

**Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-
biotehnološki fakultet Preddiplomski
studij Biotehnologija**

Alisa Hasanbegović

6118/BT

**PRIMJENA EKSTRAKATA KORE MANDARINE PRI IZRADI
BIOFILMOVA NA BAZI PEKTINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Primjena ekstrakata kore mandarine pri izradi biofilmova na bazi pektina *Alisa*

Hasanbegović, 0125153517

Sažetak: U ovom radu određen je kemijski sastav kore mandarine, a potom su njeni ekstrakti upotrijebljeni pri izradi biofilmova na bazi pektina. Ekstrakti kore mandarine pripremljeni su ekstrakcijom 7,5, 15 i 30 g svježih i usitnjene kore u deioniziranoj vodi, na vodenj kupelji pri 60 °C u vremenu od 3 h. Biofilmovi s pektinom kao osnovnim sastojkom, uz dodatak glicerola i kalcijeva klorida kao plastifikatora i umreživača, bez i sa dodatkom priređenih ekstrakata karakterizirani su FTIR spektroskopijom.

Rezultati su pokazali da se biofilmovi pripremljeni s vodom i ekstraktima kore mandarine razlikuju po intenzitetu IR apsorpcijskih vrpca, koje rastu proporcionalno masenim udjelima ekstrakata ukazujući na prisutnost polifenola.

Zaključno, svi pripremljeni biofilmovi pogodni su kao potencijalna sirovina za oblaganje proizvoda, s time da filmovi pripremljeni s većim masenim udjelima kore mandarine mogu vjerovatno utjecati i na poboljšanje funkcionalnih, nutritivnih i organoleptička svojstva proizvoda, u odnosu na čisti pektinski biofilm.

Ključne riječi: *biofilm, FTIR spektroskopija, kora mandarine, pektin*

Rad sadrži: 31 stranica, 12 slika, 13 tablica, 32 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Datum obrane: 13. lipanj, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Application of mandarine peel extracts for preparation of biofilms based on pectin

Alisa Hasanbegović, 0125153517

Abstract: In this work the chemical composition of mandarin peel was determined and subsequently its extracts were utilized for making of biofilms on pectin base. The mandarin peel extracts were prepared by extraction of 7.5, 15 and 30 g of fresh and milled peel in deionised water, in water bath at 60 °C during 3 h.

Biofilms with pectin as a main component, with addition of glycerol and potassium chloride, as plasticizer and cross-linker, without and with prepared extracts were characterised by FTIR spectroscopy.

The results showed that biofilms prepared with water and mandarin peel extracts are distinguished by the intensity of IR absorption bands, which are increased proportionally with mass fraction of extracts, indicating the presence of polyphenols.

In conclusion, all prepared biofilms are suitable as a potential material for coating of products, considering that biofilms formed with higher mass fraction of mandarin peel could possibly influence on improvement of functional, nutritive and organoleptic properties of products, in comparison with pure pectin biofilms.

Keywords: *biofilm, FTIR spectroscopy, mandarine peel, pectin*

Thesis contains: 31 pages, 12 figures, 13 tables, 31 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, *Antonela Ninčević Grassino*

Thesis delivered: June 13th 2018

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Mandarina	2
2.2. Kemijski sastav kore mandarine	3
2.3. Pektin	4
2.4. Biofilmovi	5
2.5. Analitičke metode određivanja kemijskog sastava	6
2.5.1. Gravimetrija	6
2.5.2. UV/Vis spektrofotometrija	6
2.6. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	7
3. Materijali i metode	9
3.1. Materijal	9
3.2. Kemikalije	9
3.3. Aparatura i pribor.....	9
3.4. Metode rada	10
3.4.1. Određivanje sadržaja vlage u uzorcima kore mandarine	11
3.4.2. Određivanje sadržaja pepela u uzorcima kore mandarine	11
3.4.3. Određivanje sirovih masti u uzorcima kore mandarine	12
3.4.4. Određivanje celuloze u uzorcima kore mandarine	13
3.4.5. Određivanje lignina u uzorcima kore mandarine	14
3.4.6. Određivanje ukupnih šećera	14
3.4.6.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih šećera	15
3.4.6.2. Postupak određivanja ukupnih šećera	15
3.4.7. Određivanje ukupnih proteina	16
3.4.7.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih proteina	16
3.4.7.2. Postupak određivanja ukupnih proteina	16
3.4.8. Priprema biofilmova na bazi pektina sa i bez ekstrakta kore mandarine ..	17
3.4.9. Postupak karakterizacije biofilmova FTIR spektroskopijom	19
4. Rezultati i rasprava	20
4.1. Gravimetrijska određivanja	20
4.1.1. Vlaga, pepeo, sulfatni pepelo, sirove masi, celuloza i lignin	20
4.2. UV/Vis spektrofotometrijska određivanja	23
4.2.1. Ukupni šećeri i ukupni proteini	23
4.3. Karakterizacija biofilmova FTIR spektroskopijom	26
5. Zaključak	28
6. Popis literature	29

1. UVOD

Mandarina (lat. *Citrus reticulata*) je biljka iz porodice *Rutaceae*, a pripada rodu *Citrusa*. Razlog koji bi čovjeka ponukao da ne odbacuje koru mandarine je svjesnost o hranjivoj vrijednosti te sadržaju kemijskih spojeva koji povoljno utječu na zdravlje čovjeka.

Kora kao sirovina najviše služi za dobivanje esencijalnog ulja. Odlikuje se bogatstvom različitih kemijskih spojeva poput proteina, vitamina, minerala, karotenoida i polifenola. S obzirom na navedene karakteristike kora mandarine može se koristiti kao značajna sirovina u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Rafiq i sur. 2016).

Budući da se danas sve veći broj istraživanja bavi zbrinjavanjem različitih nusproizvoda prehrambene industrije radi izolacije visokovrijednih funkcionalnih sastojaka kao i razvojem novih materijala, biofilmova koji bi zaštitili hranu, osnovni cilj ovog rada bio je:

- provesti ekstrakciju kore mandarine, nusproizvoda nastalog tijekom proizvodnje sokova, te
- dobivene ekstrakte upotrijebiti kod izrade biofilmova na bazi pektina.

Naime prehrambeni premazi koriste se kod pakiranja hrane kako bi joj se sačuvala nutritivna i organoleptička svojstva. Oni produljuju rok trajanja lako pokvarljive hrane, smanjuju enzimsko posmeđivanje i razvijanje nepoželjnih okusa.

Biofilmovi se sastoje od plastifikatora, obično glicerola ili sorbitola, sredstva za umrežavanje, poput kalcijeva klorida i prikladnog biopolimera.

Budući da je u ovom radu korištena kora mandarine i pektin, opisana je struktura pektina kao i njegova primjena, te kemijski sastav kore mandarine. Također opisane su i analitičke metode određivanja kemijskog sastava kore mandarine, te infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) za karakterizaciju biofilmova.

Sadržaj vlage, pepela, sulfatnog pepela, masti, celuloze, lignina, ukupnih šećera i proteina je određen u uzorcima kore mandarine, a potom je ista upotrijebljena u pripremi biofilmova na bazi pektina. Naposljetku biofilmovi sa i bez dodatka ekstrakta mandarine karakterizirani su pomoću FTIR spektroskopije.

Na temelju rezultata FTIR analize odabrat će se optimalne odvage sastojaka biofilmova na bazi pektina s dodanim ekstraktom kore mandarine koji bi se u konačnici mogli koristiti za pripremu biofilmova kao prehrambenih premaza.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mandarina

Mandarina (*Citrus reticulata*) je biljka iz porodice *Rutaceae*, a pripada rodu *Citrusa* (Kale i Adsule, 1995) (Slika 1). Mandarina je jedna od najvažnijih voćnih kultura u svijetu te zajedno s ostalim citrusima uspijeva u područjima s tropskom, subtropskom i mediteranskom klimom.

Mandarina je zimzelena biljka čije drvo je nisko, široke krošnje i grmoliko. Lišće može biti okruglo i široko ili tanko i zašiljeno na vrhu. Razne sorte mandarina razlikuju se po morfološkim i biološkim osobinama, a osnovna značajka su isprepletene mrežaste niti između kore i plodova po čemu mandarina dobiva naziv (Bakarić, 1983).

