



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Leśny i Technologii Drewna

mgr inż. Karolina Stefanowska

**Biodegradowalne polisacharydowe materiały kompozytowe z wypełniaczami
lignocelulozowymi oraz dodatkiem produktów naturalnych**

Biodegradable polysaccharide composite materials with lignocellulosic fillers and added
natural products

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauki rolnicze
w dyscyplinie nauki leśne

Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences in the discipline of forest sciences

Promotorzy:

prof. dr hab. inż. Izabela Ratajczak

Katedra Chemii,

Wydział Leśny i Technologii Drewna,

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

prof. UEP dr hab. Renata Dobrucka

Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,

Instytut Nauk o Jakości,

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Promotor pomocniczy:

dr Magdalena Woźniak

Katedra Chemii,

Wydział Leśny i Technologii Drewna,

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2025

Spis treści

1.	Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu	4
2.	Streszczenie w języku polskim	5
3.	Streszczenie w języku angielskim.....	6
4.	Wstęp.....	7
5.	Cel pracy i hipotezy badawcze	12
5.1.	CEL PRACY	12
5.2.	HIPOTEZY BADAWCZE	12
6.	Materiały i metody badawcze	13
6.1.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH Z DODATKAMI POCHODZENIA NATURALNEGO.....	14
6.2.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH OTRZYMANYCH Z WYKORZYSTANIEM ROZPUSZCZALNIKÓW NATURALNYCH – OCTÓW OWOCOWYCH I KOMBUCHY	16
6.3.	ZASTOSOWANIE BŁONOTWÓRCZYCH ROZTWORÓW CHITOZANU	18
7.1.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH Z DODATKIEM NANOCELULOZY I EEP .	20
7.2.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH Z DODATKIEM KOFEINY I EEP	29
7.2.1.	Charakterystyka roztworów błonotwórczych.....	29
7.2.2.	Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych.....	30
7.3.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH OTRZYMANYCH Z WYKORZYSTANIEM NATURALNYCH ROZPUSZCZALNIKÓW – OCTÓW OWOCOWYCH.....	38
7.3.1.	Charakterystyka naturalnych rozpuszczalników oraz roztworów błonotwórczych chitozanu.....	38
7.3.2.	Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych.....	43
7.4.	CHARAKTERYSTYKA FOLII CHITOZANOWYCH OTRZYMANYCH Z WYKORZYSTANIEM KOMBUCHY	46
7.4.1.	Charakterystyka roztworów kombuchy	46
7.4.2.	Charakterystyka roztworów błonotwórczych.....	49
7.4.3.	Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych.....	50
7.5.	APLIKACYJNE ZASTOSOWANIE BŁONOTWÓRCZYCH ROZTWORÓW CHITOZANU	59
7.5.1.	Charakterystyka roztworów kombuchy	59
7.5.2.	Charakterystyka roztworów błonotwórczych.....	60

7.5.3. Charakterystyka folii chitozanowych.....	61
7.5.4. Ocena jakości czerwonej papryki pokrytej roztworem błonotwórczym chitozanu.....	63
8. Podsumowanie	69
9. Wnioski	72
10. Spis literatury	74
Kopie prac wchodzących w skład cyklu publikacji	83
Oświadczenia dotyczące wkładu doktoranta oraz współautorów w przygotowanie prac naukowych	151

Wykaz skrótów

EEP – etanolowy ekstrakt z propolisu

TS – wytrzymałość na rozciąganie

EB – wydłużenie przy zerwaniu

WVTR – szybkość transmisji pary wodnej

OTR – szybkość transmisji tlenu

CO₂TR – szybkość transmisji dwutlenku węgla

EMC – wilgotność równowagowa

GDW – model Guggenheim-DiMarzio-Waters

SEM – elektronowa mikroskopia skaningowa

ATR-FTIR – spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera

TPC – całkowita zawartość fenoli

TFC – całkowita zawartość flawonoidów

DPPH · – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu

UPLC – ultrasprawną chromatografią cieczą

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

1. **Stefanowska, K.**, Bucher, M., Reichert, C.L., Sip, A., Woźniak, M., Schmid, M., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2024. Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. *Industrial Crops and Products* 219, 119112. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2024.119112>
IF 5,6; MNiSW 200 pkt
2. **Stefanowska, K.**, Woźniak, M., Majka, J., Sip, A., Mrówczyńska, L., Kozak, W., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2023. Chitosan films with caffeine and propolis as promising and ecofriendly packaging materials. *Applied Sciences* 13, 12351. <https://doi.org/10.3390/APP132212351>
IF 2,5; MNiSW 100 pkt
3. **Stefanowska, K.**, Woźniak, M., Dobrucka, R., Sip, A., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Ratajczak, I., 2025. Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. *Polymers* 17, 11. <https://doi.org/10.3390/POLYM17010011>
IF 4,7; MNiSW 100 pkt
4. **Stefanowska, K.**, Woźniak, M., Majka, J., Sip, A., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Kozak, W., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2023. A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. *Industrial Crops and Products* 197, 116634. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2023.116634>
IF 5,6; MNiSW 200 pkt
5. **Stefanowska, K.**, Woźniak, M., Sip, A., Biegańska-Marecik, R., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2025. Kombucha as a solvent for chitosan coatings: a new strategy to extend shelf life of red peppers. *Materials* 18, 1605. <https://doi.org/10.3390/MA18071605>
IF 3,1; MNiSW 140 pkt

2. Streszczenie w języku polskim

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka biodegradowalnych materiałów opakowaniowych na bazie chitozanu o polepszonych właściwościach fizycznych, mechanicznych i mikrobiologicznych w porównaniu z foliami chitozanowymi bez dodatków. Na pracę badawczą składały się trzy etapy. Pierwszy etap badań dotyczył zastosowania dodatków do folii chitozanowych, takich jak nanoceluloza, etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) oraz kofeina. Folie uzyskane na tym etapie badań charakteryzowały się polepszonymi właściwościami barierowymi oraz wysoką przeciwbakteryjną, szczególnie w przypadku materiałów z dodatkiem EEP, w porównaniu z foliami chitozanowymi bez dodatków. W drugim etapie badań skupiono się na możliwości zastąpienia powszechnie wykorzystywanego rozpuszczalnika – kwasu octowego naturalnymi rozpuszczalnikami, takimi jak roztwory kombuchy oraz octy owocowe, które oprócz funkcji rozpuszczalnika, stanowiły również źródło związków bioaktywnych. Folie przygotowane z ich użyciem, wykazały zadowalające właściwości mechaniczne oraz silne działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające. W ostatnim etapie badań przeprowadzono badania aplikacyjne, które obejmowały powleczenie świeżych papryk roztworem błonotwórczym chitozanu. Uzyskane wyniki pokazały, że zastosowana powłoka ochronna skutecznie przedłużyła trwałość produktu i nie pogorszyła jego cech sensorycznych. Badania potwierdziły potencjał wykorzystania folii chitozanowych z wymienionymi powyżej dodatkami jako innowacyjnych i zrównoważonych materiałów opakowaniowych m.in. w przemyśle spożywczym.

3. Streszczenie w języku angielskim

The purpose of this dissertation was to develop and characterize biodegradable chitosan-based packaging materials with improved physical, mechanical and microbiological properties compared to chitosan films without additives. The research work consisted of three stages. The first stage of the research involved the application of additives to chitosan films, such as nanocellulose, ethanol extract of propolis (EEP) and caffeine. The films obtained at this stage of the research were characterized by improved barrier properties and high antimicrobial properties, especially for materials with EEP additives, compared to chitosan films without additives. In the next stage of the research, the focus was on the possibility of replacing the commonly used solvent–acetic acid with natural solvents, such as kombucha solutions and fruit vinegars, which, in addition to their solvent function, also provided a source of bioactive compounds. Films prepared with them, showed satisfactory mechanical properties and strong antimicrobial and antioxidant activity. In the final stage of the study, application tests were conducted, which included coating fresh peppers with a chitosan film-forming solution. The results showed that the applied protective coating effectively prolonged the shelf life of the product and did not deteriorate its sensory characteristics. The research confirmed the potential of using chitosan films with the above-mentioned additives as innovative and sustainable packaging materials in the food industry, among others.

4. Wstęp

Zanieczyszczenie środowiska tworzywami sztucznymi jest problemem globalnym, występującym na całym świecie, a w szczególności dotyczącym takich miejsc jak pustynie, gospodarstwa rolne, tereny górskie i oceany. Emisja tworzyw sztucznych do środowiska cały czas zwiększa się i według prognoz nadal będzie rosła, nawet pomimo wprowadzanych regulacji prawnych oraz podejmowanych prób jej ograniczenia, co stanowi poważny problem (Borrelle i in., 2020). Wprowadzane działania, takie jak wdrożenie konwencji bazylejskiej (EUR-Lex-21993A0216(02)), która ma zapobiegać transportowi odpadów z tworzyw sztucznych do krajów, które charakteryzują się słabym systemem zarządzania tego typu odpadami, czy też przejście Unii Europejskiej na gospodarkę o obiegu zamkniętym wiążące się z recyklingiem większej ilości odpadów, wciąż nie są wystarczające, aby wpłynąć na zmniejszenie rocznej emisji plastiku (Borrelle i in., 2020; Lau i in., 2020). Tworzywa sztuczne, które przedostają się do środowiska, zaliczane są do trwałych zanieczyszczeń charakteryzujących się niską odwracalnością. Oznacza to, że po uwolnieniu do ekosystemów ich usunięcie jest bardzo trudne, a proces ich naturalnej degradacji może trwać od kilkudziesięciu do nawet kilkuset lat, w zależności od rodzaju polimeru oraz warunków środowiskowych. Ich długotrwała obecność w środowisku prowadzi do ich akumulacji i może mieć poważne konsekwencje ekologiczne oraz zdrowotne (Chamas i in., 2020).

Odpowiedzią na obserwowaną degradację środowiska, związaną z zanieczyszczeniem tworzywami sztucznymi oraz wzrostem świadomości konsumentów w tym zakresie, jest poszukiwanie nowych i naturalnych materiałów, które z powodzeniem mogłyby zastąpić tworzywa sztuczne. Obecne badania skupiają się na poszukiwaniu materiałów wytworzonych z naturalnych polimerów takich jak np. polisacharydy, lipidy czy białka (Teixeira-Costa, Andrade, 2021). Jednym z polisacharydów, który znalazł zastosowanie w produkcji naturalnych materiałów o różnym zastosowaniu jest chitozan (Stefanowska i in., 2023; Tang i in., 2023; Wang i Zhuang, 2022).

Chitozan jest pozyskiwany na drodze alkalicznej N-deacetylacji chityny, która zaraz po celulozie stanowi drugi najpowszechniej występujący w przyrodzie polisacharyd (Aranaz i in., 2021). Chitynę pozyskuje się z pancerzy skorupiaków, egzoszkieletów owadów, alg oraz też ścian komórkowych grzybów. Do wytwarzania chitozanu najczęściej wykorzystuje się α -chitynę, pozyskiwaną z pancerzy zwierząt morskich, a rodzaj uzyskanego chitozanu, w tym jego masa cząsteczkowa oraz stopień deacetylacji jest związany z procesem otrzymywania chitozanu w tym m.in. stężeniem użytych rozpuszczalników, temperaturą oraz czasem reakcji

(Aranaz i in., 2021). Chitozan podobnie jak chityna jest polimerem nierozpuszczalnym w wodzie, natomiast rozpuszcza się w roztworach o odczynie kwaśnym, o pH poniżej 6,3 (Yeul i Rayalu, 2013). Zainteresowanie chitozanem i możliwościami jego wykorzystania, związane jest z jego licznymi i udowodnionymi właściwościami biologicznymi i technologicznymi takimi jak: właściwości przeciwwzapalne, przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe oraz powłokotwórcze (Aranaz i in., 2021; Stefanowska i in., 2023). Chitozan jest polimerem wykorzystywanym do otrzymywania naturalnych powłok i charakteryzuje się możliwością modyfikacji jego struktury oraz umożliwia wbudowanie w jego matrycę różnych dodatków, w celu polepszenia właściwości biologicznych, mechanicznych oraz barierowych uzyskanych folii. Prowadzi to do uzyskania materiałów o pożądanym parametrach, a tym samym o szerszym spektrum zastosowania (Stefanowska i in., 2023; Thambiliyagodage i in., 2023).

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie branży opakowaniowej materiałami naturalnymi, które mogłyby z powodzeniem zastąpić tworzywa sztuczne szczególnie w obrębie przemysłu spożywczego. Materiały chitozanowe są atrakcyjne szczególnie dla producentów żywności poszukujących ekologicznych rozwiązań opakowaniowych ze względu na to, że są to zazwyczaj materiały cienkie, przezroczyste i elastyczne, a ich właściwości można modyfikować poprzez zastosowanie odpowiednich dodatków czy też odpowiednich rozpuszczalników. Na potencjał aplikacyjny materiałów chitozanowych wskazują również zgłoszenia patentowe. Przykładem jest zgłoszenie patentowe KR20160119453A (2015), które opisuje materiał chitozanowy przeznaczony do pakowania żywności, który może być stosowany zarówno jako powłoka na powierzchni opakowań z tworzywa oraz jako samodzielny materiał opakowaniowy. Taki materiał pozwala na przechowywanie różnych produktów spożywczych, takich jak owoce, warzywa, mięso czy pieczywo, przyczyniając się do przedłużenia ich świeżości i okresu przydatności do spożycia. Kolejnym przykładem wykorzystania materiału na bazie chitozanu jest zgłoszenie patentowe CN104610579A (2025), które opisuje materiał wytworzony ze skrobi oraz chitozanu, również przeznaczony do pakowania żywności. Na rynku powstają również firmy oraz startupy, które oferują materiały oparte na chitozanie lub zajmują się ich modyfikacją. Przykładem jest jedna z amerykańskich firm (TômTex), tworząca biodegradowalne materiały z chitozanu, które pierwotnie powstały z myślą o zastąpieniu naturalnej skóry. Jednak opracowana technologia może mieć zastosowanie również w innych dziedzinach przemysłu.

Materiały chitozanowe można modyfikować zmieniając w ten sposób ich właściwości poprzez zastosowanie różnych dodatków oraz dobór odpowiednich rozpuszczalników, do najczęściej stosowanych, naturalnych dodatków mających na celu polepszenie właściwości

materiałów chitozanowych należą: olejki eteryczne (Amor i in., 2021; Yuan i in., 2016), ekstrakty roślinne (Kola i Carvalho, 2023; Ong i in., 2021) oraz inne polisacharydy (Zhang i in., 2021). Szczegółowy przegląd literatury dotyczący zastosowania chitozanu jako biopolimeru do otrzymywania folii, a także dodatków dodawanych do matrycy polimerowej chitozanu został przedstawiony w pracy przeglądowej (Stefanowska i in., 2023).

Badania wykonane w ramach rozprawy doktorskiej dotyczyły otrzymania filmów na bazie chitozanu, do którego matrycy dodano substancje pochodzenia naturalnego, tj. etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP), roztwór kofeiny oraz nanocelulozę, a także zastosowano alternatywne do powszechnie stosowanego kwasu octowego, rozpuszczalniki chitozanu będące źródłem związków bioaktywnych, takie jak roztwory kombuchy oraz octy owocowe. Ponadto, w ramach niniejszej dysertacji przeprowadzono charakterystykę otrzymanych folii w celu określenia możliwości ich zastosowania w opakowaniach przeznaczonych do pakowania żywności.

Jednym z zastosowanych dodatków do folii chitozanowych był etanolowy ekstrakt z propolisu. Propolis jest naturalnym materiałem zbieranym przez pszczoły miodne głównie z materiałów roślinnych. Od wielu lat, ekstrakty z propolisu, ze względu na swoje szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwzapalną i przeciwutleniającą, znajduje zastosowanie m.in. w medycynie naturalnej (Irigoit i in., 2021; Zulhendri i in., 2021). Propolis charakteryzuje się bogatym składem chemicznym, zawierając m.in. związki fenolowe takie jak flawonoidy, kwasy aromatyczne i ich estry, alkohole, terpeny, enzymy, witaminy, aminokwasy, cukry oraz minerały (Kasote i in., 2022).

