu kohezivnu strukturu (Yeja i sur., 2020). Takvi materijali primarno su odobreni za ljudsku upotrebu od strane službenih institucija za sigurnost hrane i materijala u dodiru sa hranom. Europska agencija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*) tu funkciju provodi u Europskoj Uniji, a Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*) u Americi.

Budući da se jestiva ambalaža može konzumirati, ona je postala održiva opcija pakiranja zbog svog potencijala da prevlada probleme povezane sa nerazgradivom ambalažom čime se uvelike smanjuje opterećenje koje ambalažna industrija stvara okolišu. Namirnici osigurava

dobru barijeru prema vlazi, kisiku i migracijama mikroorganizama između proizvoda i okoline te može u potpunosti prekriti proizvod ili se primijeniti kao sloj između komponenti hrane (Iversen i sur., 2022). Glavna funkcija jestivih filmova i prevlaka je produljenje roka trajnosti i kvalitete prehrambenog proizvoda na način da ga štiti od fizičkog, kemijskog i biološkog propadanja. Osim toga, film kao polupropusna barijera može zaštititi prirodne slojeve prehrambenog proizvoda, pospješiti njegovu fizikalnu čvrstoću, kao i vizualne i taktilne karakteristike, omogućiti selektivnu izmjenu plinova koji su uključeni u respiraciju (CO₂, O₂ i etilen) te spriječiti transpiraciju odnosno gubitak vode (Han, 2014). Osim zaštitne funkcije proizvoda, koju ambalaža mora posjedovati, u sastav jestive ambalaže mogu se dodati različite bioaktivne tvari (tvari arome, antimikrobne tvari, antioksidansi, nutrijenti, nutraceutici) čime se naglašavaju funkcionalna svojstva, poboljšava kvaliteta i/ili nutritivna svojstva za razliku od klasične ambalaže (Ribeiro i sur., 2020). Da bi jestivi film bio karakteriziran kao kvalitetan, trebao bi ispunjavati sljedeće zahtjeve: (i) izvrsna senzorska kvaliteta, (ii) dobra barijerna svojstva, (iii) dobra mehanička čvrstoća, (iv) netoksičan, (v) visoka mikrobiološka stabilnost, (vi) siguran za upotrebu, (vii) jednostavan prilikom formiranja, (viii) ekološki i ekonomski prihvatljiv (Jeya i sur., 2020).

S obzirom na način nanošenja, jestive materijale možemo svrstati u jestive filmove i jestive prevlake. Pevlakama smatramo one materijale kada se kao filmogena otopina izravno nanose na vanjsku stranu proizvoda i to postupkom uranjanja, raspršivanja ili premazivanja, a potom se prevlaka suši te se formira tanki sloj na površini proizvoda koji će onda obavljati željenu funkciju (Angelo i sur., 2016). Jestivi film definiramo kao suhi film nastao sušenjem otopine na odgovarajućoj podlozi koji se potom odvaja te se primjenjuje kao samostojeći materijal koji se može staviti na namirnicu, a da bi se smatrao filmom, njegova debljina mora biti od 25 – 50 μm (Angelo i sur., 2016). Shematski prikaz nastajanja jestivog filma i jestivog premaza kao i različite bioaktivne tvari kojima se mogu obogatiti prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz nastajanja jestivog filma i jestivog premaza i različite bioaktivne tvari kojima se mogu obogatiti (prema Hassoun i sur., 2020)

2.4. MATERIJALI ZA IZRADU JESTIVIH FILMOVA I PREMAZA

Ovisno o vrsti biopolimera od kojeg su proizvedeni, skupine materijala koji se mogu koristiti za izradu jestivih filmova su slijedeće:

- Hidrokoloide (koji uključuju polisaharide i proteine);
- Lipide (voskovi i masne kiseline);
- Kompoziti (kombinacijom različitih materijala; hidrokoloide i lipide) (Tablica 1).

Prilikom formiranja jestivih filmova, primjenjuje se najmanje jedan osnovni materijal koji je sposoban stvoriti neprekidan i kohezivan matriks (Guilbert i Gontard, 2005) ili može biti kombinacija dvaju ili više njih. Isto tako, moguće je kombinirati više tipova filma u složeni višeslojni film (Ramesh i Muthukrishnan, 2022). S obzirom da jednokomponentni filmovi nemaju unaprijedna barijerna i mehanička svojstva, sve se više proizvode dvokomponentni ili višekomponentni filmovi (kombinacija polazišnih materijala), kako bi se uklonila negativna svojstva pojedinačnog materijala, a pospješila barijerna, mehanička i fizikalno-kemijska svojstva novo razvijenih filmova.

Tablica 1. Materijali za izradu jestivih filmova i prevlaka (*prema* Iversen i sur., 2022)

FUNKCIONALNI SASTAV	MATERIJALI
Materijali za izradu	Proteini Kolagen, želatina, kazein, proteini sirutke, zein, pšenični gluten, proteini bjeljanka
	Polisaharidi Škrob, modificirani škrob, modificirana celuloza (CMC, MC, HPC, HPMC)*, alginat, karagenan, pektin, pululan, kitozan, gelan guma, ksantan guma
	Voskovi, lipidi Voskovi (pčelinji vosak, parafin, karnauba vosak), smole (šelak), acetogliceridi
Plastifikatori (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)

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

2.4.1. Primjena jestivih filmova i prevlaka

Posljednjih nekoliko desetljeća, jestivi filmovi i premazi sve češće se primjenjuju u prehrambenoj industriji, a isto tako i u industriji pakiranja hrane.

Izolati proteina sirutke najčešće se upotrebljavaju u namirnicama gdje ključnu ulogu ima formiranje čvrstoće gela, viskoznost, topljivost i vezanje vode pri čemu izolati proteina sirutke mogu značajno pospješiti okus i teksturu gotovog proizvoda (Herceg i Režek, 2006).

2.4.1.2. Proteini

Proteini su složene organske makromolekule građene od jednog ili više lanaca aminokiselina međusobno povezane peptidnom vezom. Molekulska masa može dostići i vrijednosti od nekoliko milijuna, a struktura može obuhvatiti i neproteinske molekule. Proteini za proizvodnju jestivih filmova dobivaju se iz različitih biljnih i životinjski izvora, primjerice životinjska tkiva, mlijeko, jaja, uljarice i žitarice (Milani i Tirgarian, 2020). Prema podrijetlu, mogu se razvrstati na biljne (gluten, zein, soja) i životinjske (proteini sirutke, proteini bjelanjka, kazein, keratin, kolagen i želatina i proteini mesa) (Cotelli i sur., 2015). U jestivim filmovima i prevlakama, proteini funkcioniraju kao temelj i matrica jer i daju jačinu, dok s druge strane, takvi su filmovi i prevlake lomljivi, neotporni na nabore, ograničene sposobnosti rastezanja, bubre ili se otapaju u vlažnim uvjetima. Stoga je za stvaranje fleksibilnosti nužna upotreba plastifikatora. Takvi filmovi imaju dobra mehanička i optička svojstva. Također, predstavljaju dobre barijere za kisik, ugljikov dioksid, lipide i arome. Nedostatak proteinskih filmova predstavlja njihova hidrofilnost odnosno propusnost vodene pare koja narušava mehanička i barijerna svojstva takvih filmova (Božanić i sur., 2022).

2.4.1.3. Proteini sirutke

Proteini sirutke predstavljaju glavni nusproizvod u industriji sira što ih čini lako dostupnima (Gupta i Prakash, 2017). Odlikuju ih dobra prehrambena i funkcionalna svojstva te su kao takvi koristan potencijal za proizvodnju jestivih filmova (Mate i Krochta, 1996). Glavne komponente sirutke sadrže beta – laktoglobulin (β -Lg), alfa – laktalbumin (α – La), albumin goveđeg seruma (BSA), laktoferin (Lf), imunoglobulini (Igs), enzimi laktoperoksidaze (Lp), glikomakropeptidi (GMP), laktoza i minerali (Gupta i Prakash 2017). Proteini sirutke su snažni antioksidansi pa su stoga učinkoviti u zaštiti protiv oksidacije prehrambenih proizvoda. U prehrambenim proizvodima, koriste se zbog visoke prehrambene vrijednosti i sposobnosti da formiraju gelove, emulzije i pjene (Sothornvit i Krochta, 2001). Studije su pokazale da proteini sirutke proizvode transparentne i fleksibilne jestive filmove s odličnim barijerama za kisik i ulja, bez okusa i mirisa. Važno je napomenuti da jestivi filmovi na bazi proteina sirutke bez ikakvih modifikacija

imaju veliku propusnost za vlagu i relativno slaba mehanička svojstva u odnosu na sintetičke ili druge materijale za pakiranje hrane, stoga im je primjena ograničena (Pamuković, 2017).

2.5. AKTIVNO PAKIRANJE I FUNKCIONALNI JESTIVI FILMOVI I PREVLAKA

Pod pojmom aktivnog pakiranja smatra se da ambalažni materijal otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbira s ciljem produljenja njezinog roka trajnosti i poboljšanja uvjeta pakiranja kako bi se osigurala sigurnost hrane. Uz inteligentnu, aktivna ambalaža spada u pametnu ambalažu, a pametna ambalaža osim temeljne zaštite proizvoda obavlja i druge zadaće (Jakupić i sur., 2019). Zakonom o hrani NN (18/23) i Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom NN (125/09) aktivno pakiranje je regulirano u Republici Hrvatskoj. Aktivni materijali i predmeti ne smiju utjecati na sastav i organoleptička svojstva hrane kako bi prekrili kvarenje hrane. Također, moraju biti označeni na način da je potrošaču vidljiva identifikacija nejestivih dijelova proizvoda.

U sastav jestivih filmova i prevlaka mogu se dodati različite bioaktivne tvari koje naglašavaju funkcionalna svojstva hrane. Pod pojmom bioaktivnih spojeva najčešće se smatraju antioksidansi koji se u jestive filmove dodaju kao esencijalna ulja, ekstrakti ili kao čisti spojevi. Također, ubrajaju se još i skupine spojeva poput karotenoida, fenola, fitosterola i monoterpena, glukozinolata, prehrambena vlakna i molekule poput askorbinske kiseline. Osim utjecaja na okus filma imaju i antimikrobna i antioksidativna svojstva čime se dodatno pospješuje kakvoća i rok trajnosti proizvoda. Danas se provode brojna istraživanja navedenih bioaktivnih komponenti upravo zbog činjenice da pozitivno utječu na zdravlje ljudi (Al-Hilifi, 2023; Ribeiro, 2021; Tkawcevska, 2020).