Plod mandarine sastoji se od kore (perikarpa) i mesa (endokarpa) u kojem se nalazi sok. Kora se sastoji od dva dijela, vanjskog (obojenog) flaveda i unutrašnjeg (neobojenog) albeda. U flavedu se nalaze uljne žlijezde s eteričnim uljem koje pored ostalih funkcija štiti plod.



Slika 1. Plod i kora mandarine (Anonymus 1).

Kora mandarine koja se u većini slučajeva baca postaje predmet brojnih brojnih istraživanja jer kao sirovina najviše služi za dobivanje esencijalnih ulja, a obiluje pektinom, ugljikohidratima, vitaminima i mineralima (Rincon, 2005).

2.2. Kemijski sastav kore mandarine

Plodovi mandarine se uglavnom koriste u prehrambenoj industriji za dobivanje soka dok se kora mandarine obično baca.

Prema podacima FAO (2010) 50 % od ukupne težine mandarine koja ostaje neiskorištena nakon ekstrakcije soka otpada na kominu, koru i sjeme. Zbrinjavanje navedenih nusproizvoda povećava troškove, ali i dovodi do gubitka potencijalnih izvora visokovrijednih sastojaka (Jayathilakan i *sur.*, 2012). Naime kora mandarine kao potencijalni izvor bioaktivnih spojeva poput polifenola, karotenoida i vitamina (Ajila i *sur.*, 2007) pokazuje izuzetna antioksidativna i protuupalna djelovanja.

Istraživanja su pokazala (Larrauri i *sur.*, 1996; Putnik i *sur.*, 2017) kako kora mandarine obiluje topivim dijetalnim vlaknima, te značajnim količina pektina, koji nalazi primjenu kao prehrambeni aditiv.

Jedan od osnovnih razloga neželjene upotrebe kore mandarine je njen gorak okus zbog prisutnosti limonena i triterpena, spojeva koji su odgovorni za gorčinu, a uglavnom su prisutni u albedu.

Osnovne komponente eteričnog ulja kore mandarine su limonen i β -pinen (Lota i *sur.*, 2000). Iz ulja kore mandarina izolirani su timol i metil-N-metil antranilat za koje se smatra da su nosioci tipične arome i okusa mandarine. Ulje kore također sadrži manji udjel nekih spojeva poput γ -terpinena, β -pinena, dekanala, oktanala, α -sinensala te acetaldehida i etanola, koji vjerojatno sinergističkim djelovanjem pridonose svojstvenoj aromi (Mazza, 1987). Dakle, iz kore mandarine dobivaju se brojne frakcije koje pronalaze primjenu u hrani, lijekovima i kozmetici (Ho i Lin, 2008).

Mineralni sastav kore mandarine karakteriziran je visokim udjelom željeza, gdje ga ima dvostruko više nego u plodu mandarine. Također kora sadrži i značajan, visoki udio kalija gotovo jednak onom u plodu. Zbog visokog sadržaja kalija, kalcija, dušika, fosfora, mikroelemenata i pektina (4 - 6 %) kora mandarine se može koristiti i za njihovu izolaciju (Bakarić, 1983).

U Tablici 1. prikazan je kemijski sastav ploda i kore mandarine izražen na 100 g svježe mase (Kimball, 1996).

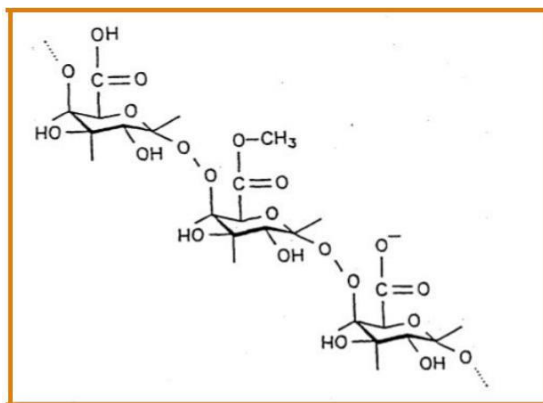
Tablica 1. Kemijski sastav ploda i kore mandarine (g na 100 g svježeg mase).

Sastojak	Plod	Kora
Voda	86,7	78
Proteini	0,7	1,0
Lipidi	0,3	2,3
Ugljikohidrati	10,1	2,6
Minerali	0,7	1,3

2.3. Pektin

Pektin je linearni polisaharid čija je glavna komponenta α -D-galakturonska kiselina (Slika 2). D-galakturonska kiselina je uvijek glavna komponenta pektina koja može biti djelomično metil i acetil esterificirana na C-6 položaju. Ovisno o stupnju esterifikacije mijenjaju se i funkcionalna svojstva pektina.

U strukturi pektina pored glavnog galakturonskog lanca, prisutne su i savijene jedinice ramnoze na koju mogu biti pričvršćeni arabinanski i galaktanski lanci (May,1990). Općenito, pektinski polisaharidi se mogu klasificirati u 3 grupe: homogalakturon, ramnogalakturon, ramnogalakturon II. Sve tri skupine pektina međusobno su povezane kovalentnim vezama stvarajući pektinski matriks ().



Slika 2. Kemijska struktura pektina (Anonymus 2).

Najvažnija svojstva pektina su njegova dobra topljivost te sposobnost stvaranja gela. Osim dobre topljivosti i sposobnosti želiranja, koristi se još i kao ugušćivač i stabilizator, pa zbog navedenih karakteristika nailazi široku primjenu ne samo u prehrambenoj, već i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Primjena pektina u prehrambenoj industriji je različita, a koristi se u raznim voćnim, mliječnim i pekarskim proizvodima. Kora jabuke je bila glavni izvor pektina za komercijalnu proizvodnju, a zadnjih godina kora citrusa dobiva značajnu ulogu u njegovoj proizvodnji (Brejnholt, 2010).

2.4. Biofilmovi

Biofilm je skup mikrobnih stanica koje su nepovratno združene i okružene u matriksu polisaharidnog materijala (Donlod, 2002). Matriks biofilma je visoko hidratiziran i po svom sastavu je dominantna voda (85 - 95 %), ali i proteini, polisaharidi, fosfolipidi, nukleinske kiseline (Seixas i *sur.*, 2013).

Biofilm se može formirati na različitim površinama, živim tkivima, u unutrašnjosti različitih uređaja (Milanov i *sur.*, 2008).

Biofilmovi se mogu koristiti i kod zaštite mikrobnih stanica gdje sprječavaju djelovanje nepovoljnih vanjskih faktora, poput topline i UV zračenja. Stvaraju se isključivo na površinama koje su kemijski inertne unutar 4 faze: transport, adsorpcija molekula, adhezija čestica i kolonizacija (Duraković i *sur.*, 2009).

Danas se sve veći broj istraživanja bavi razvojem novih materijala koji bi zaštitili hranu, a pri tome jestivi biofilmovi imaju važnu ulogu.

Prehrambeni premazi koriste se kod pakiranja hrane koja je lako pokvarljiva kako bi se sačuvala nutritivna i organoleptička svojstva. Oni produljuju rok trajanja hrane, smanjuju enzimsko posmeđivanje i razvijanje nepoželjnih okusa (Falguera i *sur.*, 2011).

Biofilmovi na bazi pektina se sastoje od plastifikatora, sredstva za umrežavanje i pektina. Plastifikatori koji se koriste su glicerol ili sorbitol i njihova glavna uloga je poboljšavanje fleksibilnosti premaza. Nadalje, sredstva za umrežavanje poput kalcijeva klorida potrebna su za reakcije stvaranja čvrste polimerne matrice na površini hrane. Biofilmovi koji su građeni isključivo od pektina pokazuju izrazitu topivost u vodi i slaba mehanička svojstva pa je kod njihove izrade obavezan dodatak sredstava za umrežavanje jer se time povećava kohezivnost i smanjuje topljivost (Espitia i *sur.*, 2014).

2.5. Analitičke metode određivanja kemijskog sastava

2.5.1. Gravimetrija

Gravimetrijska metoda ishlapljivanja temelji se na tome da analit ili produkt razgradnje ishlapi na prikladnoj temperaturi, pri čemu se hlapljivi produkt skuplja i važe ili se masa produkta odredi posredno iz gubitka mase uzorka (Skoog, 1999).