Kolejnym z zastosowanych dodatków do folii na bazie chitozanu była kofeina. Jest to związek organiczny występujący m.in. w kawie, herbacie czy napojach energetycznych, charakteryzuje się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i przeciwutleniającymi, co sprawia, że stanowi cenny dodatek do wielu produktów farmaceutycznych oraz kosmetycznych (Van Dam i in., 2020). Analiza danych literaturowych pokazała, że kofeina wykazała działanie przeciwbakteryjne wobec Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli* wyizolowanej z różnych produktów spożywczych (Ibrahim i in., 2006).

Wśród dodatków użytych do wzbogacenia folii chitozanowych znalazła się również nanoceluloza. Otrzymywana jest ona z celulozy, która stanowi podstawowy element struktury komórek roślinnych o charakterze budulcowym i należy do najbardziej rozpowszechnionych na świecie polisacharydów (Pennells i in., 2020). Nanocelulozę w zależności od sposobu otrzymywania dzielimy na: celulozę nanokrystaliczną, celulozę nanofibrylowaną oraz

celulozę bakteryjną. Końcowy produkt procesu otrzymywania nanocelulozy, zależy od warunków izolacji oraz zastosowania dodatkowej obróbki, takiej jak obróbka chemiczna (np. hydroliza kwasowa), mechaniczna (np. homogenizacja, ultradźwięki) czy enzymatyczna (Emenike i in., 2023). Zastosowanie nanocelulozy jako dodatku do matrycy naturalnych folii polisacharydowych wpływa przede wszystkim na ich właściwości mechaniczne czy barierowe, takie jak wytrzymałość na rozciąganie i zerwanie, przepuszczalność gazów oraz odporność na działanie wody (Khalid i in., 2021).

Kolejnym z aspektów badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było poszukiwanie alternatywnego rozpuszczalnika chitozanu do powszechnie stosowanego kwasu octowego, głównie kwasu octowego, który poza rozpuszczaniem chitozanu, stanowiłby cenne źródło substancji biologicznie czynnych. Takie podejście pozwoliło na nadanie otrzymywanym materiałom jednocześnie różnych dodatkowych właściwości, takich jak aktywność przeciwdrobnoustrojowa i przeciwutleniająca oraz ulepszone właściwości mechaniczne i barierowe, w porównaniu do folii na bazie samego chitozanu, bez konieczności stosowania oddzielnych dodatków (Adımcılar i in., 2023). Jednym z takich rozpuszczalników może być kombucha. Jest to tradycyjny napój otrzymywany w wyniku fermentacji herbaty. Proces ten zachodzi dzięki działaniu symbiotycznej kultury bakterii i drożdży (SCOBY), która składa się z bakterii kwasu octowego (AAB), bakterii kwasu mlekowego (LAB) oraz drożdży (De Miranda i in., 2022). Kombucha, dzięki dużej zawartości związków aktywnych biologicznie takich jak związki fenolowe, kwasy organiczne czy witaminy stanowi bardzo skuteczny i naturalny przeciwutleniacz oraz wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Abaci i in., 2022; De Miranda i in., 2022).

Kolejną alternatywą dla powszechnie stosowanego rozpuszczalnika chitozanu, tj. kwasu octowego, stanowią octy owocowe. Octy otrzymywane z różnych owoców są źródłem nie tylko kwasów organicznych umożliwiających rozpuszczanie chitozanu, ale również są źródłem związków bioaktywnych takich jak aminokwasy, kwasy organiczne, fenole czy związki mineralne, co sprawia, że wykazują korzystne działanie m.in. przeciwutleniające oraz przeciwdrobnoustrojowe (Bakir i in., 2017; Luzón-Quintana i in., 2021).

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęto próbę opracowania funkcjonalnych materiałów chitozanowych, z uwzględnieniem zastosowania dodatków, jak i innowacyjnych rozpuszczalników chitozanu pełniących dodatkową funkcję – źródło związków biologicznie aktywnych. Zastosowanie naturalnych komponentów pozwoliło na uzyskanie materiałów o korzystnych właściwościach użytkowych, takich jak aktywność przeciwbakteryjna i

poprawiona wytrzymałość mechaniczna, w porównaniu z foliami bez dodatków lub wytworzonych przy użyciu kwasu octowego. Kompleksowe podejście do projektowania tego typu materiałów wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju zrównoważonych technologii w branży opakowaniowej, stanowiąc odpowiedź na rosnące wymagania przemysłu opakowaniowego i spożywczego, a także na oczekiwania konsumentów wobec bezpiecznych i ekologicznych rozwiązań.

5. Cel pracy i hipotezy badawcze

5.1. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie oraz charakterystyka materiałów chitozanowych o polepszonych właściwościach fizycznych, mechanicznych oraz przeciwdrobnoustrojowych, z myślą o ich praktycznym zastosowaniu jako biodegradowalnych materiałów opakowaniowych.

W ramach pracy badawczej podjęto próbę modyfikacji matrycy chitozanowej poprzez zastosowanie dodatków funkcjonalnych takich jak nanoceluloza oraz etanolowy ekstrakt z propolisu, w celu poprawy właściwości otrzymanych materiałów w porównaniu z materiałami bez dodatków.

Kolejnym aspektem badań było zastąpienie powszechnie stosowanego rozpuszczalnika chitozanu, jakim jest kwas octowy, rozpuszczalnikami naturalnymi, takimi jak kombucha i octy owocowe, które stanowiły również źródło związków bioaktywnych, polepszających właściwości uzyskanych materiałów.

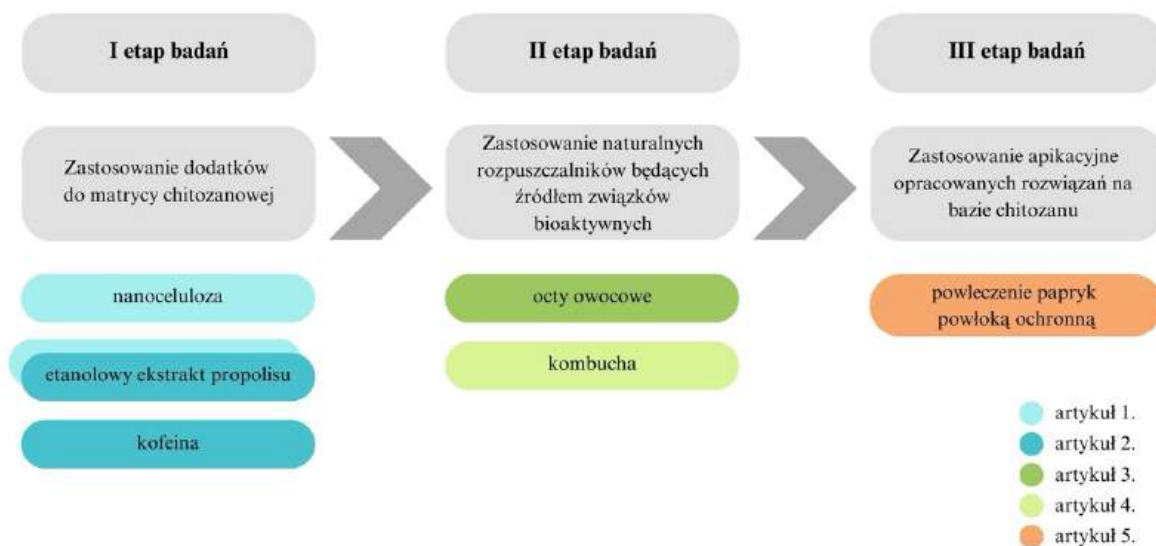
W ostatnim etapie badań oceniono aplikacyjny potencjał opracowanych materiałów poprzez zastosowanie ich jako powłoki ochronnej do powleczenia owoców czerwonej papryki. Pozwoliło to na weryfikację skuteczności działania w warunkach zbliżonych do rzeczywistych zastosowań przemysłowych.

5.2. Hipotezy badawcze

- Zastosowanie dodatków takich jak nanoceluloza i etanolowy ekstrakt z propolisu, jako składników folii na bazie chitozanu wpływa na poprawę właściwości mechanicznych oraz przeciwdrobnoustrojowych otrzymanych folii chitozanowych.
- Kombucha oraz octy owocowe mogą stanowić rozpuszczalnik dla chitozanu i pozwalają na nadanie foliom chitozanowymi właściwości przeciwdrobnoustrojowych poprzez wzbogacenie ich w związki bioaktywne.
- Materiały chitozanowe otrzymane przy użyciu naturalnych rozpuszczalników mogą pełnić funkcję powłoki ochronnej w przechowywaniu świeżej żywności.

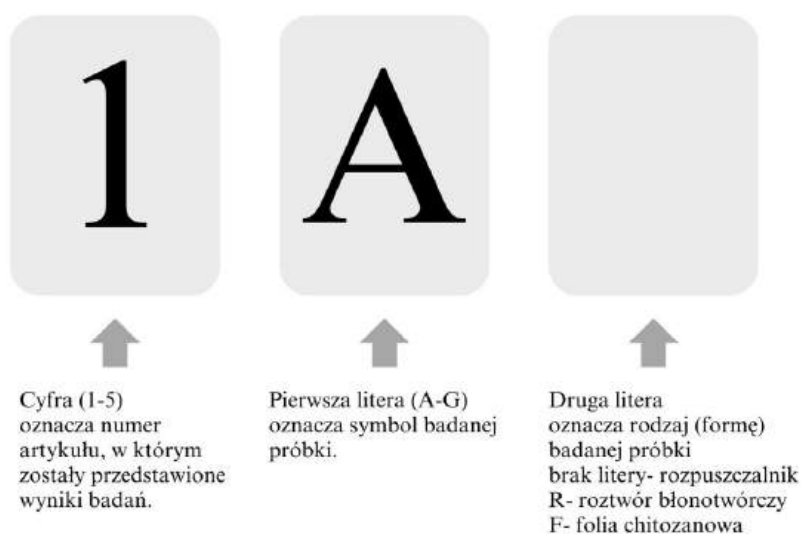
6. Materiały i metody badawcze

Prace badawcze zrealizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały podzielone na trzy etapy i przeprowadzone zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 1.



Rycina 1. Etapy prac badawczych zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej.

W celu zwiększenia czytelności oznaczeń próbek w autoreferacie, ujednolicono ich symbolikę, która różni się od tej zastosowanej w artykułach. Wszystkie uzyskane próbki zostały oznaczone zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 2.



Rycina 2. Schemat przedstawiający symbole próbek zastosowane w autoreferacie.

6.1. Charakterystyka folii chitozanowych z dodatkami pochodzenia naturalnego

Otrzymanie folii chitozanowych

Chitozan otrzymywany z chityny, pochodzącej z muszli kraba (lepkość > 400 mPa·s, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczono w roztworze wodnym kwasów organicznych (3% roztwór kwasu octowego $C_2O_2H_4$ oraz cytrynowego $C_6H_8O_7$), z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego. W ten sposób uzyskano roztwory wyjściowe do których zastosowano następujące dodatki:

- etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) o końcowym stężeniu 1% w roztworze błonotwórczym,
- wodny roztwór kofeiny $C_8H_{10}N_4O_2$ o końcowym stężeniu 1% w roztworze błonotwórczym,
- koloidalny roztwór nanocelulozy o końcowych stężeniach 0,25; 0,5; 0,75; 1% w roztworach błonotwórczych.

W celu uzyskania jednorodnych błonotwórczych roztworów chitozanu z powyżej wymienionymi dodatkami, zastosowano również emulgator – Tween 20. Następnie otrzymane roztwory zostały wylane na szalki Petriego zawierające folię teflonową i suszone w temperaturze pokojowej przez 24 godziny.

Symbole próbek folii, uzyskanych z wykorzystaniem kwasu octowego jako rozpuszczalnika, dla których wyniki badań zostały zaprezentowane w ramach pierwszego artykułu zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Symbole próbek folii uzyskanych w pierwszym etapie badań (z zastosowaniem kwasu octowego jako rozpuszczalnika oraz różnych dodatków).

Folie analizowane w ramach artykułu 1	
Symbole folii	Dodatek
1AF	--
1BF	nanoceluloza 0,25%
1CF	nanoceluloza 0,5%
1DF	nanoceluloza 0,75%
1EF	nanoceluloza 1%
1FF	nanoceluloza 0,25%, EEP 1%
1GF	nanoceluloza 0,5%, EEP 1%

Symbole próbek folii, wytworzonych z wykorzystaniem kwasu octowego oraz kwasu cytrynowego jako rozpuszczalników, dla których uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w ramach drugiego artykułu zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Symbole próbek folii uzyskanych w pierwszym etapie badań (z zastosowaniem różnych rozpuszczalników i dodatków).

Roztwory błonotwórcze oraz folie analizowane w ramach artykułu 2			
Symbole roztworów błonotwórczych	Symbole folii	Rozpuszczalnik	Dodatek
2AR	2AF	kwas octowy	--
2BR	2BF	kwas octowy	kofeina
2CR	2CF	kwas octowy	kofeina, EEP
2DR	2DF	kwas cytrynowy	--
2ER	2EF	kwas cytrynowy	kofeina
2FR	2FF	kwas cytrynowy	kofeina, EEP

Charakterystyka otrzymanych materiałów

W celu scharakteryzowania otrzymanych materiałów wykonano następujące badania:

- mechaniczne: wytrzymałość na rozciąganie (TS), wydłużenie przy zerwaniu (EB),
- fizyczne: szybkość transmisji pary wodnej (WVTR), tlenu (OTR) oraz dwutlenku węgla (CO₂TR), wolna energia powierzchniowa, wilgotność równowagowa (EMC) oraz szacowane współczynniki adsorpcji według modelu Guggenheim-DiMarzio-Waters (GDW),
- strukturalne: elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM),
- chemiczne: spektroskopia osłabionego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR)
- przeciwdrobnoustrojowe: ocena aktywności otrzymanych materiałów względem bakterii.

Dodatkowo, określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe roztworów błonotwórczych z których otrzymano folie na bazie chitozanu.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test *post hoc* Tukeya HSD, przy $p \leq 0,05$. Różne litery przy wartościach średnich wyznaczonych parametrów oznaczają różnice istotne statystycznie.

6.2. Charakterystyka folii chitozanowych otrzymanych z wykorzystaniem rozpuszczalników naturalnych – octów owocowych i kombuchy

Otrzymanie folii chitozanowych

W kolejnym etapie badań powszechnie wykorzystywane rozpuszczalniki chitozanu takie jak kwas octowy i cytrynowy, zostały zastąpione naturalnymi rozpuszczalnikami, zawierającymi związki o aktywności biologicznej. Octy owocowe zostały zakupione komercyjnie (Olini, Świebodzice, Polska), natomiast kombuche uzyskano w procesie fermentacji trzech rodzajów herbat oraz kawy, którą prowadzono przez 21 dni w temperaturze pokojowej. Do otrzymania roztworów błonotwórczych chitozanu wykorzystano następujące rozpuszczalniki:

- ocet jabłkowy,
- ocet z czarnej porzeczki,
- ocet wiśniowy,
- kombucha na bazie herbaty białej,
- kombucha na bazie herbaty zielonej,
- kombucha na bazie herbaty czarnej,
- kombucha na bazie kawy.

Chitozan otrzymywany z chityny, pochodzącej z muszli kraba (lepkość $> 400 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczono w powyżej wymienionych rozpuszczalnikach, a następnie homogenizowano z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego. Roztwory zostały wylane na szalki Petriego wyłożone folią teflonową i suszone w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Symbole próbek roztworów błonotwórczych oraz folii uzyskanych na tym etapie badań zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Symbole próbek rozpuszczalników naturalnych, roztworów błonotwórczych chitozanu i folii analizowanych w drugim etapie badań.