2.5.1. Ugradnja bioaktivnih komponenti u jestive filmove

Loša svojstva bioaktivnih komponenti kao što su nepotpunost okusa, brza razgradnja i interakcija sa ostalim sastojcima hrane uzrokuju gubitak funkcionalnih svojstava jestivih filmova. Kako bi se oni spriječili, bioaktivne se komponente ugrađuju u jestive filmove na četiri različite tehnike ugradnje. Bioaktivna tvar može se ugraditi:

- i) s vanjske strane jestivog filma,
- ii) u međuprostor između hrane i jestivog film,
- iii) između slojeva jestivog filma,
- iv) raspršen među različitim slojevima filma (Bionda, 2021).

2.5.2. Ekstrakt lista koprive (*Urtica dioica* L.)

Kopriva (lat. *Urtica dioica* L.) višegodišnja je biljka iz porodice koprivnjača (lat. *Urticaceae*). Naziv roda *Urtica* potječe od latinske riječi *urere* što znači peći, a samo ime vrste *dioica*

predstavlja dvodomnost odnosno odvojenost muških i ženskih cvjetova na zasebnim biljkama (Upton, 2013). Sve podvrste su uspravne trajnice koje dosežu visinu do dva metra. Listovi su im nasuprotni, koljastog i ovalnog oblika na vrhu, a na razgranatom podanku imaju vriježe. Specifični su nazubljeni rubovi sa oštrim vrhom, aksilarni cvat s dosta malih, zelenih cvjetova te orašica ili koštunica kao njezini plodovi. Stanište je joj vlažno tlo bogato ugljikom, livade i napuštena polja sa djelomično sjenovitim mjestima (Grausso i sur., 2020). Zbog svog nutritivnog i ljekovitog sastava, već se dugi niz godina upotrebljava u prehranbenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Istraživanja su pokazala da su listovi i stabljika koprive bogat izvor vitamina A, B2, B5, B9, C, D, E, K, minerala (Ca, Mn, Zn, Mg, Cu) te polifenola i pigmentata. Svaki dio koprive bogat je brojnim bioaktivnim komponentama s visokim antioksidativnim kapacitetom (Repajić i sur., 2021). Zahvaljujući visokom sadržaju fenolnih spojeva koje sadrži kopriva, a kojima se pripisuju protupalna i antioksidativna svojstva, znanstvena istraživanja pokazala su izravnu korelaciju između unosa fenolnih spojeva i blagotvornog učinka na zdravlje ljudi. Zbog toga je vrlo važno dodatno istražiti upotrebu koprive u hrani (Carvalho i sur., 2017). Biljni ekstrakti su vrlo bitan izvor biološki aktivnih spojeva i imaju važnu ulogu u zdravlju ljudi. Kako bi se istakla njihova ljekovita svojstva, biljni ekstrakti moraju biti pažljivo pripremljeni, uzimajući u obzir brojne parametre. Prije ekstrakcije, ljekovite i aromatične biljke se suše na zraku ili liofiliziraju, ali se ponekad može koristiti i svježi biljni materijal. Uz ekstrakciju, mogu se koristiti postupci poput filtriranja, koncentriranja i sušenja (Rodino i Butu, 2019).

2.6. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA ZA PAKIRANJE HRANE

Kako bi postigli idealna svojstva filmova i prevlaka, potrebno ih je ispitati određenim parametrima kvalitete, a funkcionalnost i karakteristike ovise o njihovim fizikalno-kemijskim, mehaničkim, barijernim i optičkim svojstvima (Guillard i sur., 2016). Treba napomenuti da svojstva ovise od vrste sirovine, otapala, pH, temperature i izbora plastifikatora (Erkmen i Barazi, 2018).

2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva

2.6.1.1. Debljina jestivih filmova i prevlaka

Debljina jestivih filmova i prevlaka je važan parametar jer izravno utječe na barijerna i mehanička svojstva, a isto tako i na rok trajanja upakirane hrane. Učinkovitost zaštite hrane upotrebom jestivih filmova prvenstveno ovisi o kontroli širenja otopina otopina filmova i prevlaka koje utječu na debljinu filma (Skurtys i sur., 2010). Idealna debljina filma bi trebala biti manja od 0,25 mm (Utami Hatmi i sur., 2020). Dvije su metode mjerenja debljine filma:

kontaktna i ne-kontaktna metoda. Kontaktna metoda je lakše uporabljiva i najčešće podrazumijeva direktno mjerenje debljine filma pomoću mikrometra. Ne-kontaktna metoda je ponekad bolji izbor jer ne dolazi do oštećenja filma, ali je složenija.

2.6.2. Barijerna svojstva

Barijerna svojstva filma definiramo kao sposobnost da spriječi izmjenu vodene pare, plinova, aroma i masnoća između proizvoda i okoline. Prehrambeni proizvod koji je obložen filmom podliježe kemijskim promjenama uslijed staničnog disanja, topljivosti plinova dok uvjeti u kojima je skladišten, kemijski sastav i struktura polimera od kojega je film/prevlaka proizveden određuju njegovu učinkovitost i barijerna svojstva (Galić, 2009). Proizvodnjom filma ili prevlaka dobrih barijernih svojstava postiže se produljenje roka trajnosti obloženog prehrambenog proizvoda. Pri odabiru jestivog filma treba uzeti u obzir svojstva proizvoda koji će biti obložen jer neki materijali koji imaju dobru barijeru na kisik smanjuju užeglost i gubitak vitamina pa ih je poželjno koristiti za proizvode koji su osjetljivi na oksidaciju. Isto tako, meso i mesni proizvodi, kao i svježe voće i povrće zahtijevaju film koji ima određen stupanj propusnosti na kisik i ugljikov dioksid.

2.6.2.1. Propusnost vodene pare i plinova

Prijelaz plinova i tekućina u sustavu naziva se permeacija ili propusnost, dok se plin koji prolazi naziva permeat. Transport plinovitih komponenti kroz ambalažni materijal odvija se po principu molekulske difuzije. Molekule se gibaju uslijed gradijenta koncentracije pri konstantnom tlaku i temperaturi (1. Fickov zakon). Transport plinova u jestivom filmu sastoji se od tri koraka: i) adsorpcija plina na površinu jestivog filma, ii) difuzija molekula plina od jedne do druge strane filma, iii) desorpcija molekula plina iz filma. Fickov zakon prikazuje difuziju molekula plina kroz jestivi film, a jednačba Fickov-og zakona glasi [1] i [2]:

$$J = - D \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial x}\right) \quad [1]$$

gdje su:

J – tok, neto količina otopljene tvari koja difundira kroz jedinicu površine kroz jedinicu vremena (g m^{-2} ili $\text{mL m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

D – koeficijent difuzije ili difuzivnost ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$),

C – koncentracija tvari koja difundira (g m^{-3} ili mL m^{-3}),

X – debljina filma (m),

ili

$$J = D \cdot \frac{C_2 - C_1}{X} = \frac{Q}{(A \cdot t)} \quad [2]$$

Q – količina plina koja 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 i preraspodjelom gore navedenih jednadžbi [3]:

$$\frac{Q}{A \cdot t} = D \cdot S \cdot \frac{p_2 - p_1}{X} = P \cdot \frac{\Delta p}{X} \quad [3]$$

gdje su:

S – Henryjeva konstanta topljivosti (mol atm^{-1}),

Δp – razlika parcijalnog pritiska plina kroz film (Pa),

P – propusnost ($\text{mL ili g m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$).

Pokretljivost polimernih lanaca, cjelovitost filma, i debljina, neki su od čimbenika koji direktno utječu na propusnost vodene pare, no u znanstvenim istraživanjima vezanim za jestive materijale se svakako najviše spominju vrsta i količina dodanog plastifikatora. Glavna prednost povećane propusnosti vodene pare je poboljšana topljivost filma na bazi proteina. Takva karakteristika se može izravno povezati s boljim oslobađanjem bioaktivnih spojeva iza aktivnih pakiranja koji se mogu ugraditi u filmove na bazi proteina (Mihalca i sur., 2021).

2.6.3. Optička svojstva; sjaj, prozirnost i boja

Optička svojstva jestivih filmova značajna su senzorska svojstva posebice potrošačima jer vizualni izgled proizvoda je prva karakteristika koja će privući ili odbiti kupca. Poželjno je da jestivi filmovi budu neutralni odnosno bezbojni, s prozirnošću sličnom polimernim ambalažnim materijalima ili pak približno boji proizvoda na koji će film biti obložen (Chakravartula i sur., 2019). Valja napomenuti, da optička svojstva filma, također, ovise o sastavu filma kao i postupku izrade istih te drugim vanjskim faktorima, primjerice temperaturi i relativnoj vlažnosti (Rhim i Shellhammer, 2005). Sjaj je kod jestivih filmova poželjan, dok ga mutnoća (nejasnoća) ne bi trebala karakterizirati. Mutnoća se odnosi na tendenciju filma da rasprši svjetlost i utječe samo na estetski izgled filma. Zaštita od svjetla koju pružaju jestivi filmovi ovisi o brojnim čimbenicima, a to su: prirodne apsorpcijske osobine materijala koju sačinjava film, debljinu filma, uvjete obrade filma te obojenje konačnog filma (Singh i Singh, 2005).

2.7. POSTUPAK PROIZVODNJE JESTIVIH FILMOVA I PREVLAKA

Postupci proizvodnje jestivih filmova i prevlaka slični su kao kod polimernih struktura. Dobiveni film mora biti homogen, bez nastalih mjehurića i mehaničkih oštećenja te ujednačen (Skurtys i sur., 2010). Dvije su vrste sila koje djeluju na sustav hrana – jestivi film, a to su sile adhezije (djeluju između filma i supstrata, tj. Proizvoda) te sile kohezije (djeluju među polimernim molekulama od kojih se sastoji film). Obje vrste sila ovise o kemijskoj građi i strukturi polimera. Standardna metoda za nanošenje prevlaka na proizvode nepravilnih oblika

je uranjanje gdje jestivi prevlaka nastaje potapanjem proizvoda jestivu otopinu (5 – 30 sekundi), a zatim se naknadno cijedi. Suprotan proces od uranjanja je prskanje ili raspršivanje koji se primjenjuje na proizvodima velikih površina. Ovakav tip postupka zahtjeva okretanje proizvoda kako bi se i donja strana proizvoda izložila otopini filma, a pogodan je za otopine filma male viskoznosti. Kako bi se smanjio gubitak vlage u proizvodi koji se želi zaštititi, koristi se postupak prevlačenja i to na način da se otopina za formiranje filma razmazuje pomoću kista ili valjka na ciljani proizvod (Pamuković, 2017). Najpogodniji postupak u laboratorijskoj izradi je metoda lijevanja, a odvija u tri koraka: otapanje biopolimera, lijevanje otopine u kalup te sušenje lijevane otopine. Odabirom biopolimera započinje formiranje jestivog filma, a nakon što je otopljen u prikladnom otapalu, dobivena otopina se ulijeva u već definirani kalup, primjerice, Petrijeve zdjelice (Suhag i sur, 2020).