Gravimetrijska metoda isparavanja sastoji se iz tri faze koje uključuju postupak sušenja ili žarenja uzorka, mjerenja mase isparenog analita ili mase ostatka, te izračunavanja rezultata provedene analize.

Ova metoda se vrlo često koristi pri određivanju sadržaja vlage i pepela direktnim vaganjem uzorka ili pak prethodnom obradom uzorka, poput ekstrakcije prikladnim otapalom (određivanje mase) ili kemijskim reakcijama razaranja uzorka kiselinama ili lužinama (određivanje celuloze i lignina).

2.5.2. UV/Vis spektrofotometrija

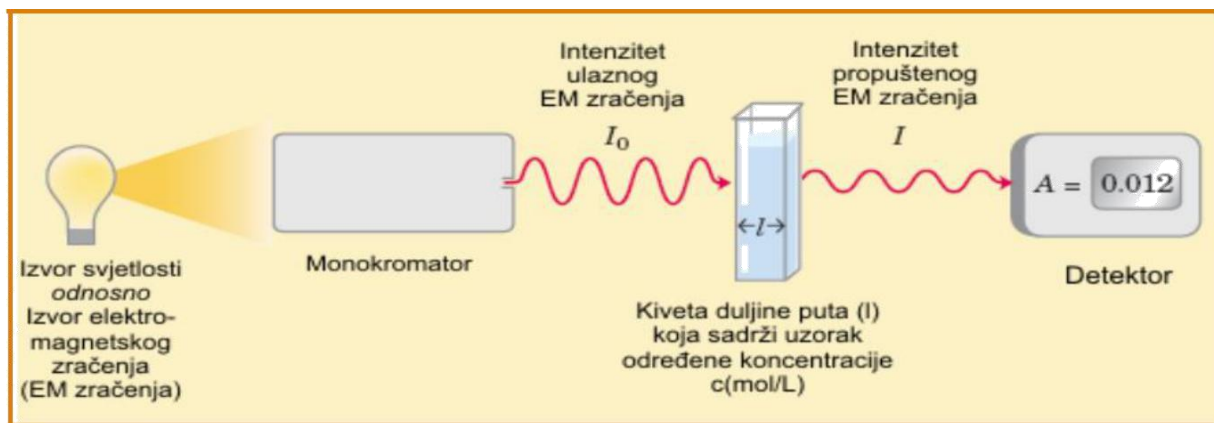
Spektroskopske tehnike su izuzetno važna skupina u instrumentalnoj kemijskoj analizi koje služe za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva, a osnova njihovog rada je bazirana na interakciji elektromagnetskog zračenja s uzorkom pri čemu promatrana tvar emitira određenu količinu zračenja koja se zatim mjeri (Pine, 1994).

Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, detektora i procesora signala (Slika 3).

Apsorpcija zračenja je definirana Lambert-Beerovim zakonom (1):

$$A = \varepsilon b c \quad (1)$$

gdje je: A - apsorbancija, ε - molekularni apsorpcijski koeficijent, c - množinska koncentracija i b - debljina sloja otopine. Prema navedenoj formuli, koncentracija analita je direktno proporcionalna apsorbanciji.



Slika 3. Osnovni dijelovi spektrofotometra (Anonymus 3).

UV/Vis spektrofotometrija temelji se na osobini molekula da apsorbiraju ultraljubičasto (200 - 400 nm) i vidljivo (400 - 800 nm) zračenje elektromagnetsko dijela spektra (Penner, 2010).

Neke vrste analita ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje same od sebe, već je potrebno upotrijebiti kromogene reagense koje ih prevode u oblik moguć za spektrofotometrijsko određivanje. Tako se fenol kao kromogeni reagens može koristiti kod određivanja ukupnih šećera, a bakrov sulfat kod određivanja ukupnih proteina.

2.6. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Vibracijska spektroskopija primjenjuje se za identifikaciju molekula na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno periodičkih promjena kuteva i međuatomskih udaljenosti (Grünzler i Gremlich, 2006).

Vibracijske spektroskopske tehnike temelj se na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetskog zračenja, pa stoga razlikujemo infracrvenu, odnosno Ramanovu spektroskopiju. Infracrvena spektroskopija (engl. Infrared Spectroscopy, IR) proučava interakcije tvari i elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih brojeva od $12\,500$ do 10 cm^{-1} , odnosno valnih duljina od $0,8\text{ }\mu\text{m}$ do $1000\text{ }\mu\text{m}$. IR spektar pokazuje ovisnost apsorpcije o valnom broju, pa se tako područje IR spektra može se podijeliti na blisko ($12\,500 - 4000\text{ cm}^{-1}$), srednje ($4000 - 400\text{ cm}^{-1}$) i daleko ($400 - 10\text{ cm}^{-1}$).

Za organske spojeve najzanimljivije je srednje područje IR spektra, gdje se nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve. Navedeno područje može se podijeliti na područje

funkcijskih skupina ($4000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$) i područje otiska prsta ($1300 - 500 \text{ cm}^{-1}$), koje je specifično za svaki uzorak.

U infracrvenom spektru bit će opažene samo one vibracije kod kojih dolazi do vremenski periodičke promjene električnog dipolnog momenta. Ovisno o energiji apsorbiranog kvanta zračenja, u molekuli će se pobuditi točno određene vibracije pojedinih funkcijskih skupina. Zbog općenito slabe sprege s ostalim vibracijama, one se mogu promatrati odvojeno, što omogućava primjenu infracrvene spektroskopije kao analitičke tehnike (Jednaček i Novak, 2013).

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) vrlo je raširena analitička tehnika identifikacije mnogobrojnih organskih spojeva, a karakterizira ju dobra preciznost i senzibilnost, kao i brzi, te jednostavan postupak provođenja analiza, te relativno niski troškovi potrošnog materijala i održavanja (Grünzler i Gremlich, 2006).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Mandarina sakupljena u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska). Svježa, oguljena kora mandarinke je isjeckana, usitnjena u blenderu, te smrznuta do početka provođenja analiza.

3.2. Kemikalije

- Bakrov sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bovin serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kalcijev klorid (Grammol, Zagreb)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fenol (Acros organics, Geel, Belgija)
- Glukoza monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glicerol (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev jodid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalij natrij tartarat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Petroleter (Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska)
- Pektin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Sumporna kiselina (Kefo, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Aparatura

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- FTIR-ATR spektrofotometra, model 1 179 5252 (Bruker, Alfa,
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Mufolna peć (Model Heraew)
- Vodena kupelj za Soxlet ekstrakciju (Inka, Zagreb, Hrvatska)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)

- UV/Vis Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijske posudice
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Celulozni tuljci
- Eksikator sa silika gelom
- Erlenmeyerove tikvice s brušenim grlom od 250 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Filter papir
- Gooch lončići
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25, 50, 100 i 500 mL
- Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- Plamenik
- Porculanske zdjelice
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Satno staklo
- Staklene čaše od 50, 100 i 500 mL
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapići
- Tikvice s okruglim dnom od 250 mL

3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su sljedeće analitičke tehnike:

- gravimetrija: određivanje udjela vlage, pepela, masti, celuloze i lignina,
- spektrofotometrija u UV i Vis području elektromagnetskog zračenja: ukupni šećeri i proteini
- ekstrakcija: refluksiranje i Soxlet
- FTIR spektroskopija: karakterizacija biofilmova

3.4.1. Određivanje sadržaja vlage u uzorcima kore mandarinke

2 grama uzorka samljevene kore mandarine izvagano je u šest, prethodno odvaganih, praznih aluminijskih posudica, nakon čega su posudice s uzorkom sušene u sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Nakon završenog sušenja aluminijske posudice s osušenim uzorkom su vagane. Maseni udio vode (vlaga) u uzorcima izračunat je prema formuli 2:

$$(\text{vode}) = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je:

m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g)

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

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

3.4.2. Određivanje pepela u uzorcima uzorcima kore mandarinke

U četiri porculanske posude odvagano je po 1 g uzorka kore mandarinke te su iste prenesene u pećnicu na 600 °C i ostavljene 4 h žariti. Nakon 4 h, posude sa uzorkom sagorenim u bijeli pepeo ohlađene su u eksikatoru te vagane. Maseni udio pepela u uzorku izračunat je prema formuli 3:

$$(\text{pepeo}) = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je:

m_1 - masa prazne porculanske zdjelice (g)

m_2 - masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)

m_3 - masa porculanske zdjelice i pepela nakon spaljivanja (g)