Rozpuszczalniki, roztwory błonotwórcze oraz folie analizowane w ramach artykułu 3			
Symbole rozpuszczalników	Symbole roztworów błonotwórczych	Symbole folii	Rozpuszczalnik
3A	3AR	3AF	ocet jabłkowy
3B	3BR	3BF	ocet z czarnej porzeczki
3C	3CR	3CF	ocet wiśniowy
Rozpuszczalniki, roztwory błonotwórcze oraz folie analizowane w ramach artykułu 4			
4A	4AR	4AF	kombucha na bazie herbaty białej
4B	4BR	4BF	kombucha na bazie herbaty zielonej
4C	4CR	4CF	kombucha na bazie herbaty czarnej
4D	4DR	4DF	kombucha na bazie kawy

Charakterystyka rozpuszczalników naturalnych, roztworów błonotwórczych chitozanu oraz otrzymanych materiałów

W celu scharakteryzowania rozpuszczalników naturalnych, roztworów błonotwórczych chitozanu oraz otrzymanych materiałów wykonano następujące badania:

- chemiczne: wartość pH, zawartość kwasów organicznych, zawartość związków fenolowych, całkowita zawartość fenoli (TPC) i flawonoidów (TFC), spektroskopia osłabionego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR),
- mechaniczne: wytrzymałość na rozciąganie (TS), wydłużenie przy zerwaniu (EB),
- fizyczne: szybkość transmisji pary wodnej (WVTR), oraz tlenu (OTR), wilgotność równowagowa (EMC) oraz szacowane współczynniki adsorpcji według modelu Guggenheim-DiMarzio-Waters (GDW),
- strukturalne: elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM),
- przeciwdrobnoustrojowe: ocena aktywności względem wybranych szczepów patogenów,
- przeciwutleniające: analiza właściwości przeciwrodnikowych oraz zdolności chelatowania jonów żelaza Fe²⁺.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test *post hoc* Tukeya HSD, przy $p \leq 0,05$. Różne litery przy wartościach średnich wyznaczonych parametrów oznaczają różnice istotne statystycznie.

6.3. Zastosowanie błonotwórczych roztworów chitozanu

Otrzymanie błonotwórczego roztworu chitozanu i jego zastosowanie do powlekania czerwonej papryki

W ostatnim etapie badań otrzymano trzy roztwory błonotwórcze chitozanu, z wykorzystaniem naturalnych rozpuszczalników, zawierających związki o aktywności biologicznej. Trzy rodzaje kombuchy uzyskano w procesie przeprowadzonej fermentacji, z wykorzystaniem następujących surowców roślinnych:

- rumianek (*Matricaria L.*),
- melisa lekarska (*Melissa officinalis L.*),
- herbata czarna.

Chitozan otrzymywany z chityny, pochodzącej z muszli kraba (lepkość > 400 mPa·s, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczono w roztworach kombuchy uzyskanej z wyżej wymienionych surowców roślinnych, a następnie homogenizowano z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego. Następnie, roztwór błonotwórczy uzyskany przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej wykorzystano do otrzymania folii oraz do powleczenia czerwonej papryki. Papryki zostały zakupione w dyskoncie spożywczym, a następnie powleczone roztworem błonotwórczym poprzez dwukrotne zanurzenie. Próbę kontrolną stanowiły papryki niepowleczone.

Symbole próbek roztworów błonotwórczych, folii oraz papryk, które stosowane były w badaniach na tym etapie realizacji pracy doktorskiej zostały przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4. Symbole próbek roztworów błonotwórczych, folii oraz papryk uzyskanych w trzecim etapie badań.

Symbole roztworów kombuchy	Symbole roztworów błonotwórczych	Symbole folii	Rozpuszczalnik (kombucha)
5A	5AR	--	na bazie rumianku
5B	5BR	5BF	na bazie melisy lekarskiej
5C	5CR	--	na bazie herbaty czarnej
Symbol - papryki powleczone	Symbol - próba kontrolna	Rozpuszczalnik	
5D	5E	na bazie melisy lekarskiej	

Charakterystyka rozpuszczalników naturalnych, roztworów błonotwórczych chitozanu oraz otrzymanych materiałów

- chemiczne: całkowita zawartość fenoli (TPC) i flawonoidów (TFC), zawartość kwasu askorbinowego,
- mechaniczne: wytrzymałość na rozciąganie (TS), wydłużenie przy zerwaniu (EB),
- fizyczne: szybkość transmisji pary wodnej (WVTR),
- przeciwbakteryjne: ocena aktywności względem wybranych szczepów patogenów,
- przeciwutleniające: analiza właściwości przeciwrodnikowych,
- ocena parametrów tekstury: wytrzymałość skórki i elastyczność skórki papryki,
- ocena sensoryczna: ocena pożądalności i intensywności koloru, aromatu i ogólny wygląd.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową i dwuczynnikową (tabele 20 – 22) analizę wariancji ANOVA oraz test *post – hoc* Tukeya HSD, przy $p \leq 0,05$. Różne litery przy wartościach średnich wyznaczonych parametrów oznaczają różnice istotne statystycznie.

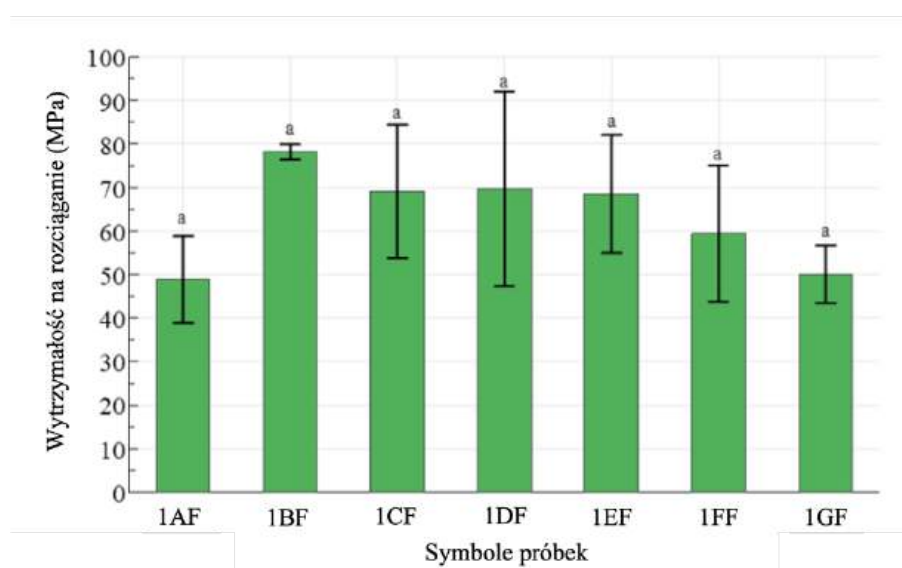
7. Omówienie uzyskanych wyników badań

7.1. Charakterystyka folii chitozanowych z dodatkiem nanocelulozy i EEP

Wyniki uzyskane na tym etapie badań zostały przedstawione w artykule naukowym nr 1. Celem badań było określenie wpływu zastosowanych dodatków – nanowłókien celulozy oraz ekstraktu etanolowego z propolisu (EEP) – na właściwości otrzymanych folii chitozanowych. Otrzymano siedem próbek folii, oznaczonych następującymi symbolami: 1AF – brak dodatków, 1BF – dodatek nanocelulozy 0,25%, 1CF – dodatek nanocelulozy 0,5%, 1DF – dodatek nanocelulozy 0,75%, 1EF – dodatek nanocelulozy 1%, 1FF – dodatek nanocelulozy 0,25% oraz EEP 1%, 1GF – dodatek nanocelulozy 0,5% oraz EEP 1%.

Wytrzymałość na rozciąganie (TS)

W celu oceny właściwości mechanicznych wykonano badanie wytrzymałości na rozciąganie, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 3.



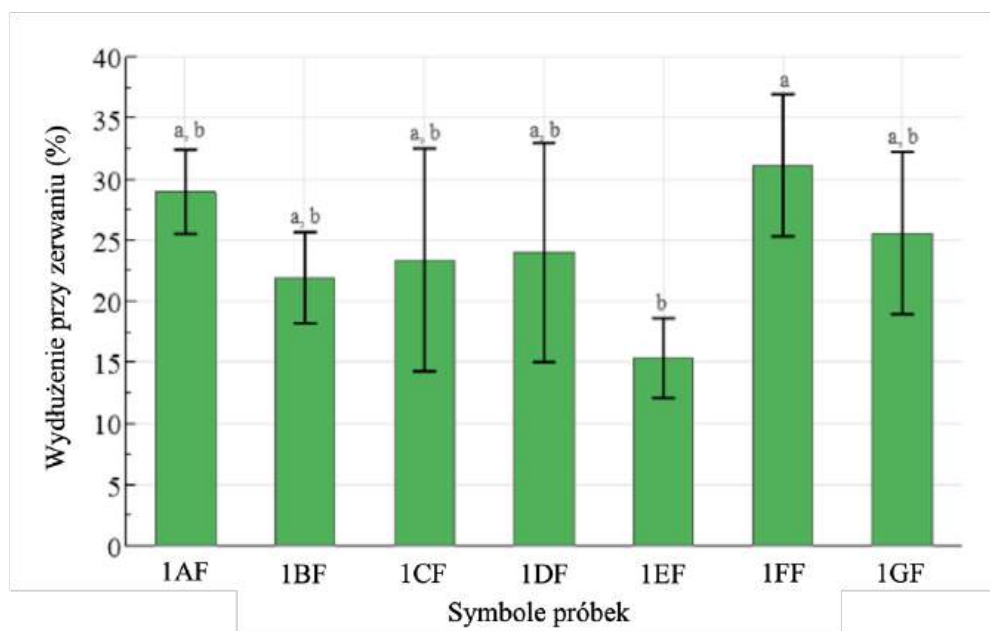
Rycina 3. Wytrzymałość na rozciąganie otrzymanych folii chitozanowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie dodatku nanocelulozy oraz EEP do matrycy chitozanowej nie wpłynęło na wytrzymałość na rozciąganie uzyskanych materiałów, niezależnie od stężenia zastosowanych dodatków. Wyniki te zostały potwierdzone analizą statystyczną. Uzyskane wyniki mieściły się w zakresie od 60 dla folii bez dodatków (1AF) do 78,30 MPa dla folii z dodatkiem 0,25% nanocelulozy (1BF). Analiza danych literaturowych wykazała, że dodatek nanocelulozy wykazywał istotny wpływ na poprawę parametrów mechanicznych folii chitozanowych w porównaniu do folii na bazie samego chitozanu, jednak przy zastosowaniu wyższego stężenia np. 50% stężenia masowego (Costa i in., 2021; De Carli

i in., 2022). Również w przypadku dodatku EEP, korzystny wpływ na poprawę parametrów mechanicznych odnotowano dopiero przy zastosowaniu wyższego stężenia (20%) tego dodatku (De Carli i in., 2022).

Wydłużenie przy zerwaniu (EB)

Badanie wydłużenia przy zerwaniu stanowiło drugi parametr służący do oceny właściwości mechanicznych uzyskanych folii, wyniki tego badania zostały przedstawione na rycinie 4.

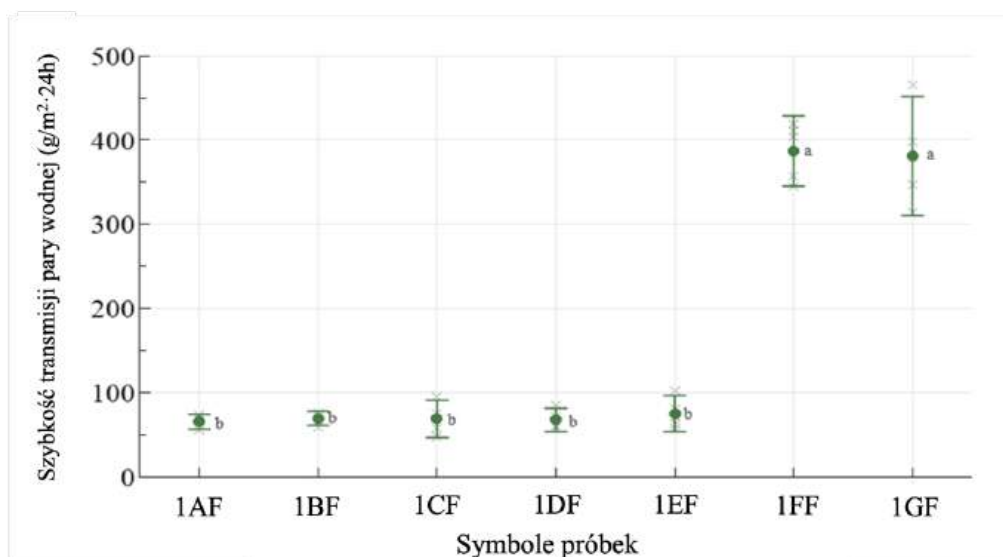


Rycina 4. Wydłużenie przy zerwaniu wyznaczone dla otrzymanych folii chitozanowych.

W przypadku wydłużenia przy zerwaniu najwyższą wartość tego parametru odnotowano dla próbki 1FF (31,16%), która zawierała dodatek nanocelulozy o stężeniu 0,25% oraz EEP. Najniższą wartość EB (15,39%) odnotowano dla próbki 1EF, która zawierała najwyższe stosowane stężenie nanocelulozy (1%). Badania przeprowadzone przez Talebi i in. (2022) wykazały, że dodatek nanocelulozy – zarówno w formie celulozy nanokrystalicznej, jak i nanofibrylowanej – do folii chitozanowych skutkowało zwiększeniem wartości wydłużenia przy zerwaniu w miarę wzrostu jej stężenia od 1 do 7% wag., w porównaniu do folii zawierających wyłącznie chitozan. Z kolei, wyniki uzyskane przez Khan i in. (2012) pokazały odwrotną tendencję – wartość EB zmniejszyła się z 8,58% (dla czystej folii chitozanowej) do 3,95% po dodaniu 10% (m/m) nanokrystalicznej celulozy.

Szybkość transmisji pary wodnej (WVTR)

Wyniki badania szybkości transmisji pary wodnej wykonane dla folii na bazie chitozanu zostały przedstawione na rycinie 5.

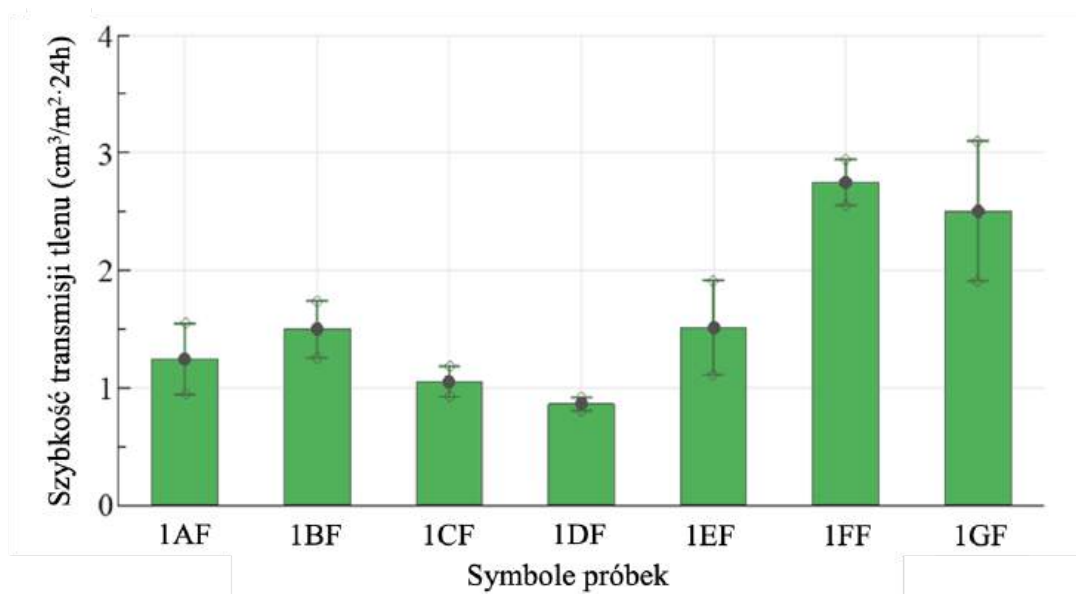


Rycina 5. WVTR wyznaczone dla otrzymanych folii o grubości 100 μm .