2.8. ZAKONSKA REGULATIVA O JESTIVIM FILMOVIMA I PREVLAKAMA

U svrhu osiguranja visoke razine zaštite zdravlja ljudi i interesa potrošača u vezi s hranom, Europska Unija, pa samim time i Republika Hrvatska koja je ravnopravna članica, uspostavila je osnovna načela i zadaće kako bi se kontrolirala sigurnost materijala i predmeta koji dolaze u dodir sa hranom tijekom njezine obrade, skladištenja i transporta (Jeya i sur., 2020). Svi prehrambeni proizvodi moraju biti u skladu sa Uredbom (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća kojom su definirana opća načela i uvjeti zakona o hrani. Kako bi se pružili znanstveni savjeti postupci o postojećim i novim rizicima povezanih s hranom, Uredbom (2002), osnovana je i Europska agencija za sigurnost hrane. Zakonskim se regulativama nastoji osigurati da sva dostupna hrana bude najprije odobrena i zdravstveno ispravna za ljudsku konzumaciju. Svi predmeti i materijali koji dolaze u neposredan dodir sa hranom, a koji dolaze na tržište EU, moraju ispunjavati zahtjeve koje nalaže Uredba (EZ) br. 1935/2004 o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom, obuhvaćajući aktivne i inteligentne materijale (Uredba, 2004). Uredba komisije (EZ) br. 450/2009 o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir sa hranom, od svibnja 2009. godine definira popis tvari koji se mogu koristiti u aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima. Kancerogene, toksične i mutagene tvari, kao i tvari u nano obliku, zabranjene su u popisu (Uredba, 2009). Kao i druge tvari u procesu proizvodnje hrane, tako i jestivi filmovi i polisaharidne prevlake podliježu istim zakonskim propisima. Kada Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) odobri materijal kao siguran i označen kao GRAS, koji se koristi u skladu za dobrom proizvođačkom praksom (eng. *Good manufacturing practices*), može se koristiti u jestivim pakiranjima. S obzirom na upotrebu eteričnih ulja koja se kao antimikrobni spoj koriste u jestivim prevlakama, treba obratiti pažnju na alergičnost i toksičnost jestivih filmova i prevlaka, bez obzira što su od strane Europske komisije klasificirane kao GRAS (eng. *Generally recognized as Safe*) (Šagud, 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada, kao osnovni materijal za izradu filmova korišten je izolat proteina sirutke (Whey protein isolate BiPro DAVISCO Inc., Minnesota, USA). Za obogaćivanje filmova bioaktivnim sastojcima korišten je prirodni ekstrakt koprive (*Urtica dioica* L., Soria Natural, Španjolska). Također, korišteni su biljni jestivi glicerini (minimalne čistoće 99,5 %, Dekorativna točka d.o.o., Zagreb, Hrvatska) kao plastifikatori te destilirane vode za pripremu filmogenih otopina. Magnezijev nitrat ($MgNO_3$, Grammol, Zagreb, Hrvatska) korišten je za održavanje relativne vlažnosti skladišnih uvjeta. Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO USA) i natrijev karbonat (Grammol, Zagreb, Hrvatska) korišteni su za određivanje ukupnih fenola.

3.2. PRIPREMA FILMOVA/PREVLAKA

U ovome radu pripremljeni su prevlakafilmovi od izolata proteina sirutke (WPI) otapanjem 6 g praha proteina sirutke u 100 mL destilirane vode uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici pri 80 °C tijekom 30 min. U drugom koraku dodaje se 3 g glicerina, također uz miješanje tijekom 10 min. Za pripremu filmova obogaćenih ekstraktom lista koprive, isti se dodaje u koncentracijama od 1 i 2 % (*m/V*) (uz miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 45 min) za pripremu. Tako pripremljene otopine se izlijevaju u Petrijeve zdjelice (uz prethodno izračunati volumen/masu za podloge točno određenih dimenzija) te se suše u ventiliranoj klimatskoj komori (Mettler HPP100, Mettler, Njemačka) 24 sata pri kontroliranim uvjetima temperature (30 °C) i relativne vlažnosti (50 % RH). Nakon sušenja, osušeni filmovi se pažljivo uklanjaju te čuvaju na filter papirima u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (~ 53 % RH, zasićena otopina magnezijevog nitrata).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje svojstava filmogenih otopina

3.3.1.2. Mjerenje pH vrijednosti biopolimernih otopina

pH vrijednost definiramo kao negativni dekadski logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini. Broj je koji govori o kiselosti (aciditetu) odnosno lužnatosti (alkalitetu) otopine. pH vrijednost pripremljenih otopina određena je uz pomoć uređaja pH metra FiveGO (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Za svaki uzorak provedene su 3 paralele mjerenja, a srednja vrijednost istih, uzeta je za rezultat.

3.3.1.3. Mjerenje viskoznosti otopine biopolimera

Viskoznost biopolimernih otopina određena je na viskozimetru (Lamy Rheology RM 100 Plus, Champagne au Mont d'Or, Francuska). Za svako mjerenje pripremljene su svježe otopine biopolimera. Mjerenje viskoznosti provedeno je pri brzini smicanja od 1280 s^{-1} . Dobivene su vrijednosti viskoznosti (Pa s) i obrtne sile (mN m^{-1}).

U mjerni cilindar za uzorak ulije se 20 mL uzorka te se u uroni mjerno tijelo. Na ekranu uređaja odabere se program mjerenja MS-C-19-C i podesi se brzina smicanja 1280 s^{-1} . Mjerenje je provedeno na sobnoj temperaturi ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) te su 3 paralele mjerenja provedene za svaki uzorak, a njihova srednja vrijednost je uzeta kao rezultat.

3.3.2. Određivanje svojstava filmova

3.3.2.1. Debljina filmova

Kontaktnom metodom pomoću digitalnog mikrometra (Helios Preisser DIGI-MET, Gammertingen, Njemačka, s preciznošću od 0,001 mm) izmjerena je debljina filmova. Za svaki film određena je debljina na 5 različitih mjesta, a rezultati su izraženi u mikrometrima (μm) kao srednja vrijednost mjerenja sa pripadajućom standardnom devijacijom.

3.3.2.2. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz film

Propusnost filmova na vodenu paru mjerena je gravimetrijski pomoću modificirane ASTM E96-80 standardne metode (1980), prilagođene za biomaterijale (Debeaufort i sur., 1993). Uzorak se pomoću vakuum masti i teflonskog prstena fiksira na vrh mjerne čašice u kojoj se nalazi destilirana voda (100 % RH). Uzorci se čuvaju 10 dana u ventiliranoj klima komori

(Memmert HPP110, Memmert, Schwabach, Njemačka), gdje su uvjeti točno definirani uvjeti, temperatura 25 °C i relativna vlažnost 30 % RH, a prije stavljanja uzoraka u ventiliranu klima komoru početna masa se izmjeri na analitičkoj vagi odmah nakon zatvaranja uzoraka, te jednom dnevno do kraja mjerenja.

Propusnost na vodenu paru (WVP) izračuna se pomoću formule [4]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [4]$$

gdje je:

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

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

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

x – debljina filma (m),

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

3.3.2.3. Mjerenje propusnosti kisika i ugljikovog dioksida kroz film

Određivanje propusnosti plina provedeno je pomoću manometrijske metode na uređaju za mjerenje propusnosti Brugger, GDP - C (Brugger Feinmechanik GmbH, Munich, Njemačka). Metoda se zasniva na propuštanju plina kroz uzorak koji je postavljen kao barijera između dvije komore dok se tlak ne izjednači s gornje i donje strane. Najprije se provede vakuumiranje (evakuacija) mjernog volumena pomoću vakuum pumpe, a vrijeme trajanja ovisi o vrsti mjenog materijala (30 min). Zatim se pod atmosferskim tlakom kroz jednu stranu uzorka propušta ispitivani plin (O_2 ili CO_2). Zbog razlike u tlaku s gornje i donje strane filma, plin difundira kroz ispitivani uzorak što je vidljivo kao postepeni porast tlaka koji se registrira na računalu. Podaci su zabilježeni u računalnom programu, a očituju se kao vrijednost permeacije (izražena u $\text{cm}^3 \text{m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{bar}^{-1}$). Koeficijent propusnosti kisika (PO_2) i ugljikovog dioksida (PCO_2) izračunata je kao aritmetički produkt dobivene permeacije i srednje vrijednosti debljine filma (izražen u $\text{cm}^3 \text{m}^{-1} \text{d}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) [5] i [6]:

$$\text{PO}_2 = q * d \quad [5]$$

odnosno

$$\text{PCO}_2 = q * d \quad [6]$$

gdje je:

q = permeacija ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ bar}^{-1}$),

d = debljina filma (μm).

3.3.2.4. 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 deformacija viđenja boja. Koordinate CIELAB sustava boja se temelje na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Raspon boja crveno-zeleno za os a , 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 može ljudsko oko percepirati (Petrović i sur., 2013). Boja filmova određena je pomoću kolorimetra (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d). Za svaki uzorak mjerenje je provedeno na 10 mjesta, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

Kolorimetrijska razlika (ΔE) prikazuje odstupanje reflektirane boje od kontrole, a računa se prema izrazu [7]

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}, \quad [7]$$

$$\Delta L = L_0 - L_1$$

$$\Delta a = a_0 - a_1$$

$$\Delta b = b_0 - b_1$$

gdje su:

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

L_1, a_1, b_1 - vrijednosti ispitivanoga uzorka boje (Petrović i sur., 2013).