Dva žarena uzorka iz prethodne faze (pepeo) upotrijebljena su za određivanje udjela sulfatnog pepela. Dodan je 1 mL sumporne kiseline u oba uzorka pepela, a potom je porculanska posudica stavljena u mufolnu peć (Slika 4) na 600 °C naredna 2 sata. Nakon

spaljivanja, porculanske zdjelice s ostatkom su ohlađene u eksikatoru (1 h), te vagane. Maseni udio sulfatnog pepela izračunat je prema formuli 4:

$$(\text{sulfatni pepeo}) = \frac{m_3 - m_4}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je:

m_1 - masa prazne porculanske zdjelice (g)

m_2 - masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)

m_3 - masa porculanske zdjelice i pepela nakon spaljivanja (g)

m_4 - masa porculanske zdjelice i sulfatnog ostatka (pepela) nakon spaljivanja (g)



Slika 4. Žarenje uzoraka u Muffolnoj peći.¹

3.4.3. Određivanje sirovih masti u uzorcima kore mandarinke

2 g prethodno osušenih uzoraka (poglavlje 3.4.1.) odvagano je u celulozne čahure. Čahura je pokrivena slojem suhe vate i stavljena u srednji dio (ekstraktor) Soxhletove aparature koji je zatim spojen sa hladilom i tikvicom, uronjenom u vodenu kupelj.

Kroz ekstraktor je uz pomoć lijevka dodano toliko otapala (petroleter) da se ekstraktor napuni i pomoću kapilarne cjevčice isprazni u tikvicu. Ekstrakcija je provedena 12 h na temperaturi ključanja otapala.

Nakon završene ekstrakcije tikvica s ekstraktom se suši na 100 °C 2 sata, te hladi u eksikatoru 1 h i važe. Ekstrakcija se ponavlja toliko dugo dok nema promjena u masi tikvice s ekstrahiranom masti. Maseni udio masti se izračuna prema formuli 5:

¹ Sve slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju.

$$(\text{masti}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je:

m_1 - masa tikvice i ekstrahirane masti (g)

m_2 - masa prazne tikvice (g)

m - masa uzorka uzetog za analizu (g)

3.4.4. Određivanje udjela celuloze u uzorcima

Odvagano je 2 g odmašćenog uzorka kore mandarine u Erlenmeyerovu tikvicu i dodano je 200 mL vruće 0,255 mol L⁻¹ sumporne kiseline. Otopina se zagrijava pod refluksom 1 sat te se vruća filtrira preko Gooch lončića. Zaostali talog ispire se nekoliko puta sa oko 50 mL kipuće destilirane vode.

Isprani talog se vraća u Erlenmeyerovu tikvicu, te refluksira dodatnih sat vremena s 200 mL vruće 0,313 mol L⁻¹ NaOH. Nakon toga otopina se profiltrira preko Gooch lončića, a zaostali talog se ispire sa 30 mL etanola i oko 50 mL vruće destilirane vode, nekoliko puta.

Talog zaostao na Gooch lončićima (Slika 5) se suši u sušioniku na 105°C preko noći, a potom i žari u mufolnoj peći na 600 °C tijekom 4 sata. Nakon žarenja, Gooch lončići s zaostalim ostatkom se hlade u eksikatoru (1 h) i važu. Maseni udio celuloze izračunat je prema formule 6:

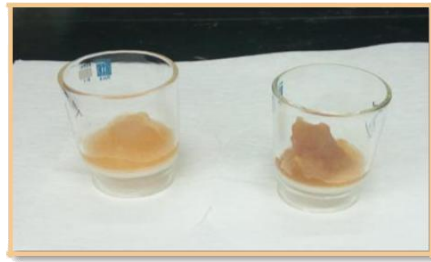
$$(\text{celuloza}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je:

m_1 - masa Gooch lončića s talogom nakon spaljivanja

m_2 - masa praznog Gooch lončića m - masa

odmašćenog uzorka uzetog za analizu



Slika 5. Gooch lončići s obrađenom korom mandarinke za određivanje sadržaja celuloze.

3.4.5. Određivanje udjela lignina u uzorcima kore mandarinke

Odvagan je 1 g uzorka u čašu od 800 ml, dodano je 15 mL 72 % (v/v) sumporne kiseline i ostavljeno da stoji 2,5 sata na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje staklenim štapićem.

Nakon 2,5 sata dodano je 560 ml destilirane vode i kuhano na vodenoj kupelji 4 h pokriveno satnim stakalcem. Vrući sadržaj profiltriran je preko prethodno izvaganog filter papira te je zaostali talog ispran destiliranom vodom do neutralnog pH. Filter papir s talogom osušen je na temperaturi od 105 °C do konstantne mase.

Nakon sušenja filter papir s talogom je ohlađen u eksikatoru do sobne temperature te izvagan. Maseni udio lignina izračunat je prema formuli 7:

$$(\text{lignin}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100 \quad (7)$$

gdje je:

m_1 - masa filter papira sa ligninom (g)

m_2 - masa praznog filter papira (g)

m - masa uzorka (g)

3.4.6. Određivanje ukupnih šećera

Sadržaj ukupnih šećera u uzorku kore mandarinke određen je spektrofotometrijski primjenom fenola kao specifičnog organskog reagensa koji uz vruću sumpornu kiselinu reducira šećere stvarajući žuto obojenu otopinu (Dubois i sur. 1956). Apsorbancija izmjerene otopine izmjerena na 492 nm je proporcionalna koncentraciji prisutnih šećera u uzorku.

3.4.6.1 Priprema otopina za određivanje ukupnih šećera

➤ **Otopina glukoze ($\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$)**

Odvagano je 100 mg glukoze i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.

➤ **Otopina fenola ($w = 5 \%$, w/v)**

Otopljeno je 2,5 g fenola u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.

3.4.6.2. Postupak određivanje ukupnih šećera

Za izradu baždarnog dijagrama otpipetirano je 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mL alikvota ishodne otopine glukoze koncentracije 2000 mg L^{-1} u odmjerne tikvice od 50 mL da bi se pripremile pojedinačne standardne otopine koncentracija 5, 10, 20, 40, 60 i 80 mg L^{-1} .

Iz priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetiran je 1 mL u odmjernu tikvicu od 25 mL te je dodan 1 mL 5 %-tne otopine fenola i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Nakon miješanja na vorteksu, smjesa je zagrijana 5 minuta na vodenoj kupelji uz ključanje te potom ohlađena u posudi s ledom i ostavljena na tamnom mjestu 30 minuta.

Uzorci kore mandarinke s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih šećera pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine, no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzet je 1 mL razrijeđenog ekstrakta kore mandarine.

Razrijeđeni ekstrakt kore mandarine (1:100, v/v) pripremljen je tako da je 1 mL ekstrakta dobivenog postupkom refluksiranja otpipetiran u odmjernu tikvicu od 100 mL te deioniziranom vodom nadopunjen do oznake.

Refluksirani ekstrakt kore mandarine (3:100, m/v) dobiven je refluksijom 3 g kore mandarine u 100 mL deionizirane vode.

Za slijepu probu upotrijebljen je 1 mL deionizirane vode.

Priređenim standardnim otopinama i razrijeđenom ekstraktu kore mandarine izmjeri se apsorbancija pri 492 nm. Iz izmjerenih apsorbancija i masenih koncentracija otopine glukoze izradi se baždarni dijagram, a potom se iz jednadžbe pravca izračuna masena koncentracija ukupnih šećera, odnosno maseni udio u uzorcima kore mandarine.

3.4.7. Određivanje ukupnih proteina

Biuret metoda je jedna od najčešće korištenih metoda određivanja proteina, a temelji se na kompleksometrijskoj reakciji peptidnih veza (-CO-NH) proteina s ionima bakra u lužnatoj sredini (McClatchey, 2002). Stvaranje Cu^{2+} -proteinskog kompleksa dovodi do pojave ljubičastog obojenja nastalog u reakciji iona bakra i kisika karbonilne skupine, te dušika amidne skupine peptidne veze.