Uzyskane wyniki wykazały, że średnie wartości szybkości transmisji pary wodnej dla folii bez dodatku EEP (1AF-1EF) wahały się w zakresie od 65 do 75 $\text{g/m}^2\cdot 24\text{h}$. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy próbkami z różną zawartością dodatku nanocelulozy, a folią chitozanową bez dodatków (AF). Wyniki uzyskane dla próbek z dodatkiem EEP charakteryzowały się znacznie wyższą wartością WVTR, na poziomie 387 $\text{g/m}^2\cdot 24\text{h}$ – dla próbki 1FF oraz 380 $\text{g/m}^2\cdot 24\text{h}$ – dla próbki 1GF. Uzyskane wyniki wykazały, że dodatek EEP miał znaczący wpływ na przepuszczalność pary wodnej. Dane literaturowe potwierdzają wpływ dodatku EEP do matrycy chitozanowej na WVTR, a jego wartość zależy od zastosowanego stężenia EEP. Dodatek EEP na poziomie 0,75% oraz mniejszym skutkowało wzrostem wartości WVTR, natomiast stężenie EEP 2,5% oraz większe powodowało obniżenie wartości WVTR otrzymanych folii (Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016; Stanicka i in., 2021).

Szybkość transmisji tlenu (OTR)

Kolejnym parametrem wykorzystanym do oceny właściwości barierowych otrzymanych materiałów był paramter OTR (szybkości transmisji tlenu). Uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 6.

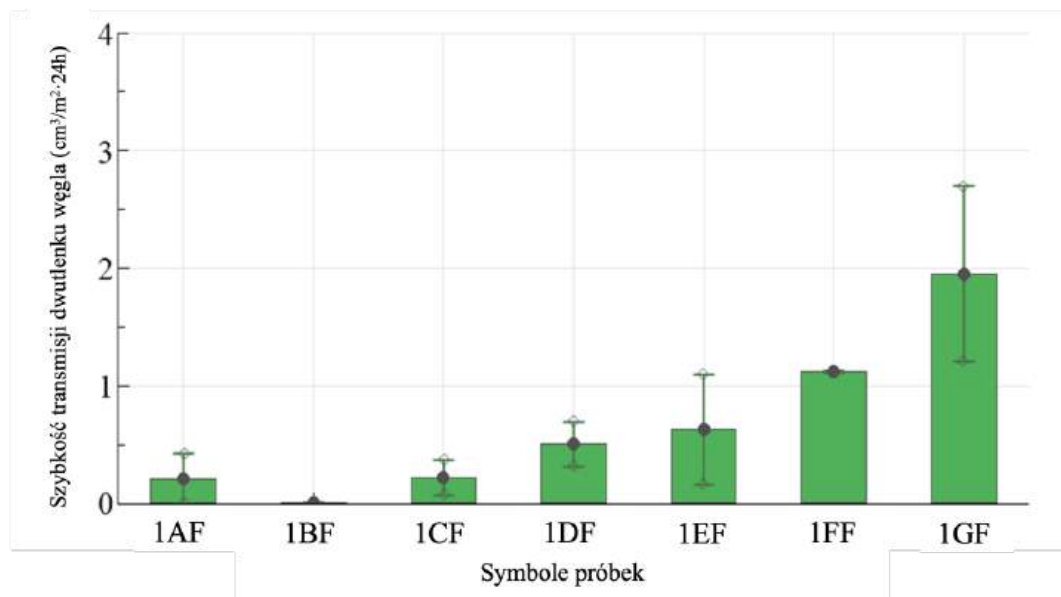


Rycina 6. OTR wyznaczone dla otrzymanych folii o grubości 100 μm .

Uzyskane wyniki w przypadku wszystkich folii charakteryzowały się średnią wartością poniżej $3 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24\text{h}$, co wskazuje na dobre właściwości barierowe otrzymanych folii wobec tlenu. Zastosowanie dodatku EEP spowodowało nieznaczny wzrost przepuszczalności tlenu na poziomie $2,7 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24\text{h}$ (1FF) oraz $2,5 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24\text{h}$ (1GF). Wzrost przepuszczalności mógł być związany z obecnością flawonoidów w EEP, które zakłóciły uporządkowaną strukturę folii, zwiększając tym samym jej dyfuzyjność, na co wskazują również badania przeprowadzone przez Siripatrawan i Vitchayakitti (2016).

Szybkość transmisji dwutlenku węgla (CO_2TR)

W celu oceny właściwości barierowych otrzymanych materiałów przeprowadzono również badania szybkości transmisji dwutlenku węgla. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 7.

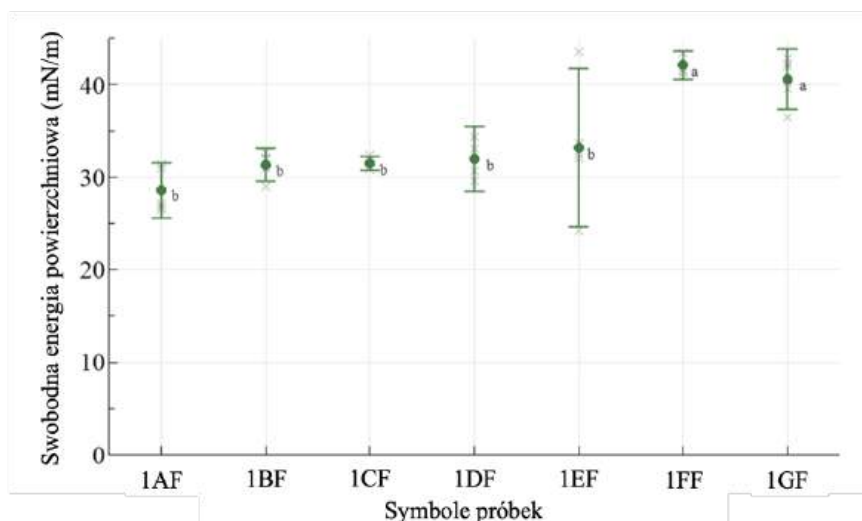


Rycina 7. CO₂TR wyznaczone dla otrzymanych folii o grubości 100 μm.

Badania przepuszczalności dwutlenku węgla przez otrzymane folie na bazie chitozanu wykazały niższe wartości dla transmisji tego gazu niż w przypadku wyników uzyskanych dla tlenu. Dla próbek z dodatkiem nanocelulozy oraz EEP (1FF oraz 1GF) uzyskane wartości mieściły się w zakresie od 1,2 do 2,5 cm³/m²·24h. Wyższe wartości przepuszczalności gazu uzyskane dla próbek z dodatkiem EEP, świadczą o tym, że zastosowanie tego dodatku sprzyja zwiększeniu przepuszczalności gazów. Uzyskane wyniki wykazały, że przepuszczalność dla dwutlenku węgla w przypadku badanych materiałów była niższa niż przepuszczalność dla tlenu opisana powyżej, co jest odwrotnym zjawiskiem niż w powszechnie stosowanych materiałach z tworzywa sztucznego (Schmid i in., 2015).

Swobodna energia powierzchniowa

Badanie swobodnej energii powierzchniowej pozwala na określenie aktywności powierzchniowej badanych folii, a uzyskane wyniki oznaczonego parametru zostały przedstawione na rycinie 8.

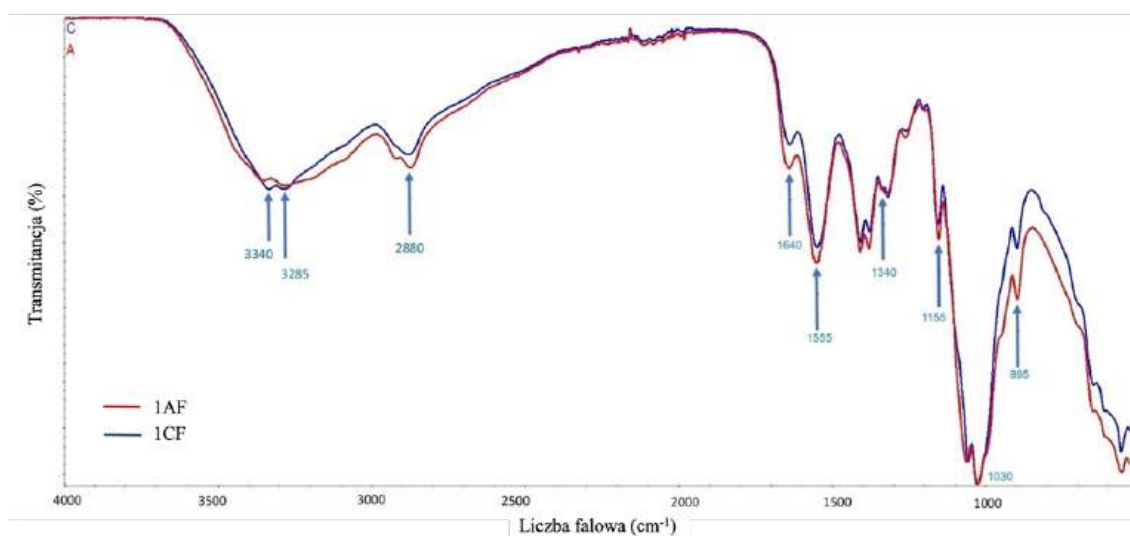


Rycina 8. Wolna energia powierzchniowa wyznaczona dla otrzymanych folii o grubości 100 μm .

Dla wszystkich badanych próbek wartość swobodnej energii powierzchniowej mieściła się w zakresie 28-41 mN/m. Ponadto, wszystkie uzyskane wyniki mieściły się w zakresie wartości swobodnej energii powierzchniowej dla tworzyw sztucznych. Folie z dodatkiem EEP (1FF oraz 1GF), charakteryzowały się wyższą wartością swobodnej energii powierzchniowej, co zostało potwierdzone statystycznie. Dla próbek z dodatkiem nanocelulozy, uzyskane wartości nie różniły się statystycznie.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR)

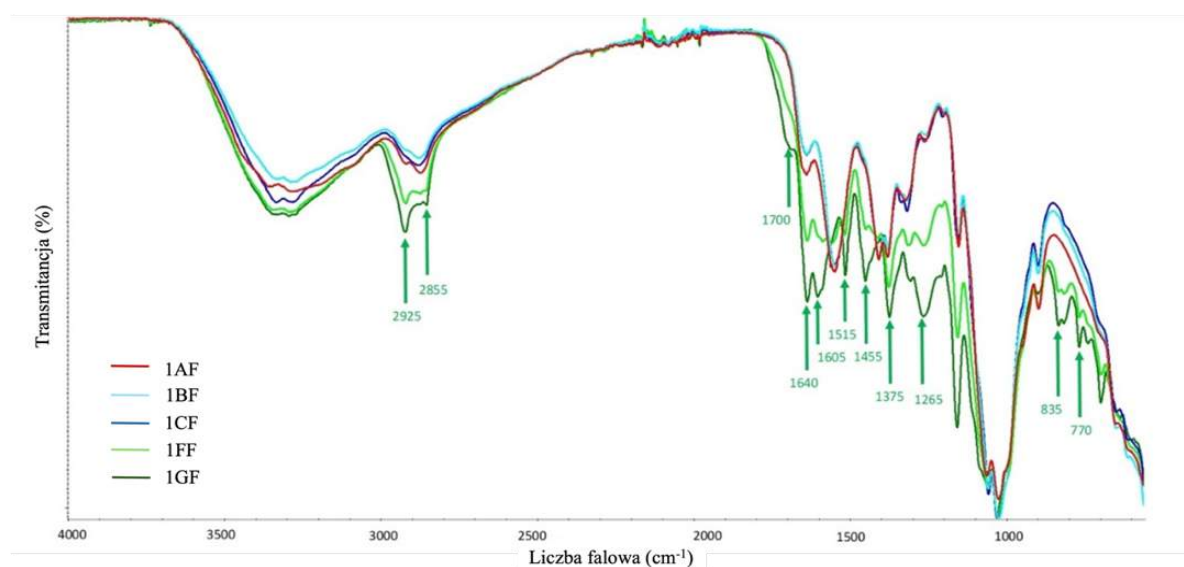
Wyniki analizy spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), uzyskane dla folii bez dodatków (1AF) oraz z dodatkiem nanocelulozy 0,5% (1CF) zostały przedstawione na rycinie 9.



Rycina 9. Widma ATR-FTIR otrzymanych folii chitozanowych: 1AF i 1CF.

W obu widmach ATR-FTIR odnotowano pasma charakterystyczne dla materiałów polisacharydowych. Pasma obserwowane przy 3340 i 3285 cm^{-1} odpowiadają rozciągającym drganiom wiązań N–H i/lub O–H, a także wewnątrzcząsteczkowym wiązaniom wodorowym. Pasma w zakresie 2880 cm^{-1} jest charakterystyczne dla asymetrycznych drgań rozciągających wiązania C–H (Costa i in., 2021). Pasma w zakresie: 1640 i 1555 oraz 1340 cm^{-1} można przypisać odpowiednio drganiom wiązań w amidach I-rzędowych (drgania rozciągające C=O), amidach II-rzędowych (drgań zginających N–H) i amidach III-rzędowych (drgania rozciągające C–N). Natomiast pasma w zakresie: 1155 i 1030 cm^{-1} można przypisać drganiom symetrycznym, rozciągającym wiązania C–O–C (Annu i in., 2021; Costa i in., 2021; Koc i in., 2020). Z kolei pasmo przy 895 cm^{-1} jest charakterystyczne dla wiązań β -glikozydowych w strukturze celulozy (Costa i in., 2021; Da Silva i in., 2018; Moł i in., 2011).

Zastosowanie dodatku EEP do matrycy chitozanowej spowodowało zmiany w strukturze otrzymanych materiałów. Widma ATR-FTIR uzyskane dla folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 10.



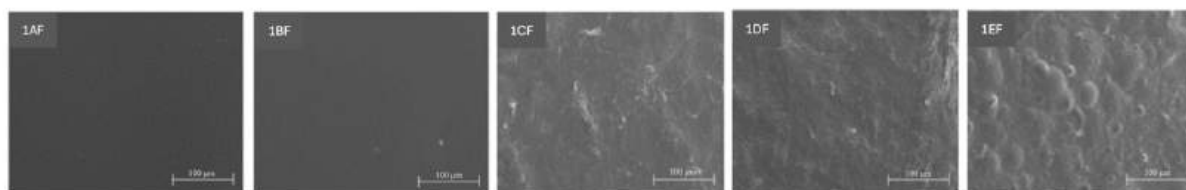
Rycina 10. Widma ATR-FTIR otrzymanych folii chitozanowych: próbki 1AF, 1BF, 1CF, 1FF, 1GF.

Zmiany widoczne w widmach ATR-FTIR są związane głównie z obecnością związków fenolowych występujących w EEP. Pasma w zakresie 2925 i 2855 cm^{-1} można przypisać drganiom rozciągającym wiązania C–H, pochodzącym z grup metylowych i metylenowych. Pasma przy 1700 cm^{-1} wskazują na obecność wiązania C=O, charakterystycznego dla związków chemicznych takich jak fenole, będących składnikami propolisu. Pasma w zakresie 1640 cm^{-1} można przypisać wiązaniom C=O, C=C, N–H obecnych w aminokwasach i flawonoidach. Pasma w zakresie 1515 i 1455 cm^{-1} (C=C) były związane z pierścieniami

aromatycznymi związków fenolowych występujących w propolisie. Z kolei pasma pomiędzy 1300 a 1020 cm^{-1} są charakterystyczne dla drgań rozciągających C–O i zginających C–O, również pochodzących ze składników propolisu, w tym m.in. kwasów karboksylowych, estrów i alkoholi (Da Silva i in., 2018; Moł i in., 2011).