3.3.2.5. Određivanje transparentnosti

Mjerenje transparentnosti se provelo na UV/VIS spektrometru (Perkin Elmer Lambda 25, SAD) i to mjerenjem apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 600 nm i 650 nm (Peng i sur., 2013). Iz podatka o apsorbanciji se izračuna transparentnost filma prema slijedeći jednadžbi [8]:

$$T = \text{Abs}_{(\text{nm})} / I \quad [8]$$

gdje su:

T – transparentnost,

Abs – apsorbancija (vrijednost pri 600 nm i 650 nm),

l – debljina (mm)

3.3.2.7. *Određivanje ukupnih fenola u filmovima*

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm. Metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom najšira je u upotrebi za određivanje ukupnih fenola. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. To su kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid te su oni plavo obojeni. Galna kiselina koristi se kao standard za izradu baždarne krivulje.

Uzorci točno određene mase (približno 0,2 g) drže se u destiliranoj vodi (20 mL) tijekom 24 h kako bi se ekstrahirali svi u vodi topivi fenoli iz uzorka filma. Nakon 24 h, u staklenu epruvetu otpipetira redom 100 µL uzorka (vodena faza), 200 µL Folin-ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijevog karbonata i sve se dobro vortexira (IKA Vortex, Staufen, Njemačka). Uzorci se termostatiraju 25 minuta u kupelji pri temperaturi od 50 °C. a zatim se uzorci preliju u staklene kivete, mjeri se apsorbancija na spektrofotometru (UV–VIS Perkin Elmer, Shelton, SAD) na valnoj duljini od 765 nm. Na isti način priprema se i slijepa proba, razlika je samo što se umjesto uzorka uzima 100 µL destilirane vode. Za svaki uzorak određuju se po 3 paralele, a njihova srednja vrijednost uzima se kao rezultat. Iz jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline/g uzorka filma.

3.4. OBRADA PODATAKA

Svi su se podaci statistički proveli analizom varijance (ANOVA) pomoću Xlstat – Pro 7.5.3. (Addinsoft, SAD). Podaci su rangirani prema uzorcima i metodama mjerenja, a statističke razlike ocijenjene su u redovima s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukey-evim višestrukim usporednim testovima. Vrijednost $p > 0,5$ smatra se statistički značajnom. Dobiveni različiti eksponenti (^{a-d}) unutar stupca, za istu vrstu mjerenja, ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prilikom izrade ovog rada pripremljeni su filmovi na bazi izolata proteina sirutke i jestivog biljnog glicerina kao plastifikatora. Radi usporedbe i utvrđivanja mogućnosti razvoja funkcionalnih filmova, dodane su različite koncentracije ekstrakta lista koprive kojima su se filmovi obogatili s 1 % (m/V) te 2 % (m/V). Provedena je karakterizacija kao i ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava (pH vrijednost, viskoznost, debljina, boja i transparentnost) na sva tri pripremljena filma. Osim toga, na istima su se ispitala barijerna svojstva filma odnosno propusnost na vodenu paru te brzina prijenosa vodene pare, propusnost na kisik i ugljikov dioksid. Također, bilo je potrebno utvrditi i bioaktivni sastav filma, konkretno izmjeriti sadržaj ukupnih fenola. Dobiveni rezultati su prikazani grafički i tablično.

Izmjerene vrijednosti za vrijednosti pH i viskoznosti filmogenih otopina prikazane u tablici 2. Debljina, propusnost vodene pare (gravimetrijski određena modificiranom standardnom ASTM metodom E96-80) i brzina prijenosa vodene pare, prikazane su u tablici 3 za sva tri pripremljena filma, dok su parametri boje (L^* , a^* , b^* , ΔE) i transparentnost (T_{600} i T_{650}) pripremljenih filmova prikazani na slici 2 i u tablici 4. Propusnost filma na kisik i ugljikov dioksid prikazana je grafički na slici 3, dok je izmjerena vrijednost udjela ukupnih fenola, provedena spektrofotometrijskom metodom, grafički prikazana na slici 4.

4.1. pH I VISKOZNOST BIOPOLIMERNOG FILMA

Rezultati pH vrijednosti filmogenih otopina prikazani su u tablici 2. Sve izmjerene vrijednosti su oko pH 7, odnosno predstavljaju neutralan medij, što se pripisuje tome da se za pripremu koristila destilirana voda. Nema statistički značajne razlike među uzorcima, neovisno o prisutnosti dodatka ekstrakta koprive. Stoga, može se zaključiti da dodatak ekstrakta lista koprive gotovo da i ne utječe na vrijednost pH.

Poznavanje pH filmogene otopine koja stvara film važan je parametar za fizikalna i mehanička svojstva filma. Prema Papadaki i sur. (2022) niže ili više pH vrijednosti od izoelektrične točke (pI) proteina sirutke (oko 5,5) rezultiraju pozitivno odnosno negativno nabijenim proteinima, što omogućuje stvaranje odbojnih elektrostatskih sila. Što je pH više različit od pI, razvijaju se jače odbojne sile, čime se sprječava agregacija proteina i dovodi do prozirnijih filmogenih otopina i suhih filmova. Tako su, primjerice, filmovi proizvedeni pri neutralnom pH u radu Papadaki i sur. (2022) bili bjelkasti dok su prozirni filmovi bili dobiveni pri višim pH vrijednostima.

Viskoznost definiramo kao fizikalnu veličinu koja se javlja u unutrašnjosti tekućine kao otpor uslijed trenja pri kretanju njihovih čestica (Jerbić, 2014). Viskoznost je posljedica djelovanja međumolekulskih sila kohezije u fluidu te sila adhezije između fluida i krutog tijela kroz koje se strujanje odvija. Viskoznost filmogenih otopina u ovom radu dana je u tablici 2. Nema statistički značajne promjene u viskoznosti otopina s dodatkom ekstrakta lista koprive u odnosu na kontrolni uzorak, što znači da ugradnjom ekstrakta u proteinski kompleks nije došlo do promjene u strukturi koja bi uzrokovala bilo kakvo značajnije kretanje u sustavu, odnosno promjene viskoznosti otopine. Vrijednosti su niže u usporedbi s izmjerenim vrijednostima u radu Li i sur. (2023), no autori su proveli mjerenje pri značajno nižim brzinama smicanja. Prema autorima, povećanje brzine smicanja može uzrokovati uništavanje mrežne strukture proteina, smanjujući prividnu viskoznost. Iako su navedeni autori pokazali da se prividna viskoznost povećala se s povećanjem dodatka inulina kao aktivnog sastojka, u ovom radu to nije slučaj, odnosno dodatak ekstrakta koprive u koncentracijama od 1 i 2 % (m/V) ne utječe na viskoznost filmogene otopine.

Tablica 2. Prikaz izmjerenih vrijednosti pH i dobivenih vrijednosti za viskoznost (Pa s)

UZORAK	pH	Viskoznost (Pa s)
WPI	7,16 ± 0,01 ^a	0,003 ± 0,000 ^a
WPI + 1%	7,12 ± 0,01 ^b	0,002 ± 0,001 ^a
WPI + 2%	7,10 ± 0,00 ^c	0,003 ± 0,000 ^a

*Različiti eksponenti (^{a-c}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$) WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1% - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1 % (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

4.2. DEBLJINA FILMA I PROPUSNOST NA VODENU PARU

4.2.1. Debljina filma

Debljina filma jedan je od ključnih faktora koji izravno utječe na barijerna i mehanička svojstva filmova/prevlaka. Iako su filmovi nastali izlijevanjem jednake količine filmogene otopine u Petrijeve zdjelice istog promjera, debljina filma kod uzoraka sa dodanim ekstraktom se povećala, što je prikazano u tablici 3. Nešto veća promjena opažena je kod uzorka u kojem se dodala koncentracija od 1 % (m/V) ekstrakta lista koprive (WPI+1 %) i iznosila je 216,0 μm u odnosu na uzorak bez ekstrakta (WPI) čija je vrijednost bila 116,0 μm , a za pretpostavljati je da je do takvih vrijednosti došlo i zbog mogućih oštećenja filma prilikom pripreve i/ili mjerenja. Rezultati su u skladu sa dosadašnjim znanstvenim istraživanjima. Sivarooban i suradnici (2008) također su utvrdili značajno povećanje debljine filmova uklopljenog ekstrakta sjemenke grožđa u proteinsku strukturu filma. Izmjerena vrijednost kontrolnog filma bila je 33,02 μm , a dodatkom ekstrakta, vrijednost se povisila na 77,82 μm , što odgovara izmjerenim vrijednostima eksperimentalnih uzoraka ovog rada.

Tablica 3. Debljina filma (μm), propusnost na vodenu paru (WVP) i brzina prijenosa vodene pare ($WVTR$)

UZORAK	Debljina filma (μm)	WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) $\cdot 10^{-10}$	$WVTR$ ($\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$) $\cdot 10^{-10}$
WPI	$114,9 \pm 1,9^c$	$5,01 \pm 0,21^b$	$0,96 \pm 0,04^b$
WPI + 1%	$216,0 \pm 20,0^a$	$10,59 \pm 1,08^a$	$1,08 \pm 1,04^{ab}$
WPI + 2%	$152,4 \pm 13,3^b$	$8,08 \pm 1,17^a$	$1,17 \pm 0,09^a$

*Različiti eksponenti (^{a-c}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$) WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1 % (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

4.2.2. Propusnost filmova na vodenu paru i brzina prijenosa vodene pare

Kako bi se što bolje očuvala kvaliteta proizvoda, vrlo je bitno poznavati i barijerna svojstva obzirom da ona u velikoj mjeri ovisi o organoleptičkim i mikrobiološkim svojstvima. Kisik je jedan od ključnih faktora koji uzrokuju oksidacijske promjene kod većine proizvoda što dovodi do kvarenja namirnice pa ga je iz tog razloga poželjno eliminirati kod brojnih prehrambenih proizvoda. Također, velika količina vodene pare ubrazava mikrobiološko kvarenje. Važno je napomenuti, da propusnost filma osim što ovisi o vrsti polimera i permeata, također ovisi i o koncentraciji i tlaku, a ključno o debljini filma jer izravno utječe na njihova barijerna svojstva. Ugradnja bioaktivnih spojeva (poput polifenola) u kitozanske filmove dovodi do povećanja sadržaja vlage, odnosno i veće sposobnosti adsorpcije vode. Hidrofilnost je direktno povezana sa udjelom vlage odnosno hidrofilni filmovi imaju viši udio relativne vlažnosti (Bourbon i sur., 2011), dok niže vrijednosti WVP znače bolju barijeru filma na vodenu paru (Atef i sur., 2015). Filmovi bez dodataka bili su niže propusnosti na vodenu paru nego filmovi s dodatkom ekstrakta koprive, neovisno o koncentraciji (tablica 2). Vrijednosti su bile u redu veličine $10^{-10} \text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ što je u skladu s dostupnom znanstvenom literaturom za isti tip materijala (Cakmak i sur., 2020). Povećana propusnost u uzorcima s dodatkom ekstrakta koprive može se pripisati promjenama u strukturi materijala nakon procesa sušenja, gdje je moguće da spojevi prisutni u ekstraktu (npr. fenoli) utječu na preraspodjelu proteinskih lanaca u kristalnoj rešetki matriksa. Općenito, dugo je poznata činjenica da proteinski filmovi izliveni iz vodenih otopina nisu obećavajuće vodene barijere (Kokoszka i sur., 2010), a upravo krhkost i loša barijera ograničavaju primjenu folija iz izolata proteina sirutke (WPI) u sektoru pakiranja hrane (Baldone Lara i sur., 2021). Nadalje, moguća su i mikro-oštećenja nastala tijekom odljepljivanja filma s podloge za izlivanje ili tijekom rukovanja. Slična opažanja zabilježili su