Nastali kompleks ima apsorpcijski maksimum na 540 nm, a intenzitet razvijene boje je proporcionalan količini proteina u uzorku (McClatchey, 2002).

3.4.7.1. Priprema otopina ukupnih proteina

➤ **Biuret reagens**

Odvagano je 1,6 g NaOH, 1,8 g KNa tartarata, 0,6 g CuSO_4 i 1,8 g KI te otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 200 mL.

➤ **Otopina BSA standarda ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$)**

Otopljeno je 0,253 g BSA u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 25 mL.

3.4.7.2. Postupak određivanja ukupnih proteina

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljen je niz pojedinačnih standardnih otopina koncentracija 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 i 1,6 mg mL^{-1} pipetiranjem 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 i 3,2 mL alikvota ishodne standardne otopine BSA ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$) u odmjernim tikvicama od 10 mL i nadopunjavanjem s deioniziranom vodom do oznake (Slika 6).

Točno 3 mL pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se u odmjernu tikvicu od 10 mL te doda 3 mL Biuret reagensa. Tako priređene otopine su vorteksirane, te čuvane na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi 30 minuta.

Za određivanje ukupnih proteina u uzorku kore mandarinke uzet je 1 mL razrijeđenog ekstrakta kore mandarine te je dodano 2 mL deionizirane vode i 3 mL Biuret reagensa (Slika 7).

Razrijeđeni ekstrakt kore mandarine (1:100, v/v) pripremljen je tako da je 1 mL refluksiranog ekstrakta otpipetirano u odmjernu tikvicu od 100 mL te deioniziranom vodom nadopunjeno do oznake.

Refluksirani ekstrakt kore mandarine (3:100, *m/v*) dobiven je refluksijom 3 g kore mandarine u 100 mL deionizirane vode na 60 °C.

Za slijepu probu upotrijebljen je 1 mL deionizirane vode.

Priređenim standarnim otopinama i razrijeđenom ekstraktu kore mandarinke izmjeri se apsorbancija pri 540 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracija otopine BSA izradi se baždarni dijagram, a potom se iz jednadžbe pravca izračuna masena koncentracija proteina, odnosno maseni udio u uzorcima kore mandarinke.



Slika 6. Pripremljene standardne otopine bovin serum albumina (BSA).



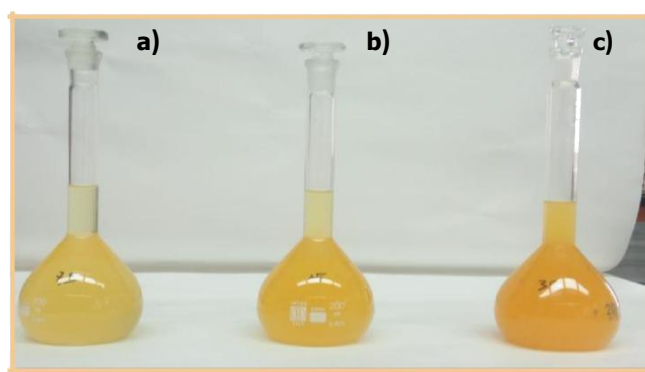
Slika 7. Ekstrakti kore mandarine pripremljeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih proteina.

3.4.8. Priprema biofilmova na bazi pektina sa i bez ekstrakta kore mandarine

Biofilmovi na bazi pektina pripremljeni su otapanjem pektina u deioniziranoj vodi, odnosno ekstraktima kore mandarinke.

Ekstrakti kore mandarinke priređeni su ekstrakcijom 7,5 ,15 i 30 g samljevene kore mandarinke u deioniziranoj vodi na vodenoj kupelji u vremenu od 3 h.

Ekstrahirani uzorci su filtrirani preko filter papira, te je filtrat (ekstrakt) prebačen u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopunjen do oznake deioniziranom vodom. Tako pripremljeni ekstrakti (Slika 8) čuvani su u hladnjaku do trenutka priprave biofilmova.



Slika 8. Ekstrakti kore mandarine s odvagama od 7,5 g (a), 15 g (b) i 30 g (c).

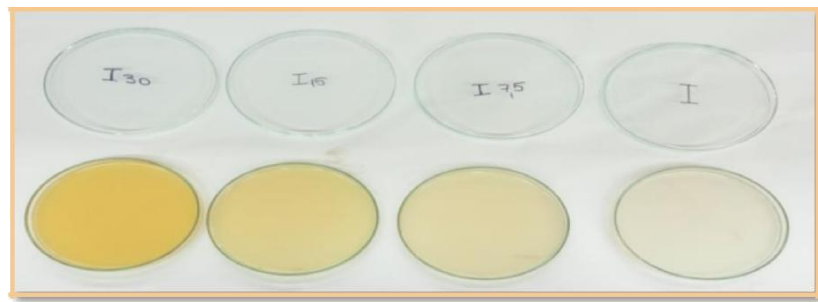
Za izradu biofilмова uz pektin (1 %) kao osnovni sastojak, upotrijebljeni su još i glicerol (50 i 70 %) kao plastifikator i kalcijev klorid (1 %) kao umreživač. Maseni udjeli pektina, glicerola i CaCl_2 , te njihove odvage upotrebljene pri izradi 8 biofilмова prikazane su u Tablici 2.

Odvagane mase pektina, glicerola i CaCl_2 su otopljene i homogenizirane u vodi ili ekstraktima kore mandarine tijekom 3 h miješanja na magnetskoj miješalici. Nakon zagrijavanja na temperaturi od 60 °C, 10 min homogenizirane otopine su prelivene u Petrijeve zdjelice (Slika 9) te ostavljene sušiti na zraku, a potom i u sušioniku na 40 °C, kako bi došlo do njihova skrućivanja. Tako priređeni biofilmovi čuvani su u eksikatoru do trenutka njihove karakterizacije FTIR spektroskopijom.

Tablica 2. Sastav otopina upotrijebljenih pri izradi biofilмова na bazi pektina uz dodatak ekstraktata kore mandarinke.

Biofilm*	Pektin	Glicerol	CaCl_2	H_2O	Ekstrakt
	w = 1 %	w = 50 %	w = 1 %	V = 50 mL	
1	0,5 g	0,25 g	0,005 g	+	
1_{7,5}	0,5 g	0,25 g	0,005 g		+
1₁₅	0,5 g	0,25 g	0,005 g		+
1₃₀	0,5g	0,25 g	0,005 g		+
	w = 1 %	w = 70 %	w = 1 %	V = 50 mL	
2	0,5 g	0,35 g	0,005 g	+	
2_{7,5}	0,5 g	0,35 g	0,005 g		+
2₁₅	0,5 g	0,35 g	0,005 g		+
2₃₀	0,5 g	0,35 g	0,005 g		+

*Indeksi 7,5, 15 i 30 označavaju masu (g) uzorka kore mandarine upotrijebljene pri pripremi ekstraktata korištenih kod izrade biofilмова.



Slika 9. Pripremljeni biofilmovi prije skrućivanja.

3.4.9. Postupak karakterizacije biofilmova FTIR spektroskopijom

Odrezan disk biofilma (Slika 9) površine od oko 1 cm^2 stavljen je na cink-selenid (ZnSe) kristal te karakteriziran infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) uz prigušenu totalnu refleksiju (*engl.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance, FTIR - ATR).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Gravimetrijska određivanja

U ovom radu određen je kemijski sastav kore mandarine s ciljem utvrđivanja nutritivnih vrijednosti ovog prehrambenog nusproizvoda.

Rezultati gravimetrijskog određivanja vlage, pepela, sulfatnog pepela, masti, celuloze i lignina prikazani su u Tablicama 3 do 8.

4.1.1. Vlaga, pepeo, mast, celuloza i lignin

Udio vlage jedan je od najvažnijih mjerenih svojstava sirovina jer o sadržaju vlage ovisi kvaliteta, odnosno rok trajanja same sirovine. Nakon provedenog uzastopnog sušenja i hlađenja u eksikatoru za šest paralelnih mjerenja utvrđeno je da kora mandarine sadrži 73,1 % vode (Tablica 3), što je u skladu s podatkom navedenim u Tablici 1 prema kojoj 100 g svježje mase mandarine sadrži 78 % vode.