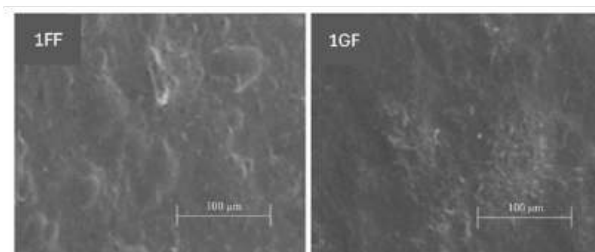
Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

Badaniem wykorzystanym do oceny struktury powierzchni folii było badanie wykonane przy użyciu elektronowej mikroskopii skaningowej. Wyniki tych badań zostały przedstawione na rycinie 11 i 12.



Rycina 11. Obrazy SEM otrzymanych folii chitozanowych, próbki: 1AF-1EF.

Uzyskane obrazy SEM wykazały, że powierzchnia uzyskanych materiałów była gładka, pozbawiona pęknięć i porów, co wskazało na dobrą integralność i jednorodną strukturę folii. Folia pozbawiona dodatków (1AF) oraz próbki z dodatkiem nanocelulozy charakteryzowały się podobną morfologią powierzchni.



Rycina 12. Obrazy SEM otrzymanych próbek folii chitozanowych, próbki: 1FF oraz 1GF.

W przypadku folii chitozanowych z dodatkiem nanocelulozy oraz etanolowego ekstraktu z propolisu EEP (1FF oraz 1GF), jak pokazano na rycinie 12, zaobserwowano zintegrowaną strukturę, ale z wypukłościami, co mogło być związane z obecnością składników pochodzących z dodatku EEP.

Badanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że folia chitozanowa pozbawiona dodatków oraz folie z dodatkiem nanocelulozy nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów testowych (dane nie zostały pokazane w tabeli). Analiza danych literaturowych wykazała zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową folii chitozanowych z dodatkiem nanocelulozy wobec różnych szczepów bakteryjnych – od braku aktywności (Talebi i in., 2022) poprzez aktywność wobec wybranych szczepów bakterii (Costa i in., 2021). Różnice te wynikały z rodzaju zastosowanej nanocelulozy oraz jej stężenia. Wyniki badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej folii z dodatkiem nanocelulozy oraz EEP przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa próbek folii chitozanowych.

Szczep bakterii	Folia 1FF	Folia 1GF
	Strefa inhibicji (mm)	
<i>Bacillus subtilis</i>	16	16
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	17,5

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Zarówno próbka 1FF jak i 1GF wykazały silną aktywność wobec szczepu *L. monocytogenes*, który jest często oznaczany podczas przetwórstwa żywności jak i w samej żywności. Bakterie te mogą tworzyć trudne do usunięcia biofilmy, a zakażenie bakterią *L. monocytogenes* może prowadzić do rozwoju ciężkiej choroby o wysokiej śmiertelności zwanej listeriozą (Park i Kim, 2023). Dlatego uzyskanie materiału o silnym działaniu antybakteryjnym, wobec tego szczepu jest szczególnie istotne z punktu widzenia potencjalnego zastosowania w branży opakowaniowej. Uzyskane materiały wykazały również silne działanie wobec szczepu *B. subtilis*.

Badane folie na bazie chitozanu, EEP oraz nanocelulozy nie wykazywały aktywności względem szczepów bakterii probiotycznych: *L. rhamnosus* oraz *L. plantarum*, co stanowi korzystny wynik w przypadku folii z potencjalnym zastosowaniem do żywności.

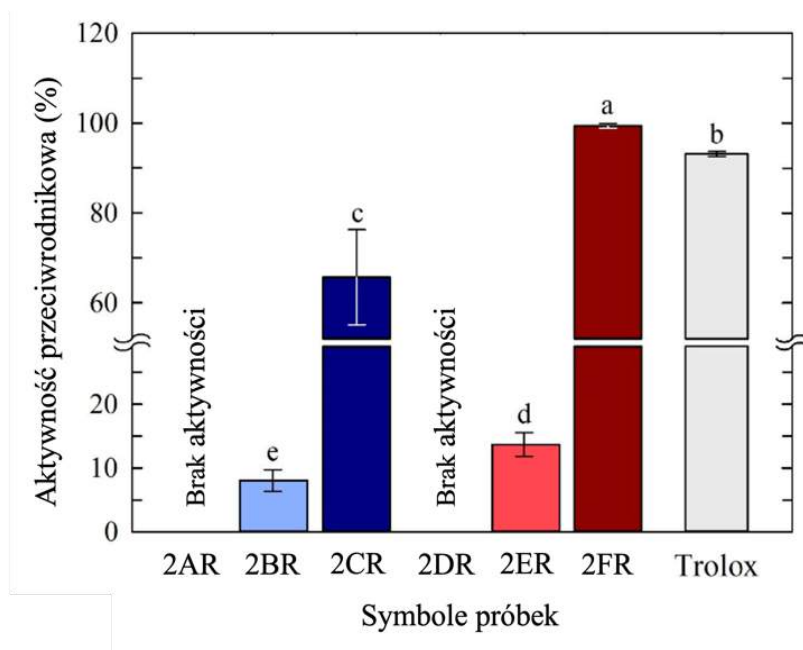
7.2. Charakterystyka folii chitozanowych z dodatkiem kofeiny i EEP

Wyniki uzyskane na tym etapie badań zostały przedstawione w artykule naukowym nr 2. Celem badań było określenie wpływu dodatków, takich jak kofeina, ekstrakt etanolowy z propolisu (EEP) oraz dwóch rozpuszczalników chitozanu – kwasu octowego i cytrynowego – na właściwości otrzymanych folii chitozanowych. Otrzymano sześć roztworów błonotwórczych oraz sześć próbek folii chitozanowych, w tym trzy roztwory otrzymano przy wykorzystaniu kwasu octowego jako rozpuszczalnika chitozanu: 2AR – brak dodatków, 2BR – dodatek kofeiny, 2CR – dodatek kofeiny oraz EEP i trzy rodzaje folii chitozanowych otrzymane z wymienionych roztworów błonotwórczych, które oznaczono symbolami 2AF, 2BF, 2CF. Ponadto, otrzymano roztwory błonotwórcze przy zastosowaniu kwasu cytrynowego jako rozpuszczalnika chitozanu: 2DR – brak dodatków, 2ER – dodatek kofeiny, 2FR – dodatek kofeiny oraz EEP i trzy odpowiadające im rodzaje folii chitozanowych otrzymane z tych roztworów i oznaczone symbolami 2DF, 2EF, 2FF.

7.2.1. Charakterystyka roztworów błonotwórczych

Badanie właściwości przeciwutleniających

Charakterystyka właściwości przeciwutleniających została wykonana z wykorzystaniem analizy aktywności przeciwrodnikowej, a uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 13.



Rycina 13. Aktywność przeciwrodnikowa roztworów błonotwórczych na bazie chitozanu.

Wyniki oceny aktywności przeciwrodnikowej wykazały, że roztwory chitozanu bez dodatków takich jak EEP czy kofeina (2AR i 2DR) nie wykazały aktywności przeciwrodnikowej niezależnie od użytego rozpuszczalnika. Dodanie kofeiny do roztworu chitozanu wpłynęło na pojawienie się aktywności przeciwrodnikowej, natomiast największą aktywnością charakteryzowały się roztwory zawierające zarówno kofeinę jak i EEP (2CR i 2FR), co może wskazywać na ich współdziałanie. Ponadto, roztwór 2FR charakteryzował się wyższą aktywnością niż standardowy przeciwutleniacz – Trolox, co zostało potwierdzone statystycznie. Wysoka aktywność przeciwrodnikowa tego roztworu mogła wynikać z udokumentowanych właściwości przeciwutleniających zastosowanych dodatków – kofeiny, zdolnej do neutralizacji wolnych rodników (Ikram i in., 2020; Nehlig, 2018), oraz etanolowego ekstraktu z propolisu, bogatego w flawonoidy i kwasy fenolowe (Andrade i in., 2017; Martinello i Mutinelli, 2021).

7.2.2. Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych

Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej wobec wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych oraz probiotycznych zostały przedstawione w tabeli 6.

Tabela 6. Aktywność przeciwbakteryjna otrzymanych folii chitozanowych wobec wybranych szczepów bakterii.

Szczep bakterii	Stefa inhibicji (mm)					
	2AF	2BF	2CF	2DF	2EF	2 FF
Szczepy bakterii chorobotwórczych						
<i>Bacillus subtilis</i>	--	--	--	18	18	>28
<i>Enterococcus faecalis</i>	--	--	--	28	28	>28
<i>Listeria monocytogenes</i>	--	--	--	27	27	>28
<i>Staphylococcus aureus</i>	--	--	--	--	18	20
<i>Escherichia coli</i>	--	--	--	22	22	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	--	--	20	19	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	--	--	--	24	19	25
<i>Salmonella enterica</i>	--	--	--	17	17	24
Szczepy bakterii probiotycznych						
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Lactobacillus plantarum</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Lactobacillus paracasei</i>	--	--	--	--	--	--

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Przeprowadzone badania wykazały, że folie chitozanowe charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością wobec szczepów bakterii chorobotwórczych. Folie uzyskane przy użyciu kwasu octowego nie wykazały aktywności wobec żadnego szczepu testowanego w tym badaniu. Folie otrzymane z wykorzystaniem kwasu cytrynowego jako rozpuszczalnika chitozanu, charakteryzowały się szerokim spektrum działania wobec analizowanych szczepów bakterii chorobotwórczych. Strefa inhibicji mieściła się w zakresie między 17 a >28 mm, co oznacza, że folie charakteryzowały się silną aktywnością. Wyjątek stanowiła próbka 2DF, która nie zawierała dodatku kofeiny oraz EEP i nie wykazała aktywności wobec szczepu *S. aureus*. Analiza danych literaturowych wykazała, że etanolowy ekstrakt z propolisu charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus*, *B. subtilis*, *Bacillus cereus* i *E. faecalis*, co przypisuje się wysokiej zawartości związków fenolowych (Almuhayawi, 2020; Przybyłek i Karpiński, 2019). Badania wykazały również skuteczność folii chitozanowych z dodatkiem EEP przeciwko patogennym szczepom, w tym *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *Salomella* Enteritidis, w przeciwieństwie do folii niezawierających tego dodatku (Correa-Pacheco i in., 2019; Rollini i in., 2017; Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016; Stanicka i in., 2021).

Żadna z badanych folii chitozanowych nie wykazała aktywności wobec szczepów bakterii probiotycznych.

Szybkość transmisji pary wodnej (WVTR) oraz tlenu (OTR)

Uzyskane wyniki analizy szybkości transmisji pary wodnej oraz tlenu uzyskane dla folii na bazie chitozanu zostały przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7. Szybkość transmisji pary wodnej oraz tlenu uzyskanych folii chitozanowych.

Symbol folii	WVTR (g/m ² · 24 h)	OTR (cm ³ /m ² · 24 h)
2AF	159,09 ^a ± 0,79	5,3 ^d ± 0,10
2BF	110,91 ^b ± 0,10	6,26 ^c ± 0,04
2CF	80,90 ^c ± 0,88	12,8 ^a ± 0,71
2DF	108,79 ^d ± 0,71	7,7 ^b ± 0,58
2EF	80,91 ^d ± 0,02	3,3 ^e ± 0,61
2FF	77,88 ^e ± 0,83	7,4 ^b ± 0,12

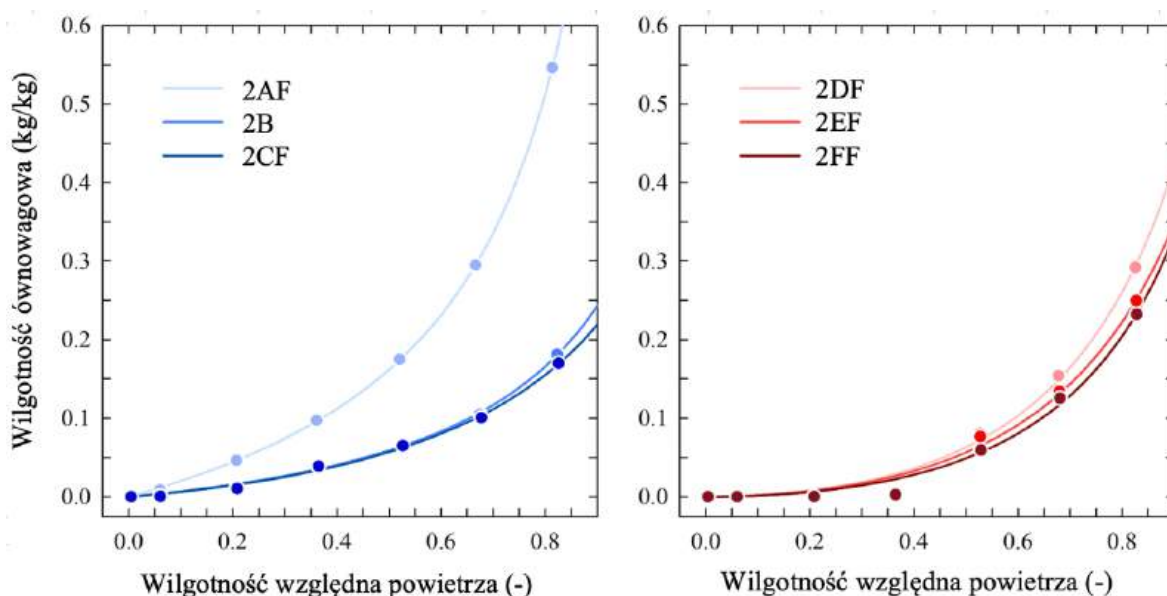
Uzyskane wyniki pokazały, że folie otrzymane przy użyciu kwasu cytrynowego charakteryzowały się niższą wartością WVTR niż te, wytworzone przy użyciu kwasu octowego, co potwierdziła analiza statystyczna. Zastosowanie dodatku kofeiny, a także kofeiny i EEP do matrycy chitozanowej wpłynęło na obniżenie szybkości transmisji pary

wodnej w przypadku obu rozpuszczalników. Analiza danych literaturowych również wykazała, że zastosowanie dodatków takich jak EEP i kofeina wpływa na obniżenie tego parametru (Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016; Stanicka i in., 2021).

Wyniki uzyskane dla badania OTR były zróżnicowane. Najlepszy materiał barierowy dla tlenu stanowiła próbka 2EF, otrzymana przy użyciu kwasu cytrynowego z dodatkiem kofeiny.

Wilgotność równowagowa (EMC) oraz szacowane współczynniki adsorpcji według modelu Guggenheim-DiMarzio-Waters (GDW)

Wyniki badania równowagowej zawartości wilgoci dla otrzymanych folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 14.



Rycina 14. Izotermy adsorpcji folii chitozanowych (kropki oznaczają dane eksperymentalne, linie ciągłe – dopasowanie do modelu sorpcji GDW, temperatura 25 °C).

Uzyskane izotermy adsorpcji wykazały niewielki wzrost EMC poniżej wilgotności względnej powietrza 0,5 oraz znaczny wzrost tej wartości dla zakresu wilgotności względnej powietrza powyżej 0,5. Odnotowano korzystne działanie dodatku kofeiny oraz propolisu na zmniejszenie higroskopijności otrzymanych materiałów. Korzystny wpływ dodatku EEP do matrycy chitozanowej na obniżenie wartości EMC został potwierdzony również w innych danych literaturowych (Stanicka i in., 2021). Wartość EMC dla folii chitozanowej wytworzonej przy użyciu kwasu octowego (2AF) jest wyraźnie wyższa w całym zakresie wilgotności względnej powietrza, natomiast zastosowanie kwasu cytrynowego jako rozpuszczalnika spowodowało redukcję właściwości higroskopijnych otrzymanych folii.

Szacowane współczynniki adsorpcji według modelu GDW dla badanych folii przedstawiono w tabeli 8.