Mahjoorian i suradnici (2021) koji su u svom istraživanju ispitivali utjecaj ugradnje eteričnog ulja koprive u želatinski film te okarakterizirali fizikalna, antimikrobna i morfološka svojstva. Prema autorima, zbog prisutnosti hidrofilnih skupina, proteinski filmovi kao što je želatina pokazuju nepropusnost prema vodenoj pari dok dodavanjem eteričnog ulja koprive mogu nastati pukotine u strukturi filma što onda uzrokuje povećanje propusnosti vodene pare. Prema Papadaki i sur. (2022) površinska hrapavost i veća poroznost filmova izlivenih iz otopina s pH 7 kao što su bile vrijednosti i u ovom radu, mogu razjasniti viši WVP jer su autori otkrili da je jačina disulfidnih veza pri neutralnom pH lošija, odnosno povišenje pH promovira bolje međumolekularno S–S vezivanje i hidrofobne interakcije, a time i proizvodnju kohezivnijih i manje propusnih filmova. Iako filmovi iz ovog rada nisu vizualno bili hrapavi (potpoglavlje 4.3.), riječ je o promjenama na mikroskali.

Izmjerene vrijednosti za brzinu prijenosa vodene pare (*WVTR*) najniže su za kontrolni uzorak, a najviše za uzorak s dodatkom 2 % (*m/V*) ekstrakta. Budući da brzina prijenosa vodene pare opisuje količinu vodene pare koja prolazi kroz materijal tijekom određenog razdoblja, to je važan pokazatelj kvalitete u pakiranju hrane, jer je učinkovita barijera za vlagu ključna za održavanje proizvoda svježima i sprječavanje kvarenja. Također, budući su kontrolni uzorci manje propusni na vodenu paru, za očekivati je da je i brzina prijenosa vodene pare niža kod ovih uzoraka.

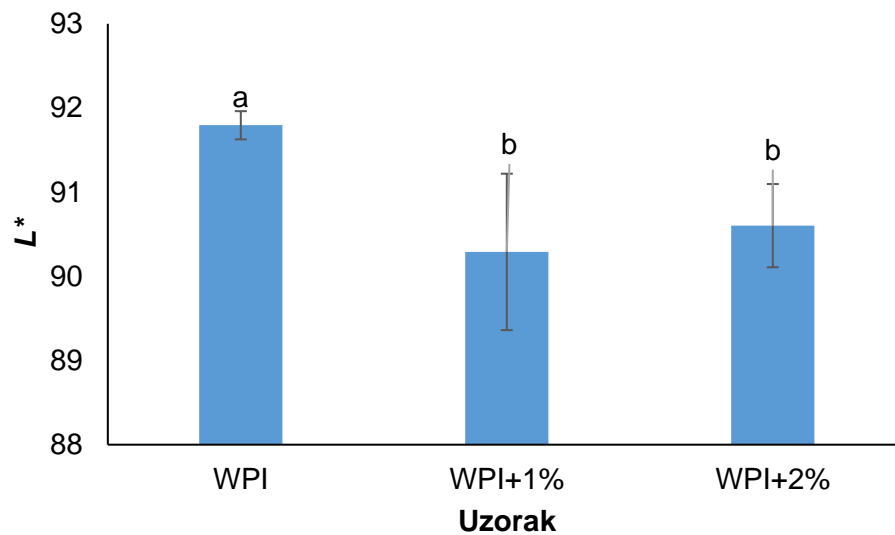
4.3. BOJA I TRANSPARENTNOST FILMOGENIH OTOPINA

4.3.1. Boja filma

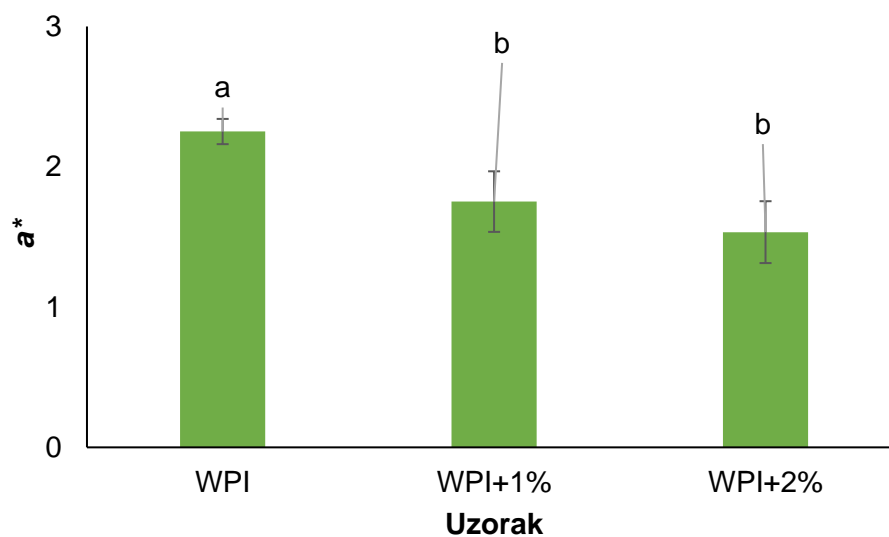
Boja jestivog filma određena je CIE L^* , a^* , b^* prostornim modelom. Rezultati analize kolorimetrijskih parametara na uzorcima WPI, WPI+1 % te WPI+2 % prikazani su na slici 3. Iz izmjerenih vrijednosti vidljivo je da nema statistički značajne razlike ovisno o vrsti filma, odnosno filma bez ekstrakta i filmova sa dodanim koncentracijama ekstrakta. Vrijednost za parametar L^* ukazuje na svjetlinu filma, gdje je vrijednost 0 tamno (crno), a 100 svijetlo (bijelo). U usporedbi sa uzorkom filma koji ne sadrži ekstrakt lista koprive WPI, izmjerene vrijednosti uzoraka sa ekstraktom za L^* vrijednost kod WPI iznosila je 91,79, dok je kod WPI+1 % bila 90,29 te za WPI+2 % 90,60, što ukazuje da se indeks svjetline smanjio dodavanjem ekstrakta koprive. Vizualni dojam je da je kontrolni uzorak je bio proziran do blago žutog obojenja.

Na raspon boja (crveno-zeleno) ukazuje parametar a^* , dok parametar b^* ukazuje na raspon boja (žuto-plavo). Kontrolni uzorak je imao najvišu vrijednost a^* koja se smanjila dodatkom ekstrakta, neovisno o koncentraciji ekstrakta ukazujući na povećanje zelenog tona

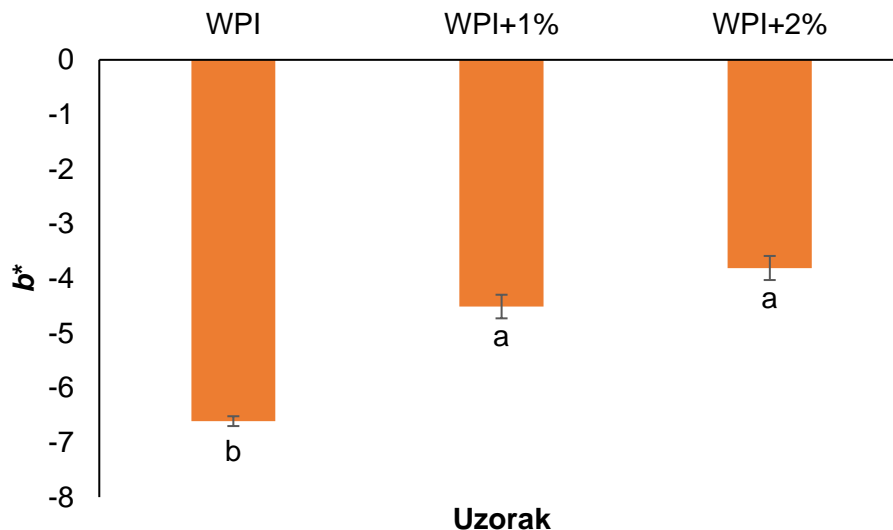
boje u uzorcima s ekstraktom. To se pripisuje prirodnoj boji ekstrakta koprive, njegovom sastavu i prisutnosti pigmenata, među kojima je najzastupljeniji kolorfil, koje očigledno utječu na boju filma nakon njegovog dodavanja. Iako su vrijednosti parametra b^* kod svih uzoraka bile negativne, kod uzoraka s dodatkom ekstrakta ove vrijednosti su također statistički značajno različite u odnosu na kontrolni uzorak.



a)



b)



c)

Slika 2. Parametri boje proizvedenih filmova a) svjetlina L^* , b) parametar a^* , i c) parametar b^*

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

WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1% - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1 % (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

Karakteristike boje jestivih filmova jedno su od fizičkih svojstava koje je vrlo važno jer će utjecati na izgled proizvoda prilikom apliciranja i uz okus i teksturu jedno od tri važna aspekta u prihvaćanju hrane (Papadaki i sur., 2022)

Ukupna razlika boje izračunata je u odnosu na kontrolni uzorak ΔE (tablica 4). Filmovi s dodatkom ekstrakta koprive razlikovali su se od kontrolnog, no nije bilo statistički značajne razlike ovisno o koncentraciji dodanog ekstrakta. ΔE za oba filma sa ekstraktom iznosile su oko 3, što ukazuje na moguće razlike koje se percipiraju ljudskim okom na graničnoj razini. Rezultati istraživanja u skladu su sa istraživanjima koje su proveli Mahjoorian i suradnici (2021) (želatina s koprivom) i Haghju i suradnici (2016) (kitozana s koprivom) gdje su također uočene statistički značajne razlike u obojenosti dodatkom koprive u različite formulacije. Slično su dokazali i Norajit i suradnici (2010) koji su proveli ispitivanje ugradnje ekstrakta bijelog i crvenog ginsenga na biorazgradive alginatne filmove.