Tablica 3. Sadržaj vlage određene u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	Posudica s uzorkom		Prazna posudica	w (vlaga)/%
	prije sušenja	nakon sušenja	nakon sušenja	
	m_2 /(g)	m_3 /(g)	m_1 /(g)	
1	21,826	20,3540	19,8129	73,12
2	13,2626	11,7841	11,2625	73,92
3	13,7078	12,2430	11,7077	73,24
4	13,1891	11,9180	11,3820	73,29
5	13,3666	11,8886	11,3653	73,85
6	22,1194	20,6656	20,1103	72,36

w (vlaga)/% \pm SD

73,1 \pm 0,0

Sadržaj pepela u sirovinama odnosi se na anorganski ostatak koji zaostaje nakon potpune oksidacije organskih tvari. U njegov sastav spadaju različiti mineralni elementi, poput kalija, kalcija, magnezija, sumpora, fosfora, željeza i drugih. Dakle, udio pepela je mjera ukupne količine minerala prisutnih u sirovini.

Spaljivanjem kore mandarine do konstantne mase pri temperaturi od 600 °C tijekom 4 h dobivena vrijednost pepela iznosila je 1,03 % (Tablica 4).

Tablica 4. Sadržaj pepela određen u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	m (pepela)/(g)	m (uzorka)/(g)	w (pepela)/%
1	0,0117	1,0053	1,1638
2	0,0112	1,0037	1,1159
3	0,0092	1,0017	0,9184
4	0,0093	1,0052	0,9252
			w (pepeo)/% \pm SD
			1,03 \pm 0,13

U uzorcima u kojima je prethodno određen udio pepela, dodan je 1 mL sumporne kiseline, nakon čega je spaljivanjem na 600 °C tijekom 2 h i hlađenja u eksikatoru 1 h određen udio sulfatnog pepela (Tablica 5). Dobivena vrijednost iznosi 0,628 %.

Tablica 5. Sadržaj sulfatnog pepela određen u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	m (pepela)/(g)	m (sulfatnog pepela)/(g)	w (sulfatni pepeo)/%
1	0,0117	0,0079	0,6752
2	0,0112	0,0065	0,5803
			w (sulfatni pepeo)/% \pm SD
			0,628 \pm 0,067

Nakon uklanjanja vlage, osušenim uzorcima kore mandarine određen je i udio masti Soxhlet ekstrakcijom. Rezultati su pokazali da ova sirovina sadrži svega 0,05 % sirovih masti (Tablica 6).

Osim niskog udjela masti kora mandarine sadrži i niski udio celuloze (Tablica 7) što je znatno niža vrijednost (0,107 %) u usporedbi s istraživanjem Boluda-Aguilar i *sur.* (2010), koji dobivaju čak i do 22,5 % (izraženo na suhu tvar).

Međutim kora mandarine sadržava znatne količine lignina ($w = 29,13$ %) što znači da nagomilana masa neiskorištenog otpada nakon proizvodnje voćnih sokova na bazi mandarine može poslužiti kao povoljan biosupstrat pri izolaciji lignina i njegovoj daljnjoj konverziji u bioetanol (Boluda-Aguilar i *sur.*, 2010).

Tablica 6. Sadržaj sirovih masti određen u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	<i>m</i> (tikvica)/g		<i>m</i> (uzorak)/g	<i>w</i> (masti)/%
	nakon ekstrakcije	prije ekstrakcije		
	<i>m</i> ₁	<i>m</i> ₂		
1	128,1668	128,1557	2,0622	0,053
2	121,6487	121,6392	2,0206	0,047
				<i>w</i> (masti)/% ± SD
				0,05 ± 0,00

Tablica 7. Sadržaj celuloze određen u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	<i>m</i> (Gooch lončić)/g		<i>m</i> (uzorak)/g	<i>w</i> (celuloza)/%
	nakon žarenja			
	s celulozom	prazan		
	<i>m</i> ₂ /(g)	<i>m</i> ₁ /(g)		
1	55,1777	55,1757	2,00	0,100
2	53,3511	53,3488	2,02	0,114
				<i>w</i> (celuloza)/% ± SD
				0,107 ± 0,010

Tablica 8. Sadržaj lignina određen u uzorcima kore mandarine.

Uzorak	<i>m</i> (filter papir)/g		<i>m</i> (uzorak)/g	<i>w</i> (lignin)/%
	nakon susenja			
	s ligninom	prazan		
	<i>m</i> ₂ /(g)	<i>m</i> ₁ /(g)		
1	7,0328	6,7265	1,02	30,03
2	7,0573	6,7722	1,01	28,22
				<i>w</i> (lignin)/% ± SD
				29,13 ± 1,28

4.2. UV/Vis spektrofotometrijska određivanja

UV/Vis spektrofotometrijom određen je maseni udio ukupnih šećera i proteina u ekstraktima kore mandarine dobivenih refluksiranjem.

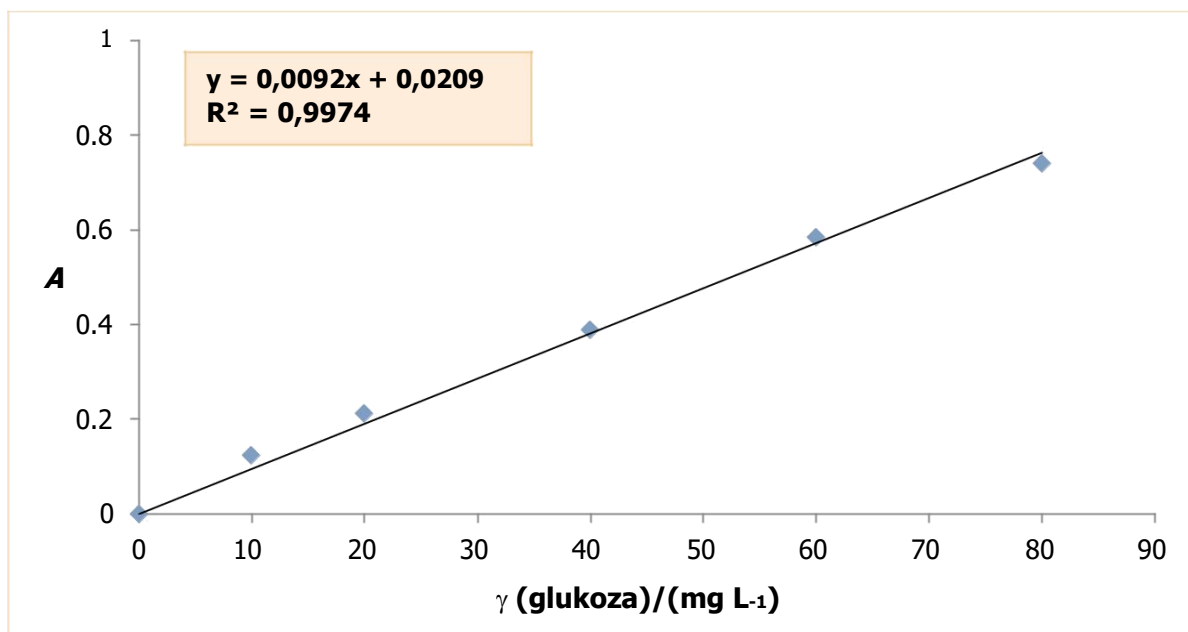
4.2.1. Ukupni šećeri i ukupni proteini

Vrijednosti masenih koncentracija glukoze s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorpcija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram prikazani su u Tablici 9. Iz jednadžbe pravca (Slika 10) izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija te maseni udio ukupnih šećera u uzorcima kore mandarine (Tablica 10).

Iz priložene tablice vidi se da kora mandarine sadrži 1,29 % ukupnih šećera, što čini znatno nižu vrijednost u odnosu na onu dobivenu (10 %, izraženo na suhu tvar) u istraživanju Boluda-Aguilar i *sur.* (2010).

Tablica 9. Podaci za izradu baždarnog dijagrama glukoze.

γ (glukoza)/(mg L ⁻¹)	A	± SD
0	0,000 0,000	0,000 ± 0,000
10	0,124 0,125	0,1245 ± 0,001
20	0,213 0,213	0,213 ± 0,000
40	0,389 0,389	0,389 ± 0,000
60	0,580 0,588	0,584 ± 0,006
80	0,740 0,740	0,740 ± 0,000



Slika 10. Baždarni dijagram glukoze.