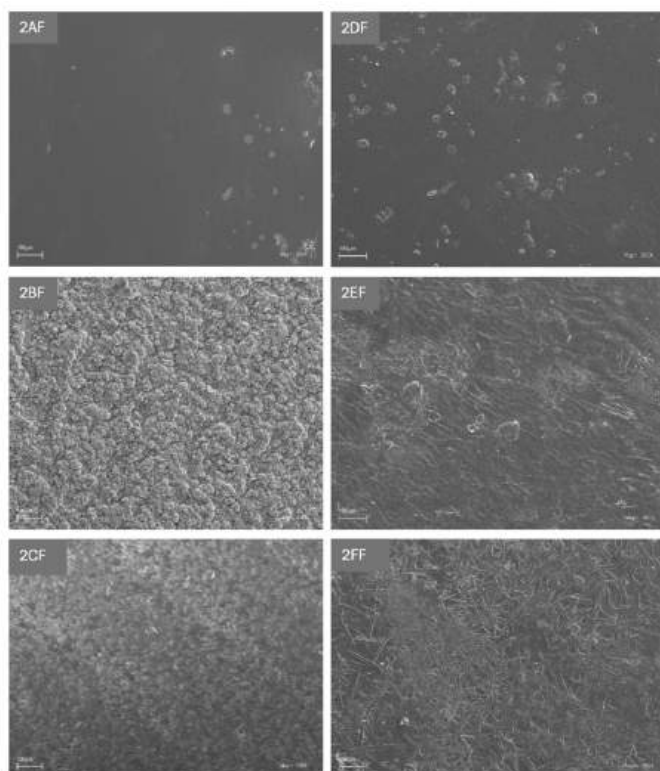
Tabela 8. Szacowane współczynniki adsorpcji według modelu GDW w temp. 25°C dla otrzymanych folii.

Symbol folii	m (kg/kg)	K	k	w	R^2
2AF	0,5609	0,3341	0,9205	1,1920	0,9999
2BF	0,1216	0,5106	0,7994	2,0868	0,9974
2CF	0,0984	0,5612	0,7439	2,7808	0,9967
2DF	0,5419	0,0110	0,8006	30,5221	0,9882
2EF	0,5237	0,0105	0,7632	32,0767	0,9855
2FF	0,4108	0,0102	0,8042	33,5309	0,9892

Zastosowanie dodatku kofeiny oraz kofeiny i EEP do folii chitozanowych wpłynęło na obniżenie wartości parametru m , ograniczając zdolność badanych materiałów do pochłaniania wilgoci. Wartość m wyniosła 0,1216 kg/kg dla wariantu z kofeiną (2BF) oraz 0,0984 kg/kg dla wariantu z dodatkiem kofeiny i EEP (2CF), co stanowiło odpowiednio 21,7% i 17,5% wartości dla folii chitozanowej z kwasem octowym, gdzie wartość m wyniosła 0,5609 kg/kg (2AF).

Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

Badania struktury powierzchni folii chitozanowych zostały wykonane za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 15.

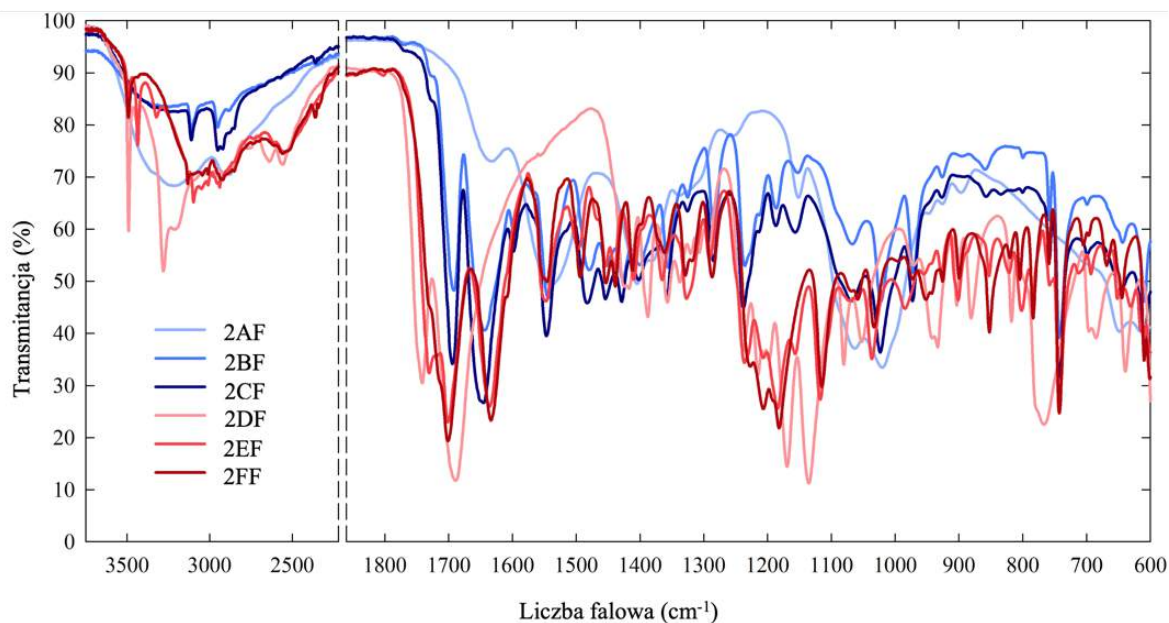


Rycina 15. Zdjęcia SEM otrzymanych folii chitozanowych.

Badania wykazały, że folie chitozanowe bez dodatków, charakteryzowały się gładką strukturą powierzchni, co świadczy o dużej dyspersji chitozanu w obu rozpuszczalnikach oraz o integralności strukturalnej obu układów. W przypadku zastosowanych dodatków, ich obecność spowodowała pojawienie się na powierzchni folii skupisk o nierównomiernej wielkości.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR)

W celu identyfikacji grup funkcyjnych w otrzymanych materiałach wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), a uzyskane widma zostały przedstawione na rycinie 16.



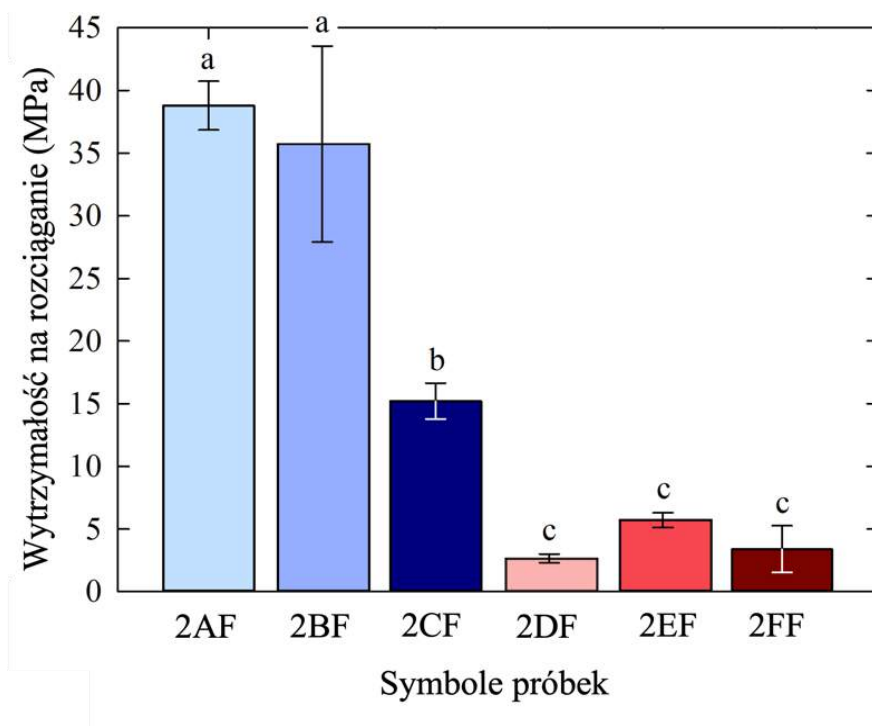
Rycina 16. Widma ATR-FTIR otrzymanych folii chitozanowych.

Uzyskane widma ATR-FTIR otrzymanych folii chitozanowych z dodatkami, wykazały różną intensywność transmitancji przy niektórych pasmach, były jednak zbliżone do widm folii chitozanowych bez dodatków. Pasma w zakresie $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ i 2880 cm^{-1} są związane z obecnością drgań wiązań O–H i alifatycznymi drganiami rozciągającymi wiązaniami C–H. Pasma w zakresie 1650 , 1557 i 1371 cm^{-1} można przypisać rozciągającym drganiom wiązania C–O w amidzie I-rzędowym, zginającym N–H w amidzie II-rzędowym i rozciągającym C–N w amidzie III-rzędowym. Pasma przy 1025 cm^{-1} przypisuje się drganiom rozciągającym wiązania C–O w alkoholach (Ashrafi i in., 2018; Correa-Pacheco i in., 2019; Siripatrawan i Vitthayakitti, 2016). Widma ATR-FTIR folii na bazie chitozanu i kofeiny wykazały pasma przypisane cząsteczce kofeiny, występujące przy 1700 i 1650 cm^{-1} charakterystyczna dla drgań rozciągającym wiązania C=O dla amidu I-rzędowego, 1550 i 765 cm^{-1} przypisane drganiom rozciągającym wiązań N–H i/lub C–N amidu II-rzędowego (Gunasekaran i in., 2005; Morrish i in., 2022). Ponadto, widma ATR-FTIR folii z dodatkiem kofeiny i EEP wykazały charakterystyczne pasma pochodzące od składników propolisu, głównie związków fenolowych. Pasma przy wartościach 2924 i 2850 cm^{-1} przypisane są drganiom rozciągającym C–H, co potwierdza obecność długołańcuchowych związków alkilowych w EEP. Pasma przy wartości 1732 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym C–O. Pasma charakterystyczne dla drgań rozciągających i zginających przy wartościach 1634 , 1515 i 1451 cm^{-1} można przypisać głównie pierścieniom aromatycznym związków fenolowych. Ponadto, obecność szerokiego pasma w zakresie 3420 cm^{-1} , odpowiadającego drganiom rozciągającym wiązania O–H, również potwierdziło obecność związków

fenolowych pochodzących z EEP (Correa-Pacheco i in., 2019; Moł i in., 2011; Wu i in., 2008).

Wytrzymałość na rozciąganie (TS)

W celu oceny właściwości mechanicznych otrzymanych folii chitozanowych, przeprowadzono analizę wytrzymałości na rozciąganie, a uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 17.

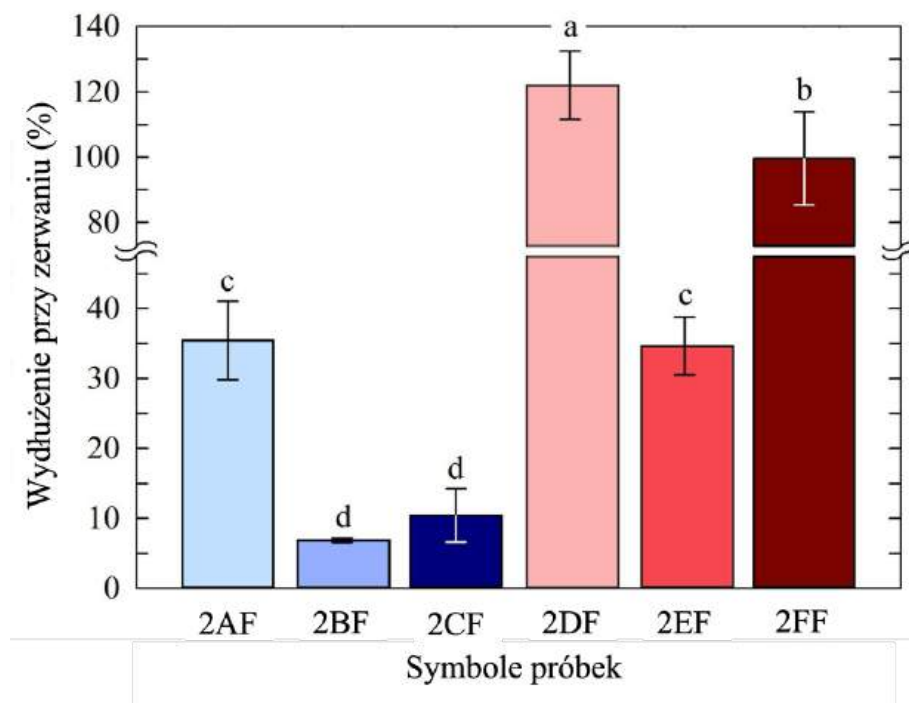


Rycina 17. Wytrzymałość na rozciąganie wyznaczone dla otrzymanych folii chitozanowych.

Badania wykazały, że folie chitozanowe otrzymane przy użyciu kwasu octowego jako rozpuszczalnika chitozanu charakteryzowały się znacznie wyższą wartością wytrzymałości na rozciąganie w porównaniu z foliami otrzymanymi przy użyciu kwasu cytrynowego jako rozpuszczalnika, co zostało potwierdzone statystycznie. Najwyższe wartości odnotowano dla próbek 2AF (38,80 MPa) oraz 2BF (35,73 MPa), a różnica pomiędzy nimi nie była statystycznie istotna. W przypadku zastosowania dodatku zarówno kofeiny jak i EEP do matrycy chitozanowych otrzymanych przy użyciu kwasu octowego odnotowano znaczny spadek wartości TS.

Wydłużenie przy zerwaniu (EB)

Istotnym parametrem opisującym właściwości mechaniczne uzyskanych materiałów jest również wydłużenie przy zerwaniu. Uzyskane wyniki dla tego parametru zostały przedstawione na rycinie 18.



Rycina 18. Wydłużenie przy zerwaniu otrzymanych folii chitozanowych.

W przypadku wydłużenia przy zerwaniu, uzyskane wyniki pokazały, że folie otrzymane przy użyciu kwasu cytrynowego charakteryzowały się wyższą wartością EB, w porównaniu z foliami otrzymanymi z wykorzystaniem kwasu octowego. W przypadku obu rozpuszczalników można było zaobserwować, że folie bez dodatków charakteryzowały się najwyższymi wartościami EB, a zastosowanie dodatków spowodowało obniżenie tych wartości, co potwierdza analiza statystyczna. W obu przypadkach dodatek zarówno kofeiny jak i EEP pozwolił na uzyskanie nieco wyższych wartości EB niż sama kofeina, jednak były one niższe niż w przypadku folii bez dodatków. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które wykazały, że rodzaj użytego rozpuszczalnika – roztworu kwasu wpłynął na parametry mechaniczne otrzymanych folii. Kwasy z większą zawartością grup karboksylowych mogą zwiększać wartość EB poprzez sieciowanie jonowe. Zwiększona ruchliwość łańcuchów oraz zmniejszenie sił międzycząsteczkowych spowodowały wzrost wydłużenia przy zerwaniu i spadek wytrzymałości na rozciąganie badanych folii otrzymanych z wykorzystaniem kwasu cytrynowego (Zhang i in., 2022).

7.3. Charakterystyka folii chitozanowych otrzymanych z wykorzystaniem naturalnych rozpuszczalników – octów owocowych

Wyniki uzyskane na tym etapie badań zostały przedstawione w publikacji nr 3. W ramach tego etapu powszechnie stosowane rozpuszczalniki chitozanu, tj. roztwory kwasów organicznych, zastąpiono naturalnymi octami owocowymi. Oceniono wpływ tych rozpuszczalników na właściwości roztworów błonotwórczych oraz otrzymanych folii chitozanowych. Do analizy przygotowano łącznie dziewięć próbek – trzy z wykorzystaniem octu jabłkowego, o symbolach: 3A – rozpuszczalnik, 3AR – roztwór błonotwórczy, 3AF – folia chitozanowa, trzy z octem z czarnej porzeczki, o symbolach odpowiednio: 3B, 3BR, 3BF oraz trzy z octem wiśniowym, o symbolach odpowiednio: 3C, 3CR, 3CF.

7.3.1. Charakterystyka naturalnych rozpuszczalników oraz roztworów błonotwórczych chitozanu

Wartość pH

Zbadano wartość pH octów owocowych oraz kwasu octowego – parametru niezwykle istotnego w procesie otrzymywania folii chitozanowych, a wyniki przedstawiono w tabeli 9.