4.3.2. Transparentnost

Transparentnost (T) definiramo kao propusnost filma na svjetlost i važno je fizikalno-kemijsko svojstvo zbog toga što utječe na zaštitu proizvoda od svjetlosti sprječavajući tako neželjene reakcije fotooksidacije. Bitno je naglasiti da je poželjno da jestivi film/prevlaka kao ambalažni materijal imaju visoku transparentnost kako ne bi utjecali na izgled proizvoda, no

ne i ako je cilj zaštita od fotooksidacije kada je manja transparentnost poželjno svojstvo. Što je vrijednost T veća, to je manja transparentnost filma, odnosno film odbija više svjetlosti nego što je apsorbira. Iz rezultata koji su prikazani u tablici 4, T_{600} vrijednost kontrolnog uzorka iznosila je 0,69 a T_{650} 0,68 ukazujući da je kontrolni film vrlo transparentan.

Tablica 4. Ukupna razlika u obojenosti i transparentnost filmova od izolata proteina sirutke s i bez dodatka ekstrakta lista koprive

UZORAK	ΔE	T_{600} (%)	T_{650} (%)
WPI	0,00±0,00 ^b	0,69±0,22 ^a	0,68±0,22 ^a
WPI + 1%	2,68±1,22 ^a	0,21±0,00 ^b	0,20±0,00 ^b
WPI + 2%	3,14±1,03 ^a	0,46±0,09 ^{ab}	0,44±0,08 ^{ab}

*Različiti eksponenti (^{a-c}) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$) WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1% (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

Filmovi sa ekstraktom WPI+1 % i WPI+2 % su manje transparentni u odnosu na kontrolni uzorak. Razlog manje transparentnosti filma sa ekstraktom je posljedica prisutnih obojenih bioaktivnih spojeva iz ekstrakta lista koprive, kao npr. klorofila i karotenoida (Repajić i sur., 2021). Zhao i sur. (2022) su također objavili da su WPI filmovi vrlo transparentni u rasponu valnih duljina vidljive svjetlosti. Također, isti autori ukazuju da debljina filma nije osnovni parametar koji utječe na transparentnost filma, što se podudara i sa rezultatima ovog istraživanja budući da su evidentne razlike u debljini filmova no transparentnost ne slijedi vidljivi trend. Filmovi s ekstraktom koprive više su transparentni od onih iz istraživanja Alvarez-Perez i sur. (2022) gdje je transparentnost filmova od proteina sirutke s dodatkom polifenola iznosila više od 1 % u usporedbi s ovim istraživanjem gdje se vrijednosti T_{600} kreću od 0,21 do 0,46 %.

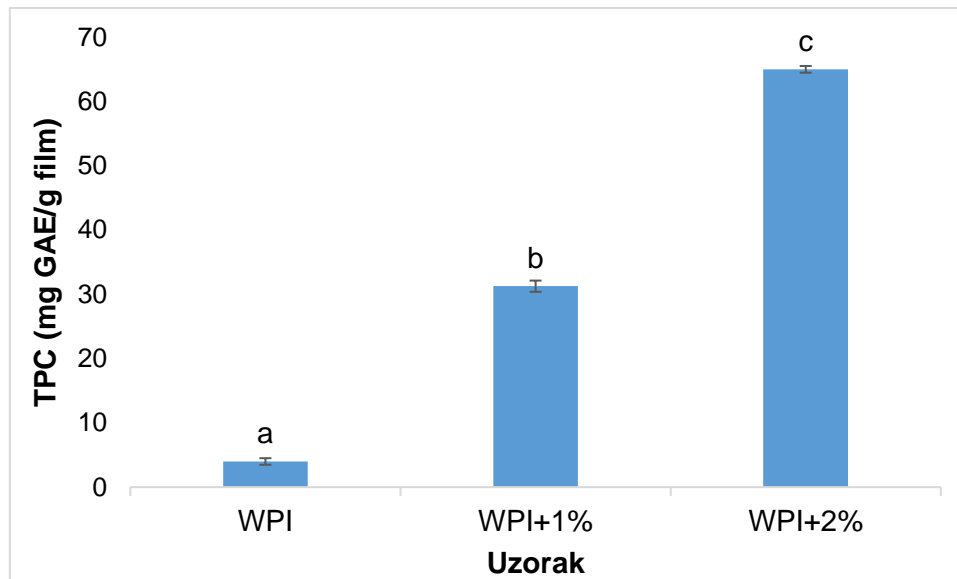
4.4. UDIO UKUPNIH FENOLA

Rezultati mjerenja ukupnih fenola prikazani su grafički na slici 3. U uzorcima filma sa dodanim ekstraktom lista koprive udio ukupnih fenola statistički je značajno veći u odnosu na kontrolni uzorak i iznosi od 30 do 60 mgGAE/g filma. Također, dodatkom veće količine ekstrakta raste i udio ukupnih fenola u filmu. Iako u kontrolnom uzorku nema fenola, Folin-Ciocalteuov reagens nije specifičan za fenolne spojeve i može reagirati s drugim tvarima kao što su aromatske aminokiseline; stoga su rezultati dobiveni ovom metodom mjera redukcijskog kapaciteta uzorka i određeni signal odnosno količina je izmjerena i u kontrolnom uzorku (De Morais i sur., 2022).

Budući fenolni spojevi mogu stupiti u interakciju s proteinima, što dovodi do stvaranja topivih ili netopivih kompleksa i što može utjecati na njihovu bioaktivnost, mogućnost detekcije nakon otapanja filma je poželjna. Interakcija fenolnih spojeva s mliječnim proteinima može utjecati na antioksidativni kapacitet, bilo povećanjem ili smanjenjem ovog svojstva (de Morais i sur. 2022). Prema Elez-Garofulić i sur. (2021) osnovni fenolni spojevi koji se mogu naći u ekstraktu koprive su umbelliferon, protokatehuinska kiselina, isorhamnetin 3-O-rutinozid, kamferol-3-O-rutinozid, kamferol, mircetin, luteolin, kafeinska kiselina, eskuletin, kininska kiselina, kvercetin-3-rutinozid, p-kumarinska kiselina, cimetna kiselina, apigenin, epigalokatehin galat, ferulinska kiselina, kemferol pentozid, kemferol ramnozid, kvercetin-acetil-rutinozid, p-hidroksibenzojeva kiselina, galna kiselina, epikatehin, epikatehin galat, kamferol, koji su odgovorni i za antioksidacijsku aktivnost.

U znanstvenoj literaturi dostupni su mnogobrojni radovi u kojima se istražuju formulacije jestivih filmova od proteina sirutke s dodacima bioaktivnih spojeva, kao npr. dodatak polifenola iz čajevca (Ming i sur., 2020), iz ružmarina i kadulje (Kontogianni i sur., 2022), ekstrakta zrna kave (Papadaki i sur., 2022) i sl.

Alvares Perez i sur. (2022) su pokazali da se dodatkom ekstrakta biljke i značajno povision udio polifenola u filmu od proteina sirutke. Također autori su pokazali da su upravo polifenoli odgovorni za promjene u topljivosti i transparentnosti filma, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja (potpoglavlje 4.3.2.). U jestivim filmovima udio ukupnih fenola pokazatelj je zaštitne uloge jer fenoli djeluju baktericidno i antioksidativno. Isto tako imaju antiupalno i antikancerogeno djelovanje zbog toga povoljno utječu na zdravlje ljudi.



Slika 3. Udio ukupnih fenola (TPC) u uzorcima filma od izolata proteina sirutke.

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

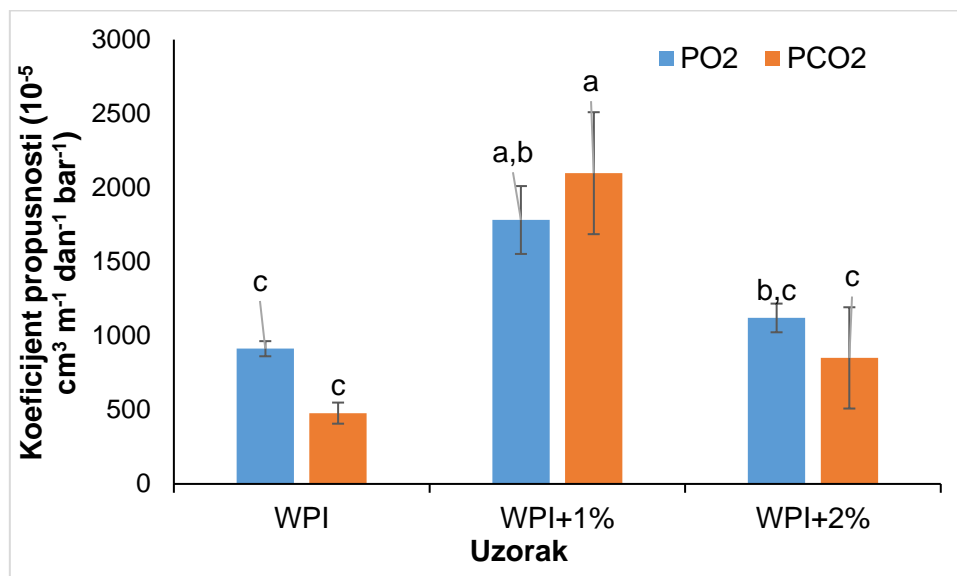
WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1 % (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

4.5. PROPUSNOST NA KISIK I UGLJIKOV DIOKSID

Vrijednosti propusnosti filmova na kisik i ugljikov dioksid prikazani su na slici 4. Polisaharidi i proteini su polimeri koji mogu formirati snažne molekulske veze što posljedično stvara dobru barijeru za plinove kao što su O_2 te CO_2 (Andrade i sur., 2012). Viša vrijednost PO_2 znači veću propusnost za kisik, a isto tako viša vrijednost PCO_2 znači veću propusnost za ugljikov dioksid.