Tablica 10. Masene koncentracije i maseni udio ukupnih šećera u uzorcima kore mandarine.

Ukupni šećeri	Kora mandarine	
	Uzorak 1	Uzorak 2
A_{492}	0,429	0,628
	0,431	0,631
γ (mg L ⁻¹) iz baždarnog dijagrama	44,48	66,21
γ (mg L ⁻¹) u uzorku	31,127	46,34
w (%) u uzorku	1,04	1,54
w (%) u uzorku \pm SD	1,29 \pm 0,35	

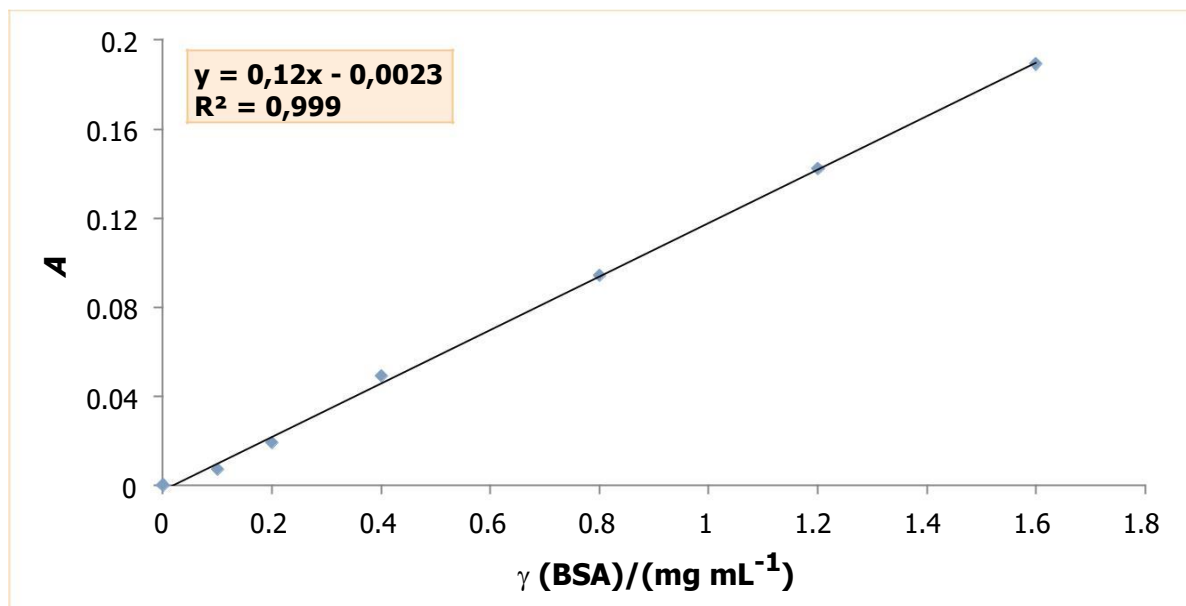
Da bi odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih proteina u ekstraktima kore mandarine bilo je također potrebno izraditi baždarni dijagram.

Vrijednosti masenih koncentracija BSA standarda s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram prikazani su u Tablici 11. Iz jednadžbe pravca (Slika 11) izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija te maseni udjeli ukupnih proteina u uzorcima kore mandarine (Tablica 12).

Iz priložene tablice vidi se da udio proteina u kori mandarine iznosi 10,44 %, dok je u istraživanju Boluda-Aguilar i sur. (2010) nađena vrijednost od 7,5 % (izraženo na suhu tvar).

Tablica 11. Podaci za izradu baždarnog dijagrama bovin serum albumina (BSA).

γ (BSA)/(mg mL ⁻¹)	<i>A</i>	\pm SD
0	0,000	0,000 \pm 0,000
	0,000	
0,1	0,007	0,007 \pm 0,000
	0,007	
0,2	0,019	0,019 \pm 0,000
	0,019	
0,4	0,050	0,049 \pm 0,000
	0,048	
0,8	0,095	0,094 \pm 0,002
	0,092	
1,2	0,143	0,142 \pm 0,002
	0,140	
1,6	0,188	0,189 \pm 0,001
	0,190	



Slika 11. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih proteina.

Tablica 12. Masene koncentracije i maseni udio proteina u uzorcima kore mandarine.

Proteini	Kora mandarine	
	Uzorak 1	Uzorak 2
A_{540}	0,055 0,049	0,049 0,047
γ (mg mL ⁻¹) iz baždarnog dijagrama	0,4525	0,5917
γ (mg mL ⁻¹) u uzorku	271,5	355,02
w (%) u uzorku	9,05	11,83
w (%) u uzorku \pm SD	10,44 \pm 1,97	

Zaključno, Tablica 13 prikazuje ukupne vrijednosti kemijskog sastava kore mandarine, koja može poslužiti u uspoređivanju doprinosa kemijskih parametara ekstrakta kore mandarine u formulaciji funkcionalnih svojstava različitih materijala.

Tablica 13. Ukupni rezultati određivanja kemijskog sastava kore mandarinke.

Kemijski parametri	w/% \pm SD
voda	73,1 \pm 0,0
pepeo	1,03 \pm 0,13
sulfatni pepeo	0,628 \pm 0,067
masti	0,05 \pm 0,00
celuloza	0,107 \pm 0,010
lignin	29,13 \pm 1,28
ukupni šećeri	1,29 \pm 0,35
ukupni proteini	10,44 \pm 1,97

4.2.2. Karakterizacija biofilмова FTIR spektroskopijom

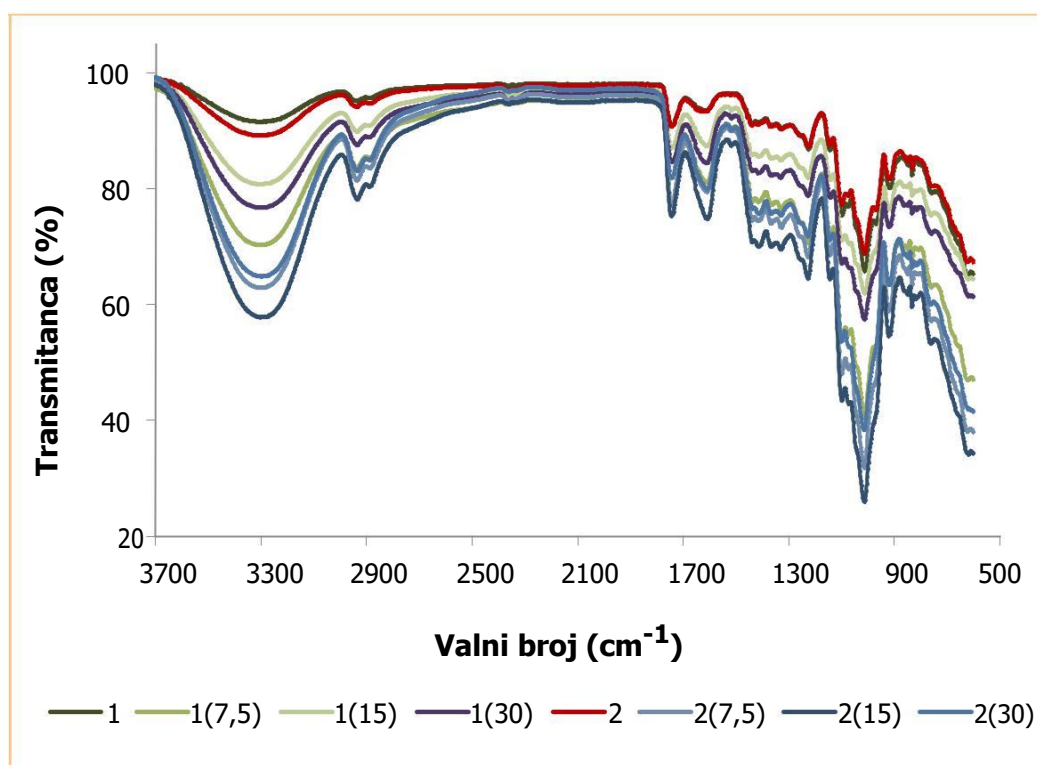
Osušeni biofilmovi na bazi pektina uz dodatak glicerola i kalcijevog klorida pripremljeni s vodom ili ekstraktom kore mandarinke (Tablica 2) karakterizirani su FTIR-ATR spektroskopijom.