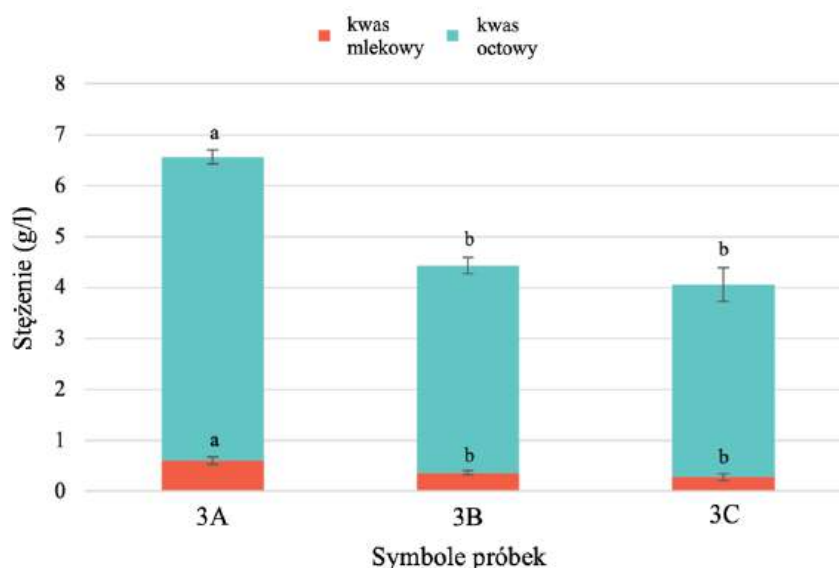
Tabela 9. Wartość pH octów owocowych.

Symbol rozpuszczalnika	Wartość pH
3A	3,6
3B	3,5
3C	3,6
kwas octowy 3%	5,5

Octy użyte w badaniu charakteryzowały się następującymi wartościami pH: 3,6 dla octu jabłkowego, 3,5 dla octu z czarnej porzeczki oraz 3,6 dla octu wiśniowego. Z kolei wartość pH kwasu octowego o stężeniu 3% wynosiła 5,5, co wskazuje, że testowane octy owocowe były bardziej kwaśne. Jak wykazano w literaturze, pH octu jabłkowego wahało się od 3,1 do 4,7 w zależności od odmiany jabłek użytych w procesie fermentacji, a także metody produkcji (Hasan i in., 2021; Kara i in., 2021a). W przypadku octu wiśniowego wartość pH oscylowała między 2,7 a 3,2 (Özen i in., 2020), różnice te mogły wynikać z użytego surowca jak i metody produkcji.

Zawartość kwasów organicznych

W octach owocowych: jabłkowym, z czarnej porzeczki oraz wiśniowym, wykorzystanych jako rozpuszczalniki chitozanu oznaczono stężenie kwasu octowego oraz kwasu mlekowego, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 19.



Rycina 19. Stężenie kwasu octowego i mlekowego w octach owocowych.

We wszystkich badanych octach owocowych dominował kwas octowy, a jego najwyższe stężenie wynoszące 5,96 g/l oznaczono w occie jabłkowym (3A), co zostało potwierdzone statystycznie. Wartość ta była jednak niższa niż ta, która została oznaczona przez Adımcılar i in. (2023) i Yildiz (2023). Z kolei zawartość kwasu mlekowego wahała się od 0,28 g/l dla octu wiśniowego (3C) do 0,61 g/l dla octu jabłkowego (3A). Dane literaturowe wykazały, że kwas mlekowy oraz octowy stanowiły łącznie ponad 70% wszystkich oznaczonych kwasów organicznych w octach owocowych, a ich ilość zmieniała się w zależności od procesu fermentacji oraz zastosowanego surowca (Luzón-Quintana i in., 2021; Ren i in., 2017).

Całkowita zawartość związków fenolowych (TPC) i flawonoidów (TFC)

Związki fenolowe i flawonoidy stanowią źródło substancji bioaktywnych w octach owocowych, dlatego w badanych octach oznaczono ich zawartość, a wyniki przedstawiono w Tabeli 10

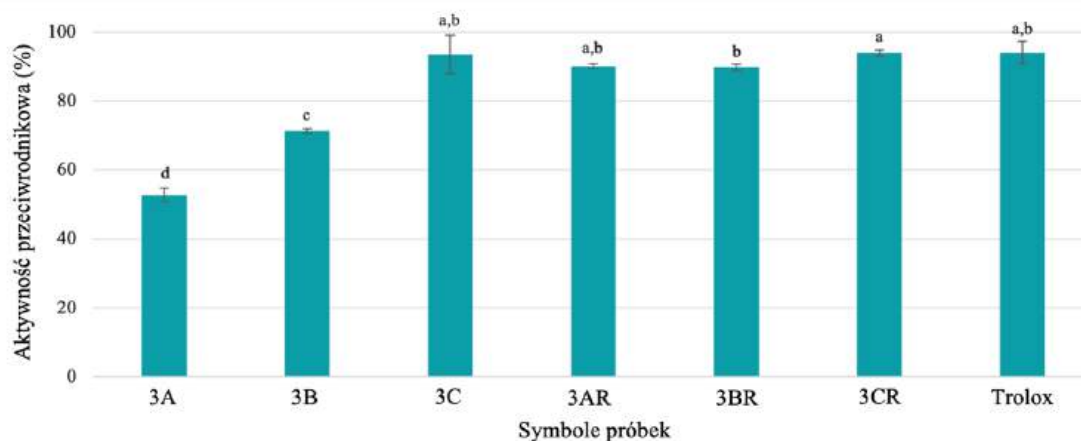
Tabela 10. Całkowita zawartość związków fenolowych i flawonoidów.

Symbol rozpuszczalnika naturalnego	TPC ($\mu\text{g GAeq/ml}$)	TFC ($\mu\text{g Qeq/ml}$)
3A	$360^a \pm 28$	$6,31^c \pm 0,14$
3B	$260^b \pm 18$	$11,03^b \pm 0,11$
3C	$210^c \pm 13$	$14,38^a \pm 0,08$

Wykorzystane w badaniach octy owocowe, różniły się one całkowitą zawartością fenoli i flawonoidów, co zostało potwierdzone statystycznie. Najwyższą całkowitą zawartość związków fenolowych odnotowano dla octu jabłkowego (3A), która wynosiła 360 µg GAeq/ml (wyniki wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego w ml roztworu octu), następnie dla octu porzeczkowego (3B) – 260 µg GAeq/ml i wiśniowego (3C) – 210 µg GAeq/ml. Pod względem całkowitej zawartości flawonoidów, ocet wiśniowy charakteryzował się najwyższą zawartością, która wynosiła 14,38 µg Qeq/ml (wyniki wyrażono jako µg kwercetyny w ml roztworu octu), następnie ocet z czarnej porzeczki (11,03 µg Qeq/ml) i ocet jabłkowy (6,31 µg Qeq/ml). Zgodnie z literaturą, na zawartość związków fenolowych i flawonoidów w octach mogą wpływać różne czynniki, takie jak przebieg fermentacji alkoholowej lub octowej, metoda fermentacji i jej długość, a także rodzaj i odmiana użytego surowca (Kara i in., 2021b).

Właściwości przeciwutleniające

Właściwości przeciwutleniające stosowanych octów owocowych oraz roztworów błonotwórczych chitozanu zostały określone na drodze oceny ich aktywności przeciwrodnikowej oraz zdolności chelatowania jonów Fe²⁺. Wyniki aktywności przeciwrodnikowej zostały przedstawione na rycinie 20.

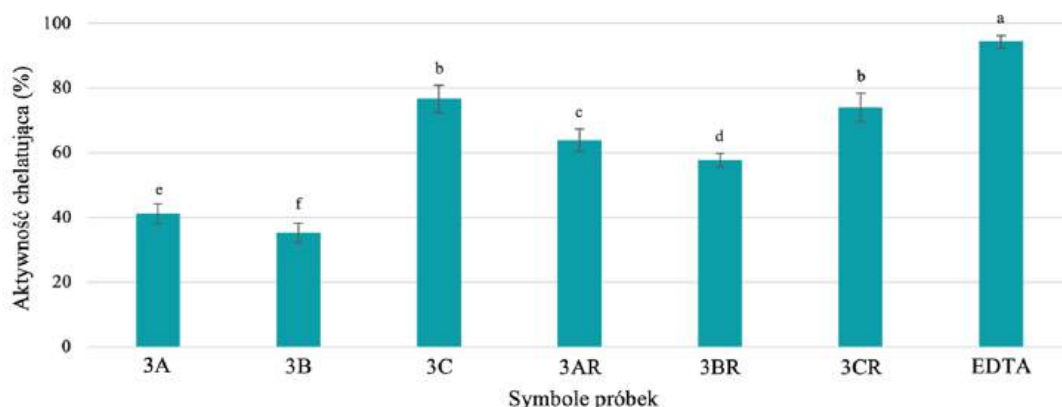


Rycina 20. Aktywność przeciwrodnikowa rozpuszczalników (3A-3C), roztworów błonotwórczych (3AR-3CR) oraz standardu – Trolox.

Aktywność przeciwrodnikowa rozpuszczalników, była uzależniona od rodzaju surowca z jakiego został wykonany dany ocet owocowy, co zostało potwierdzone analizą statystyczną. Najwyższą aktywność wynoszącą 93,54% wykazał ocet wiśniowy (3C), co może być związane z wysoką zawartością flawonoidów w tym occie owocowym. Aktywność przeciwrodnikowa oznaczona dla octu wiśniowego oraz roztworu błonotwórczego

wytworzonego przy jego użyciu (3CR) nie różniła się statystycznie w porównaniu ze standardowo wykorzystywanym przeciwutleniaczem jakim jest Trolox, co świadczy o wysokiej aktywności przeciwrodnikowej. W przypadku próbek roztworów błonotwórczych otrzymanych przy użyciu octu jabłkowego (3AR) oraz z czarnej porzeczki (3BR), obecność chitozanu wpłynęła na zwiększenie aktywności w porównaniu z samymi rozpuszczalnikami (3A i 3B), co zostało potwierdzone statystycznie. Badania przeprowadzone przez Adimiclar i in. (2023) wykazały, że roztwory błonotwórcze chitozanu wytworzone z użyciem octów owocowych jako rozpuszczalników charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwrodnikową niż te, uzyskane przy użyciu kwasu octowego, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami badań przedstawionymi w podrozdziale 7.2.1. (rycina 13), które wykazały, że roztwór błonotwórczy chitozanu nie wykazywał aktywności przeciwrodnikowej.

Wyniki badania zdolności chelatowania jonów żelaza Fe^{2+} badanych rozpuszczalników oraz roztworów błonotwórczych zostały przedstawione na rycinie 21.



Rycina 21. Aktywność chelatująca rozpuszczalników (3A-3C), roztworów błonotwórczych (3AR-3CR) oraz standardu – EDTA.

Jak wskazują dane przedstawione na rycinie 21 naturalne rozpuszczalniki oraz roztwory błonotwórcze uzyskane przy ich zastosowaniu wykazały zdolność chelatowania jonów żelaza, jednak była ona niższa niż w przypadku standardu – EDTA. Podobnie jak w badaniach aktywności przeciwrodnikowej, najwyższą zdolność chelatowania Fe^{2+} (76,64%) odnotowano dla octu wiśniowego oraz kolejno dla roztworu błonotwórczego wytworzonego przy jego użyciu, która wynosiła 74,00%. W przypadku octu jabłkowego oraz z czarnej porzeczki, obecność chitozanu zwiększyła zdolność chelatowania Fe^{2+} , co zostało potwierdzone statystycznie. Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, że naturalne rozpuszczalniki jakimi są octy owocowe oraz roztwory błonotwórcze chitozanu otrzymane

przy ich użyciu charakteryzowały się aktywnością przeciwutleniającą, potwierdzoną aktywnością przeciwrodnikową oraz zdolnością chelatowania Fe^{2+} , co jest zgodne z danymi literaturowymi (Bakir i in., 2017; Liu i in., 2019).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa rozpuszczalników oraz roztworów błonotwórczych wobec wybranych szczepów bakterii, zarówno chorobotwórczych, jak i probiotycznych oraz względem *Candida albicans* została przedstawiona w tabeli 11.

Tabela 11. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa rozpuszczalników naturalnych (3A-3C) oraz roztworów błonotwórczych (3AR-3CR) wobec wybranych szczepów.

Symbol roztworu	Szczep wskaźnikowy									
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida albicans</i>
3A	20	22	14	15	24	>28	>28	0	0	13
3B	18	23	15	18	24	>28	28	0	0	11
3C	18	18	15	16	20	>28	18	0	0	11
3AR	14	0	16	18	14	>28	23	0	0	11
3BR	14	0	16	16	14	>28	18	0	0	12
3CR	14	0	16	16	14	>28	22	0	0	12

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane octy owocowe (3A-3C) charakteryzowały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową przeciwko wszystkim testowanym szczepom patogennych mikroorganizmów. Octy owocowe wykazały silniejsze działanie wobec bakterii Gram-ujemnych niż wobec bakterii Gram-dodatnich. Najwyższą aktywność zaobserwowano przeciwko *P. aeruginosa*, ze strefami inhibicji przekraczającymi 28 mm dla wszystkich testowanych octów. Innym szczepem, przeciwko któremu odnotowano

wysoką aktywność, był *S. Enteritidis*, z najwyższą aktywnością odnotowaną dla octu jabłkowego, powyżej 28 mm strefy inhibicji, następnie dla octu z czarnej porzeczki ze strefą inhibicji 28 mm i octu wiśniowego ze strefą inhibicji 18 mm. Zaobserwowano również wysoką aktywność względem *E. coli*, ze strefami inhibicji o średnicy od 20 do 24 mm. Dane literaturowe wskazują, że ocet owocowy skutecznie hamuje również wzrost szczepów patogennych takich jak *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, czy *Candida tropicalis* (Bakir i in., 2017; Ousaaïd i in., 2021).

W przypadku szczepu *P. aeruginosa* wszystkie roztwory błonotwórcze wytworzone przy użyciu octów owocowych (3AR-3CR) zachowały swoją aktywność, a oznaczona strefa zahamowania przekraczała 28 mm. W przypadku szczepu *L. monocytogenes* strefa zahamowania wzrosła do 16 mm dla wszystkich próbek roztworów błonotwórczych w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla samych octów owocowych.

7.3.2. Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Wyniki badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych oraz probiotycznych oraz względem *C. albicans* uzyskane dla folii chitozanowych zostały przedstawione w tabeli 12.

Tabela 12. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa folii chitozanowych.

Szczep wskaźnikowy										
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>C. albicans</i>
Symbol folii	Strefa inhibicji (mm)									
3AF	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0
3BF	0	0	0	0	11,5	19	11	0	0	0
3CF	20	0	19	20	24	28	11	0	0	0

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Badania wykazały, że uzyskane folie charakteryzowały się najwyższą aktywnością wobec szczepu *P. aeruginosa*. Największą strefę inhibicji wynoszącą 28 mm odnotowano dla

folii chitozanowej wytworzonej przy użyciu octu wiśniowego (3CF). Folia otrzymana przy użyciu octu wiśniowego wykazała również najszersze spektrum aktywności przeciwko testowanym szczepom patogennym. Żadna z testowanych folii nie wykazała aktywności przeciwko *E. faecalis* i *C. albicans*, pomimo faktu, że rozpuszczalniki wykazały taką aktywność. W badaniach przeprowadzonym przez Adımcılar i in. (2023), gdzie aktywność przeciwdrobnoustrojowa została wyrażona jako logarytmiczna redukcja liczby żywych mikroorganizmów, odnotowano, że w przypadku szczepu *S. aureus*, folie otrzymane z wykorzystaniem kwasu octowego jako rozpuszczalnika chitozanu charakteryzowały się niższą aktywnością przeciwbakteryjną, w porównaniu z tymi otrzymanymi przy użyciu octu owocowego. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku szczepu *E. coli*.

Wytrzymałość na rozciąganie (TS) oraz wydłużenie przy zerwaniu (EB)

W celu oceny parametrów mechanicznych otrzymanych folii oznaczono ich wytrzymałość na rozciąganie oraz wydłużenie przy zerwaniu, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabeli 13.

Tabela 13. Wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu otrzymanych folii chitozanowych.