Film s dodatkom 1 % ekstrakta (WPI+1 %) ima veću propusnost za kisik u odnosu na uzorak bez ekstrakta. Isto tako, rezultat mjerenja za PCO_2 kod filma sa ekstraktom WPI+1 % bio je viši u odnosu na WPI što znači da ima veću propusnost za CO_2 . Do povišenja vrijednosti dolazi zbog narušavanja strukture filma dodatkom ekstrakta. Nadalje, dodatkom veće koncentracije ekstrakta dolazi do smanjenja propusnosti na plinove. Suprotno rezultatu ovog istraživanja, u literaturi je zabilježeno da antioksidansi kao što su ferulična kiselina i ekstrakt propolisa dovode do smanjenja propusnosti kitozanskih filmova na kisik zbog interakcije između aktivne komponente i polimera odnosno umrežavanja (eng. *crosslinking*) (Aljawish i sur., 2016; Siripatrawan i Vitchayakitti (2016). Prema literaturi, filmovi proteinskih izolata imaju manju propusnost kisika od neionskih polisaharidnih filmova zbog nižeg slobodnog prostora između polimernih lanaca, dok ugradnja funkcionalnih dodataka kao što su eterična ulja i njihovi izolirani sastojci oblikuju heterogenu matricu koja se sastoji od proteina i ulja, što dovodi do veće propusnosti plina (Cakmak i sur., 2020).

U skladu s navedenim, moguće je da su bioaktivne tvari u listu koprive, među kojima su i neki antioksidansi dovele do uočenog smanjenja PO_2 i PCO_2 kod filma s dodatkom 2 % (m/V) ekstrakta koprive.



Slika 4. Koeficijent propusnosti kisika i ugljikovog dioksida u filmovima od izolata proteina sirutke s i bez dodatka ekstrakta lista koprive.

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

WPI – film na bazi izolata proteina sirutke, WPI+1 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 1% (m/V) ekstrakta lista koprive, WPI+2 % - film na bazi izolata proteina sirutke uz dodatak 2 % (m/V) ekstrakta lista koprive

Propusnost kisika je možda i najčešće istraženo svojstvo jestivih filmova budući da kisik utječe na degradaciju hrane, uključujući užeglost masti i ulja, rast mikroorganizama, enzimsko posmeđivanje i gubitak vitamina. Iako je propusnost jestivih filmova, često značajno niža ili u rangu sintetskih polimera i barijernih prevlaka (npr. EVOH), ovisno o modifikaciji strukture funkcionalnim dodacima prirodnog podrijetla (npr. ekstrakt koprive) može doći do značajnog narušavanja ovog svojstva. Razlog može biti i zbog polarne prirode i nelinearne strukture, što rezultira većim slobodnim volumenom (Kandasamy i sur., 2021). Propusnost na plinove kod hidrofilnih filmova kao što je WPI značajno se mijenja s povišenjem RH okoline, pa je stoga prilikom njihove primjene važno poznavati RH okoline.

Održavanje RH ključno je za maksimiziranje učinkovitosti jestivih filmova kao funkcionalnih barijera, budući da viša RH može znatno povećati propusnost na kisik i ugljikov dioksid. Također, zbog izvrsne barijere na kisik, ali slabih mehaničkih svojstva i već spomenute osjetljivosti na vlagu, njihova industrijska upotreba kao materijala za pakiranje hrane je ograničena. Ipak, kako bi se prevladala ta ograničenja, izolat proteina sirutke bi se mogao

koristiti ne samo kao jestivi film već i kao funkcionalna prevlaka na sintetički polimerni film (Song i sur., 2022).

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak ekstrakta lista koprive gotovo da i ne utječe na vrijednost pH. Sve prisutne koncentracije ekstrakta nisu pokazale statistički značajnu razliku među uzorcima.
2. Dodatak ekstrakta lista koprive od 1 i 2 % (*m/V*) ne utječe na viskoznost filmogene otopine.
3. Prisutnost ekstrakta lista koprive povećava debljinu filma. Filmovi sa ekstraktom imaju veću debljinu, WPI+1 % (216,0 μm) te WPI+2 % (152,4 μm) u odnosu na film bez ekstrakta WPI (116,0 μm) .
4. Dodatak ekstrakta lista koprive utječe na barijera svojstva filmogenih otopina. Filmovi sa ekstraktom pokazali su veću propusnost na vodenu paru u odnosu na film bez sadržaja istih. Vrlo je vjerojatno da spojevi prisutni u ekstraktu (npr. fenoli) utječu na preraspodjelu proteinskih lanaca u kristalnoj rešetki matriksa nakon procesa sušenja.
5. Izmjerene vrijednosti za brzinu prijenosa vodene pare najniže su kod kontrolnog uzorka WPI, a najviše kod uzorka s dodatkom 2 % (*m/V*). S obzirom da su kontrolni uzorci manje propusni na vodenu paru, bilo je i za očekivati da će i brzina prijenosa vodene pare biti niža kod istih.
6. Kontrolni uzorak je proziran do blago žutog obojenja. Dodatkom ekstrakta, vrijednost a^* se smanjila kod kontrolnog uzorak što ukazuje na povećanje zelenog tona kod uzoraka sa ekstraktom. Vrijednosti za b^* kod uzoraka sa ekstraktom su značajno različite u odnosu na kontrolni uzorak
7. Filmovi sa ekstraktom su manje transparentni u odnosu na kontrolni uzorak zbog prisutnih bioaktivnih spojeva iz ekstrakta lista koprive poput klorofila i karotenoida.
8. Udio ukupnih fenola u uzorcima sa dodanim ekstraktom lista koprive značajno je veći u odnosu na kontrolni uzorak. Iz rezultata je vidljivo da i dodatkom veće količine ekstrakta udio ukupnih fenola raste i iznosi 30 do 60 mgGAE/g filma.
9. Film sa dodatkom 1 % (*m/V*) ekstrakta ma veću propusnost za kisik i ugljikov dioksid u odnosu na kontrolni uzorak. Kod filma sa dodatkom 2 % (*m/V*) ekstrakta došlo je do vidljivog smanjenja propusnosti za kisik i ugljikov dioksid. Razlog tomu pripisujemo bioaktivnim tvarima u listu koprive, među kojima su i neki antioksidansi.

6. LITERATURA

Al-Hilifi SA, Al-Ibresam OT, Al-Hatim RR, Al-Ali RR, Maslekar N, Yao Y, Agarwal V (2023) Development of Chitosan/Whey Protein Hydrolysate Composite Films for Food Packaging Application. *J Comp Sci* **7(3)**, 94. <https://doi.org/10.3390/jcs7030094>

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

Alvarez-Perez OB, Ventura-Sobrevilla JM, Torres-León C, Rojas-Molina R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González MA (2022) Development and characterization of whey protein films incorporated with tarbush polyphenols and candellila wax. *Food Biosci* **45**. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101505>

Ângelo M, Nuno R, Pereira C, Leandro Ó, Ramos, DS, António J, Teixeira C, & Augusto Vicente, A (2016) Edible Food Packaging: Materials and Processing Technologies, 1. izd., CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19468>

Andrade RD, Skurtys O, Osorio FA (2012) Atomizing Spray Systems for Application of Edible Coatings. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **11(3)**, 323-337. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00186.x>

Arismendi C, Chillo S, Conte A, Del Nobile, MA., Flores S, Gerschenson LN (2013) Optimization of physical properties of xanthan gum/tapioca starch edible matrices containing potassium sorbate and evaluation of its antimicrobial effectiveness. *LWT- Food Sci Tech* **53**, 290–296.

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

Baldone-Lara RB, De Andrade PS, Guimarães Junior, M i sur. (2021) Novel Whey Protein Isolate/Polyvinyl Biocomposite for Packaging: Improvement of Mechanical and Water Barrier Properties by Incorporation of Nano-silica. *J Polym Environ* **29**, 2397-2408. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02033-x>

Berk Z (2018) Food process engineering and technology, 3. izd., Academic Press, Cambridge.

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

Bourbon AI, Pinheiro AC, Cerqueira MA, Rocha CMR, Avides MC, Quintas MAC, Vicente AA (2011) Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering* **106**, 111-118.

Božanić R., Breški M., Barukčić I., Lisak-Jakopović K. (2022) Primjena jestivih filmova i prevlaka u proizvodnji sira (stručni rad) *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **17**, (1-2), str. 43. <https://hrcak.srce.hr/file/415759>

Cakmak H, Özselek Y, Turan OJ, Firatligil E, Karbancioğlu -Güler F (2020) Whey protein isolate edible films incorporated with essential oils: Antimicrobial activity and barrier properties. *Polymer Degradation and Stability*, Elsevier, London, **17**.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109285>

Carvalho AR, Costa G, Figueirinha A, Liberal J, Prior JAV, Lopes MC, Cruz MT, Batista MT (2017) *Urtica* spp. Phenolic composition, safety, antioxidant and antiinflammatory activities. *Food Res Int* **99**, 485–49. [10.1016/j.foodres.2017.06.008](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008)

Chakravatula SSN, Soccio M, Lotti N, Balestra F, Rosa MD, Siracusa V (2019) Characterization of Composite Edible Films Based on Pectin/Alginate/Whey Protein Concentrate. **12**, 1-19. <https://doi.org/10.3390/ma12152454>

Coltelli MB, Wild F, Bugnicourt E, Cinelli P, Lindner M, Schmid M, Weckel V, Muller K, Rodriguez P, Staebler A, Rodriguez-Turienzo L, Lazzeri A (2015) State of the Art in the Development and Properties of Protein-Based Films and Coatings and Their Applicability to Cellulose Based Products: An Extensive Review. *Coatings* **6(1)**, 1-59. <https://doi.org/10.3390/coatings6010001>

Debeaufort F., Martin-Polo M, Voilley A. (1993) Polarity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**, 428 – 434.

Debeaufort F, Quezada-Gallo JA, Voilley A (1988) Edible films and coatings:tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews Food Science Nutrition* **38(4)**, 299-313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>

De Morais FPR, Pesato TB, Rodrigues E, Mallmann LP, Mariutti LRB, Neto FM (2020) Whey protein and phenolic compound: Effects of antioxidant capacity before and after *in vitro* digestion. *Food Research Journal*. Elsevier, London **133**. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109104>

Dehghani S, Hosseini SV, & Regenstein JM (2018) Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry* **240**, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>

Elez-Garofulić I, Malin V, Repajić M, Zorić Z, Pedisić S, Sterniša M i sur. (2021) Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules* **26(20)**, 6153. <https://doi.org/10.3390/molecules26206153>

Erkmen O, Barazi AO (2018) General Characteristics of Edible Films. *Journal of Food Biotechnology Research* **2**, 1-4.