U svim snimljenim IR spektrima pripremljenih filmova prisutna je široka apsorpcijska vrpca pri 3300-3400 cm⁻¹ koja odgovara asociranoj hidroksilnoj skupini, odnosno vidljivo je da je došlo do tvorbe intermolekulskih vodikovih veza (-O-H...O-) pri čemu se vrpca proširuje i pomiče prema nižim valnim brojevima. Apsorpcijska vrpca hidroksilne skupine u ovom

dijelu spektra pripisuje se polisaharidima, ali i polifenolnim spojevima prisutnim u ovim filmovima.

Porastom udjela ekstrakta kore mandarine u filmovima jači je i intenzitet ove apsorpcijske vrpce. U ovom je dijelu IR spektra vidljiva i apsorpcijska vrpca oko 2900 cm^{-1} koja karakterizira vibracije istezanja veze C-H karakteristična za sve ugljikovodike, npr. metilne skupine estera galakturonske kiseline. U drugom dijelu spektra pokazuje se jaka apsorpcijska vrpca od 1020 do 1100 cm^{-1} koja odgovara rasteznoj frekvenciji jednostruke veze C-O, a može se pripisati eterskoj vezi koja je prisutna u molekuli ugljikohidratne podjedinice.

U zaključku, FTIR-ATR tehnikom su uspješno identificirani polisaharidi i polifenoli, a dobiveni IR spektri jasno su naglasili razlike među biofilmovima pripremljenim sa i bez ekstrakta kore mandarine.



Slika 12. IR spektri biofilmova bez (1 i 2) i sa dodatkom ekstrakta kore mandarine (7,5, 15 i 30).

5. ZAKLJUČAK

Biofilmovi predstavljaju značajno područje u razvoju novih multifunkcionalnih materijala jer zbog svojih karakteristika uspješno zaštićuju prehrambene i farmaceutske proizvode.

Na temelju dobivenih rezultata IR spektara možemo zaključiti da se biofilmovi pripremljeni s vodom i ekstraktima kore mandarine razlikuju po intenzitetu apsorpcijskih vrpca, koje rastu proporcionalno masenim udjelima ekstrakta ukazujući na prisutnost polifenola bitnim za poboljšanje nutritivnih i organoleptičkih svojstava konačnog proizvoda.

Odabir pojedinog biofilma ovisi o njegovoj čvrstoći, tvrdoći, elastičnosti kao i o fizikalno-kemijskim svojstvima namirnice koja se oblaže te o individualnom osjetu svakog potrošača.

Iz navedenih razloga ekstrakti kore mandarine mogli bi se koristiti kao funkcionalni dodaci biofilmovima na bazi pektina.

S druge strane razlog koji bi čovjeka odgovorio od bacanja kore mandarine jest svjesnost o iskorištavanju otpada kao ekološki prihvatljive biomase pri izolaciji mnogobrojnih kemijskih spojeva za poboljšavanje nutritivnih vrijednosti, zdravstvenog statusa, a time i sigurnosti i kvalitete proizvoda.

6. LITERATURA

1. Anonymus 1, Plod i kora mandarine < <https://www.google.hr/search?>> Pristupljeno 14. 5. 2018.
2. Anonymus 2, Osnovna kemijska struktura pektina < <https://www.google.hr/search?>> Pristupljeno 14. 5. 2018.
3. Anonymus 3, Osnovni dijelovi spektrofotometra < <https://www.google.hr/search?>> Pristupljeno 16 .5. 2018.
4. Ajila C. M., Bhat S. G., Rao S. P. (2007) Valuable Components of Raw and Ripe Peels from Two Indian Mango Varieties, *Food Chemistry* **102**: 1006 - 1011.
5. Bakarić P. (1983) Uzgoj mandarine u Nišu, Stanica za južne kulture, Dubrovnik, str. 7 - 41.
6. Boluda-Aguilar M., García-Vidal L., del Pilar González-Castañeda F, López-Gómez A. (2010) Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology* **101**: 3506 - 3513.
7. Brejnholt S. M. (2010) Pectin. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, (Imeson, A., ured.), *Blackwell Publishing, Chichester*, str. 237 - 266.
8. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. i Smith F. (1956) Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
9. Duraković L., Duraković Z., Blažinkov M., Bošnjak M., Sikora S., Delaš F., Markov K., Skelin A., Čvek D. (2009) Mikrobne zajednice i biofilmovi. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 92-97.
10. Espitia P. J. P., Du W. X., Avena-Bustillos R. D. J., Soares N. D. F. F., McHugh T. H. (2014) Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids* **35**: 287 - 296.
11. Falguera V., Quintero J. P., Jiménez A., Muñoz J. A., Ibarz A. (2011) Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology* **22**: 292 - 303.
12. FAO. 2010. Production Year Book. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 55.
13. Günzler H., Gremlich H. U. (2005) Uvod u infracrvenu spektroskopiju (preveli prof. dr.sc. Z. Meić, dr. sc. G. Baranović), Školska knjiga, Zagreb.
14. Ho S., Lin C. (2008) Investigation of Heat Treating Conditions for enhancing the Anti-inflammatory Activity of Citrus Fruit (*Citrus reticulata*) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 7976 - 7982.

15. Jayathilakan K., Sultana K., Radhakrishna K., Bawa A. S. (2012) Utilization of Byproducts and Waste Materials from Meat, Poultry and Fish Processing Industries - A review. *Journal of Food Science and Technology* **49**: 278 - 293.
16. Jednaček T., Novak P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line. *Kemija u industriji* **62**: 71 – 80.
17. Kale P. N., Adsule P. G. (1995) Citrus. U: Handbook of Fruit Science and Technology (Kadam S. S., Salunke, D. K., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 39 - 62.
18. Kimball D. (1996) Oranges and Tangerines. U: Processing fruits: Science and technology (Hui Y. H., Barrett D. M., Laszlo P. S., ur.), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, str. 265 - 335.
19. Larrauri J. A., Ruperez P., Bravo L., Saura-Calixto F. (1996) High Dietary Fiber Powders from Orange and Lime Peels. Associated Polyphenols and Antioxidant Capacity. *Food Research International* **29**: 757 - 762.
20. Lota M., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. (2000) Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins, <http://www.elsevier.com/locate/biochemsyseco>.
21. May C. D. (1990) Industrial Pectins: Sources, production and applications, *Carbohydrate Polymers* **12**: 79 - 99.
22. Mazza G. (1987) Gas chromatography and mass spectrometry study of the aromatic composition of mandarin essential oil, *Sciences des Aliments* **7**: 459 - 479.
23. McClatchey K. D. (2002) Clinical Laboratory medicine, Lipincott Wilkams & Wilkins, Philadelphia, US.
24. Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Krnjajić D., Petrović J. (2008) Biofilm - organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Naučni institut za veterinarstvo, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, str. 1 - 9.
25. Mohnen D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266-277.
26. Penner M. H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy. U: Food analysis (Nielsen S., ur.), Springer science+Business Media, LLC, str. 375 - 385.
27. Pine S. H. Organska kemija (prijevod I. Bregovec i V. Rapić,1994.), str. 1062 - 1138.
28. Putnik P., Bursać Kovačević D., Režek Jambrak A., Barba F. J., Cravotto G., Binello A., Lorenzo J. M., Shpigelman A. (2017) Innovative "Green" and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes - A Review. *Molecules* **22**: 680(1)-680(24).

29. Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik G. A. (2016) Citrus peel as a source of functional ingredient - A review. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://dxdoi.org/10.1016/jssas.2016.07.006>
30. Rincon A. M., Vasquez A. M., Padilla F. C. (2005) Chemical composition and bioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **55**: 305 - 310.
31. Seixas F.L., Turbiani F.R.B., Salomao P.G., Souza R.P., Gimenes M.L. (2013) Biofilms Composed of Alginate and Pectin: Effect of Concentration of Crosslinker and Plasticizer Agents. *Chemical Engineering Transactions* **32**: 1693 - 1698.
32. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (1999) *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Arsa Hasarbegović
ime i prezime studenta