Galić K (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **4(1-2)**, 23-31.

Garcia MPM, Gomez-Guillen MC, Lopez-Caballero M., Barbosa-Canovas GV (2016) Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications, Taylor & Francis, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781315373713>

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 JH, ured.) *Elsevier Science & Technology Books*. London, str. 263- 275.

Guillard V, Guillaume C, Kurek M, Gontard N. (2016) Mass Transfer Measurement and Modeling for Designing Protective Edible Films u: Edible Food Packaging Materials and Processing Technologies. Ribero Cerqueira MAP, Correia Pereira, RN, Da Silva Ramos OL, Cuto Teixeira JA., Vicente AA. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 181-214.

Gupta C, Prakash D (2017) Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages* **3(31)**, 1-14.

Grauso L, De Falco B, Lanzotti V, Motti R (2020) Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem* **19**, 1341–1377. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09680-x>

Haghju S, Beigzadeh S, Almasi H, Hamishehkar H (2016) Chitosan films incorporated with nettle (lat, *Urtica dioica*) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterisation and antimicrobial properties. *Journal of Microencapsulation* **33(5)**, 438-448. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1208294>

Han JH (2014) Edible Films and Coatings. *Innovations in Food Packaging*, 213–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>

Herceg Z, Režek A (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56 (4)**, str. 394 <https://hrcak.srce.hr/8414>

Hassoun A, Carpena M, Prieto LMA, Simal-Gandara J, Ozogul F, Özogul Y i sur. (2020) Use of Spectroscopic Techniques to Monitor Changes in Food Quality during Application of Natural Preservatives: A Review. *Antioxidants* **9(9)**, 882. <https://doi.org/10.3390/antiox9090882>

Iversen L JL, Rovina K, Vonnice JM, Matanjun P, Erna KH, Aqilah NMN i sur. (2022) The Emergence of Edible and Food-Application Coating for Food Packaging. A review. *Molecules* **27(17)**, 5604. <https://doi.org/10.3390/molecules27175604>

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

Jeya J, Chandrasekaran M, Venkatesan SM, Sriram V, Britto, JG, Mageshwaran G i sur. (2020) Scaling up difficulties and commercial aspect of edible film for food packaging. A review: *Trend sin Food Science and Technology* **100**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>

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

Kandasamy S, Yoo J, Yun J, Kang HB, Seol KH, Kim HV i sur. (2021) Application of Whey Protein Based Edible Films and Coatings in Food Industries: An Updated Overview. *Coatings* **11(9)**, 1056. <https://doi.org/10.3390/coatings11091056>

Kokoszka S, Debeaufort F, Lenart A, Voilley A (2010) Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal* **20**, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.008>

Kontogianni VG, Kasapidou E, Mitlianga P, Mataragas M, Pappa E, Kondyli E i sur. (2022) Production, characteristics and application of whey protein films activated of rosemary and sage extract in preserving soft cheese. *LWT* **155** <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112996>

Li J, Yang J, Li J, Gantumur MA, Wei X, Oh KC, Jiang Z (2023) Structure and rheological properties of extruded whey protein isolate: Impact of inulin. *International Journal of Biological Macromolecules* **226** <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.268>

Mahjoorian A, Jafarian S, Fazeli F (2021) Nettle (*Urtica dioica*) Essential Oil Incorporation in Edible Film from Caspian Witefish (*Rutilus Frisii Kutum*) Scale: Physical, Antimicrobial and Morphological Charasterization. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **30(2)**, 151-161. <https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1868641>

Milani J, Maleki G (2012) Hydrocolloids in Food Industry. Food Industrial Processes - Methods and Equipment. *InTech*, 17-38. <http://dx.doi.org/10.5772/32358>

Milani JM, Tirgarian B (2020) An overview off edible protein-based packaging: Main sources, advantages, drawbacks, recent progressions and food applicatios. *Journal of Packaging Technology and Research*, **4(1)**, 103-115. <https://doi.org/10.1007/s41783-020-00086-w>

Mihalca V, Kereszi AD, Weber A, Gruber-Traub C, Schmucker J, Vodnar DC, Dulf FV, Socaci SA, Farcas A, Muresan CI, Suharoschi R, Pop OL (2021) Protein-Based Films and Coatings for Food Industry Applications. **13**, 1-23. <https://doi.org/10.3390/polym13050769>

Ming Y, Chen L, Khan A, Wang H, Wang C (2020) Effects of tee polyphenols on physicochemical and antioxidative properties of whey protein coating. *Food Science and Biotechnology* **29**, 1655-1663. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00824-5>

Mate JI, Krochta JM (1996) Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and α -Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3001-3004.

Norajit K, Kim KM, Ryu GH (2010) Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering* **98(3)**, 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>

Pamuković F (2017) Razvoj jestivih filmova s bioaktivnim sastojcima ružmarina (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Papadaki A, Kachrimanidou V, Lappa IK, Andriotis H, Eriotou E, Mandala I i sur. (2022) Tuning the physical and functional properties of whey protein edible films: Effect of pH and Inclusion of antioxidants from spent coffee grounds. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **27** <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100700>

Park HJ, Chinnan MS (1995) Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Material. *Journal of Food Engineering* **25**, 497-507. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)00029-9](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)00029-9)

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

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

Pravilnik (2005) Pravilnik o mjeriteljskim zahtjevima za pakovine i boce kao mjerne spremnike. NN 90/2005. Narodne novine 1792, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_07_90_1792.html Pristupljeno 1.rujna 2024.

Pravilnik (2009) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom. NN 125/2009. Narodne novine 125, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3092.html Pristupljeno 1.rujna 2024.

Ramesh M, Muthukrishnan K (2022) 25-Biodegradable polymer blends and composites for food-packaging applications. *Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering*, 693-716. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823791-5.00004-1>

Rhim JW, Shellhammer TH (2005) Lipid-based edible films and coatings. U: *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Science & Technology Books, London, str. 362-383. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50053-X>

Ribeiro AM, Estevinho B, Rocha F (2020) Preparation and Incorporation of Functional Ingredients in Edible Films and Coatings. *Food and Bioprocess Technology* **14**, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4>

Ribeiro AM, Estevinho BN, Rocha F (2021) Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology* **14**, 209-231. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4>

Repajić M, Cegledi E, Zorić Z, Pedisić S, Elez Garofulić I, Radman S, Palčić I, Dragović-Uzelac, V. (2021) Bioactive Compounds in Wild Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Stalks. U: Polyphenols and Pigments upon Seasonal and Habitat Variations. *Foods* (Basel, Switzerland), **10(1)**, 190. <https://doi.org/10.3390/foods10010190>

Rodino S, Butu M (2019) Herbal Extracts – New Trends in Functional and Medicinal Beverages. U: *Functional and Medicinal Beverages*. Academic Press, 73–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>

Robertson GL (1993) *Food packaging: Principles and practice*, 1. izd., Marcel Dekker Inc, New York.

Rujnić - Sokele M (2015) Plastični otpad-globalni ekološki problem. *Polimeri* **36(1-2)**, 34-37. <https://hrcak.srce.hr/161325>

Singh R, Singh N (2005) 3 - Quality of packaged foods. U: *Innovations in Food Packaging*. *Food Science and Technology*. Academic Press 24-44. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50035->

Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Dalla Rosa M (2008) Biodegradable polymers for food packaging: A review. *Trends in Food Science Technology* **19**, 634 – 643. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>

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

Sivarooban T i Hettiarachchy NS (2008) Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International* **41**, 781-785. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.007>

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

Song H, Choi I, Lee JS, Chang Y, Joon CS, Han J (2022) Whey protein isolate coating material for high oxygen barrier properties: A scale-up study from laboratory to industrial scale and its application to food packaging. *Food Packaging and shelf Life*, Elsevier, London **31**. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100765>

Sothornvit R, Krochta JM (2005) 23 - Plasticizers in edible films and coatings. U: *Innovations in Food Packaging. Food Science & Technology*. Academic Press, 403-433. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>

Stefănescu BE, Socaciu C, Vodnar DC (2022) Recent progres sin functional edible food packaging based on gelatin and chitosan. *Coatings* **12(12)**, 1815 <https://doi.org/10.3390/coatings12121815>

Suhag R, Kumar N, Petkoska AT (2020) Film formation and deposition methods of edible coating on food products. *Food Research International* **136**, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>

Šagud D (2023) Fizikalno-kemijska svojstva filmova od pektina i kitozana uz dodatak limonena te njihov utjecaj na svojstva mandarina (lat. *Citrus reticulata*) tijekom skladištenja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Švegović L (2022) Mikroplastika u vodenom okolišu (završi rad) Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tkalec K, Lozačinski L, Cvrtila Ž (2018) Ambalaža za pakiranje hrane životinjskog podrijetla, *Meso: Prvi hrvatski časopis o mesu* **20(1)**, 66 – 72.

Tkawczevska J, (2020) Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings. A review. *Trends in Food Science and Technology* **106**, 298-311. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.022>

Tokić I, Fruk G, Jemrić T (2011) Biorazgradiva ambalaža za čuvanje voća i drugih hortikulturnih proizvoda: materijali, svojstva i učinak na kakvoću. *Journal of Central European Agriculture* **12(1)**, 226-238. <https://hrcak.srce.hr/71230>

Upton R (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J Herb Med* **3(1)**, 9-38. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>

Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj> Pristupljeno 1.rujna 2024.

Uredba (2004) Uredba (EZ) br. 1935/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. listopada 2004. o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/1935/oj> Pristupljeno 1.rujna 2024.

Uredba (2009) Uredba Komisije (EZ) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/450/oj> Pristupljeno 1.rujna 2024.

Utami-Hatmi R, Apriyati E., Cahyaningrum N (2020) Edible coating quality with three types of starch and sorbitol plasticizer. *E3S Web of Conferences* **142**, 02003 (2020) 1-8. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014202003>

Versino F, Ortega F, Monroy R, Rivero S, López OV, García MA (2023) Sustainable and Bio-Based Food Packaging: A review on Past and Current Design Innovations. *Foods* **12**, 1057. <https://doi.org/10.3390/foods12051057>

Vujković I, Galić K, Vereš M (2007) Ambalaža za pakiranje namirnica, Sveučilišni udžbenik, TECTUS, Zagreb.

Zhao J, Wang Y, Liu C (2022) Film Transparency and Opacity Measurements. *Food Analysis Methods* **15**, 2840-2846. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02343-x>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Martina Mareljć izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su njemu navedeni.

Martina Mareljć