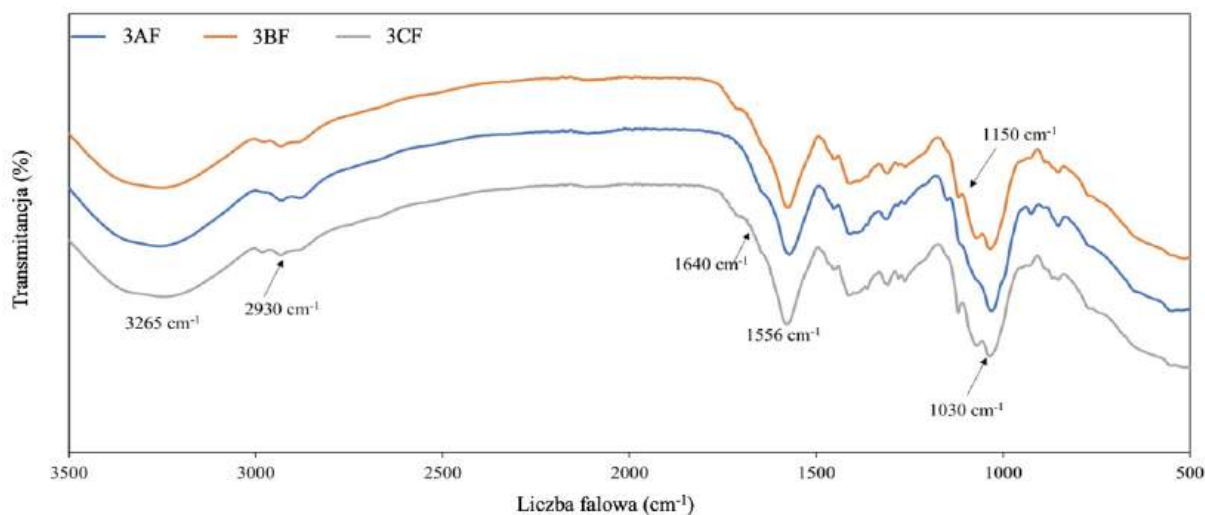
Symbol folii	TS (MPa)	EB (%)
3AF	3,97 ^b ± 0,18	48,48 ^c ± 1,06
3BF	3,82 ^b ± 0,33	70,58 ^a ± 1,19
3CF	4,93 ^a ± 0,63	51,07 ^b ± 0,54

W przypadku wytrzymałości na rozciąganie uzyskane wartości mieściły się w zakresie 3,97 (3AF), a 4,93 MPa (3CF). Uzyskane wartości były niższe niż dla folii wytworzonych przy użyciu 3% kwasu octowego (które zostały opisane w podrozdziale 7.2.2.), który stanowi powszechnie stosowany rozpuszczalnik i został wykorzystany we wcześniejszym etapie badań.

Wartość wydłużenia przy zerwaniu oznaczona dla badanych folii różniła się w zależności od użytego rozpuszczalnika chitozanu, co zostało potwierdzone statystycznie, a wartość tego parametru mieściła się w zakresie 48,48 (3AF) – 70,58% (3BF). W porównaniu z foliami wytworzonymi przy użyciu 3% kwasu octowego (rycina 4), uzyskane wartości były wyższe. Badania dotyczące wpływu zastosowanego rozpuszczalnika na parametry otrzymanych folii chitozanowych wykazały, że folie chitozanowe na bazie kwasu jabłkowego, mlekowego i cytrynowego charakteryzowały się większą elastycznością niż folie chitozanowe z kwasem octowym (Park i in., 2002).

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR)

Wykonano widma badanych materiałów za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 22.

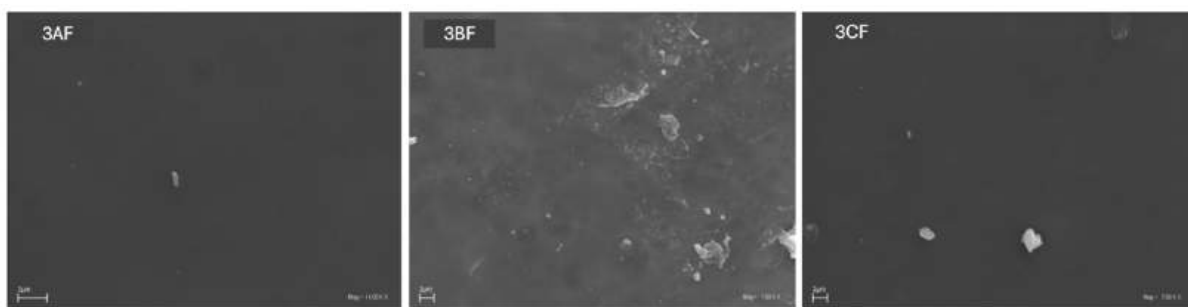


Rycina 22. Widma ATR-FTIR otrzymanych folii.

W widmach ATR-FTIR folii chitozanowych widoczne są pasma w zakresach charakterystycznych dla chitozanu. Pasma zaobserwowane przy 3265 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym wiązania N–H nakładającym się z drganiami rozciągającymi wiązania O–H, a pasmo przy 2930 cm^{-1} odpowiada asymetrycznym drganiom rozciągającym wiązania C–H. Pasma obecne przy 1640 i 1556 cm^{-1} wskazują odpowiednio na obecność amidu I-rzędowego (drgania rozciągające C=O), amidu II-rzędowego (drgania zginające N–H) i amidu III-rzędowego (drgania rozciągające C–N). Pasma w zakresie 1150 i 1030 cm^{-1} są związane odpowiednio z drganiami symetrycznymi, rozciągającymi wiązania C–O–C i drganiami rozciągającymi C–O (Adımcılar i in., 2023; Costa i in., 2021). Widma ATR-FTIR wykazały, że wykorzystanie octów owocowych podczas otrzymywania folii chitozanowych nie spowodowało istotnych zmian w strukturze chemicznej matrycy chitozanowej, co potwierdzają również dane literaturowe (Adımcılar i in., 2023).

Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

Badanie strukturalne folii chitozanowych zostało wykonane za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 23.



Rycina 23. Obrazy SEM folii chitozanowych.

Analiza obrazów SEM przedstawiających strukturę i morfologię folii chitozanowych wykazała występowanie gładkich powierzchni dla wszystkich badanych folii, co wskazuje na dobrą dyspersję chitozanu w octach owocowych.

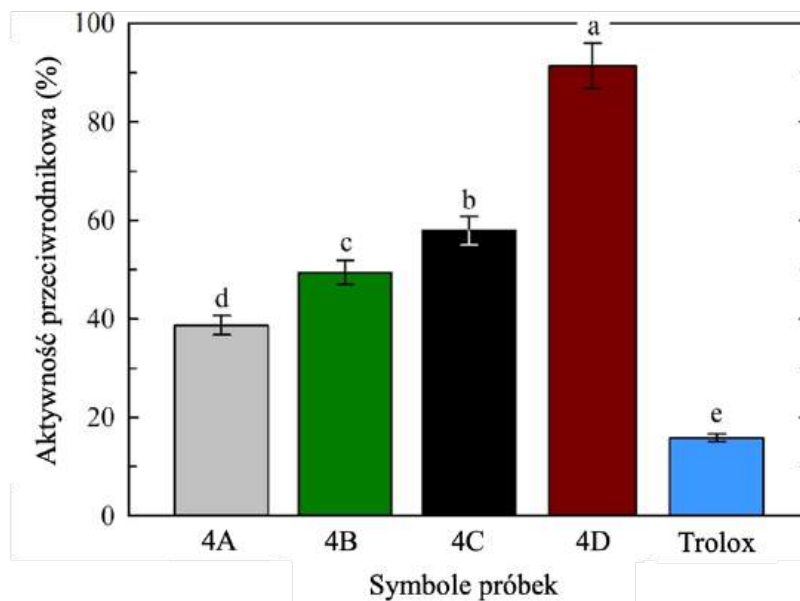
7.4. Charakterystyka folii chitozanowych otrzymanych z wykorzystaniem kombuchy

Wyniki uzyskane na tym etapie badań zostały przedstawione w artykule naukowym nr 4. W ramach tego etapu powszechnie stosowane rozpuszczalniki chitozanu, tj. roztwory kwasów organicznych zastąpiono czterema rodzajami kombuchy. W badaniach oceniono wpływ tych rozpuszczalników na właściwości roztworów błonotwórczych oraz otrzymanych z tych roztworów folii chitozanowych. Do analizy przygotowano łącznie dwanaście próbek – trzy z zastosowaniem kombuchy na bazie białej herbaty, o symbolach: 4A – rozpuszczalnik, 4AR – roztwór błonotwórczy, 4AF – folia chitozanowa, trzy z wykorzystaniem kombuchy na bazie zielonej herbaty, o symbolach: 4B, 4BR, 4BF, trzy z zastosowaniem kombuchy na bazie czarnej herbaty, o symbolach: 4C, 4CR, 4CF oraz trzy z wykorzystaniem kombuchy otrzymane z kawy, o symbolach: 4D, 4DR, 4DF.

7.4.1. Charakterystyka roztworów kombuchy

Właściwości przeciwrodnikowe

Właściwości przeciwrodnikowe kombuchy zostały oznaczone w teście DPPH, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 24.



Rycina 24. Aktywność przeciwrodnikowa roztworów kombuchy oraz standardu – Trolox.

Badane roztwory kombuchy uzyskane z białej, zielonej i czarnej herbaty oraz kawy wykazały wysoką aktywność przeciwrodnikową – wszystkie roztwory wykazały ponad dwukrotnie wyższą aktywność niż Trolox (16%) stosowany jako standardowy przeciwutleniacz. Aktywność przeciwrodnikowa roztworów wahała się od 39% dla kombuchy uzyskanej z białej herbaty (4A) do 91% dla kombuchy na bazie kawy (4A). Roztwory kombuchy charakteryzowały się różną aktywnością, w zależności od rodzaju herbaty użytej w procesie ich produkcji, co zostało potwierdzone statystycznie. Analiza danych literaturowych wykazała, że roztwory kombuchy uzyskane w wyniku fermentacji różnych odmian herbat charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwrodnikową w teście DPPH, a zróżnicowana aktywność poszczególnych roztworów wynikała z rodzaju użytego surowca, źródła energii wykorzystywanego przez mikroorganizmy odpowiedzialne za fermentację oraz czasu jej prowadzenia (Tanticharakunsiri i in., 2021; Vohra i in., 2019).

Zawartość związków fenolowych w roztworach kombuchy

Stężenie flawonoidów oraz kwasów aromatycznych w roztworach kombuchy oznaczono metodą ultrasprawną chromatografię cieczą (UPLC), a uzyskane poziomy stężeń przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Stężenie związków fenolowych w roztworach kombuchy.

Związek chemiczny (µg/ml)	4A	4B	4C	4D
Katechina	5,21 ^c ± 0,13	28,64 ^a ± 0,57	6,31 ^b ± 0,32	--
Epikatechina	8,39 ^c ± 0,24	61,81 ^a ± 0,29	10,06 ^b ± 0,19	--
Kwercetyna	5,21 ^c ± 0,13	5,74 ^a ± 0,17	4,13 ^b ± 0,13	--
Kemferol	5,70 ^c ± 0,49	23,83 ^a ± 1,19	11,08 ^b ± 0,20	--
Kwas kawowy	--	--	--	73,79 ± 2,42
Kwas synapowy	--	--	--	4,15 ± 0,07
Kwas kumarowy	--	3,40 ^b ± 0,15	--	4,67 ^a ± 0,07
Kwas hydroksycynamonowy	--	2,43 ^b ± 0,13	--	3,24 ^a ± 0,14
Kwas ferulowy	--	--	--	1,48 ± 0,33
Σoznaczanych związków	24,51	125,85	31,58	87,33

-- zawartość poniżej granicy wykrywalności UPLC.

Wszystkie roztwory kombuchy otrzymane na bazie herbat (4A-4C) zawierały flawonoidy (katechinę, epikatechinę, kwercetynę i kemferol), w przeciwieństwie do roztworu kombuchy na bazie kawy (4D), który nie zawierał tych flawonoidów, a jedynie kwasy aromatyczne: kawowy, synapowy, kumarowy, ferulowy i hydroksycynamonowy. Ponadto kombucha na bazie zielonej herbaty (4B) zawierała kwasy kumarowy i hydroksycynamonowy. Najwyższą całkowitą zawartością oznaczanych związków fenolowych (125,85 µg/ml) charakteryzowała się kombucha otrzymana w wyniku fermentacji herbaty zielonej. Dane literaturowe potwierdzają wysoką zawartość związków fenolowych w tym katechiny, kemferolu i glikozydów kwercetyny w zielonej herbacie (Lorenzo i Munekata, 2016). Dane literaturowe wskazują, że zawartość związków fenolowych w roztworach kombuchy zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym związana jest zarówno z rodzajem herbaty jak i obszarem geograficznym z jakiego została pozyskana (Chan i in., 2011; Khokhar i Magnusdottir, 2002).

Właściwości przeciwbakteryjne

Aktywność przeciwbakteryjna roztworów kombuchy wobec wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych oraz probiotycznych zostały przedstawione w tabeli 15.

Tabela 15. Aktywność przeciwbakteryjna roztworów kombuchy.

Szczep wskaźnikowy							
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Symbol kombuchy	Strefa inhibicji (mm)						
4A	--	--	--	--	16	22	--
4B	--	--	--	--	15	15	--
4C	--	--	--	17	14	21	--
4D	--	--	--	--	--	19	--

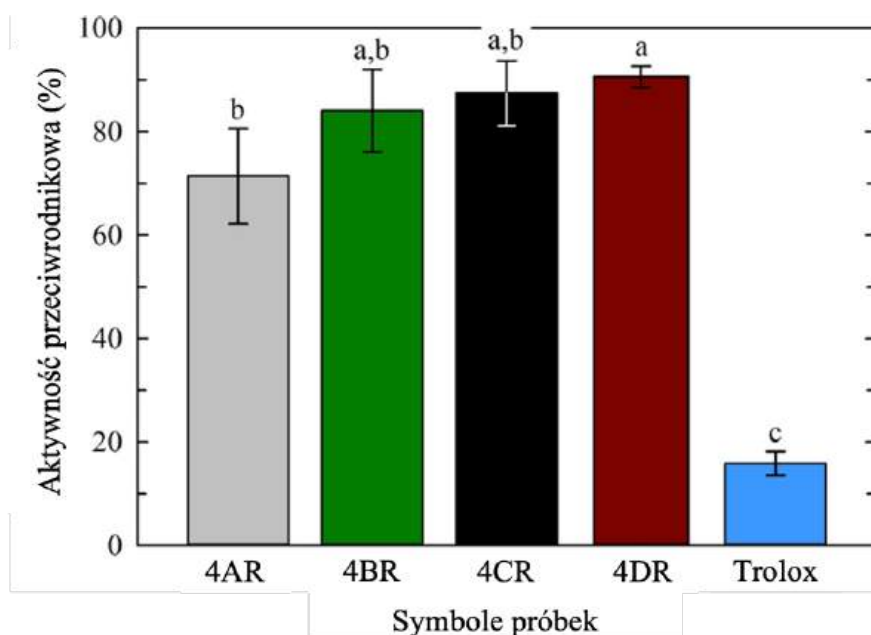
Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Wszystkie roztwory kombuchy wykazały silną aktywność wobec szczepu *P. aeruginosa*, ze strefą inhibicji powyżej 15 mm. Kombucha otrzymana w wyniku fermentacji herbaty czarnej (4C) charakteryzowała się najszerszym spektrum działania wobec badanych szczepów bakterii. Żaden z analizowanych roztworów kombuchy nie wykazywał aktywności względem szczepów bakterii probiotycznych, co należy uznać za korzystny wynik.

7.4.2. Charakterystyka roztworów błonotwórczych

Właściwości przeciwródnikowa

Wyniki analizy aktywności przeciwródnikowej błonotwórczych roztworów chitozanu otrzymanych przy zastosowaniu kombuchy jako rozpuszczalnika chitozanu zostały przedstawione na rycinie 25.



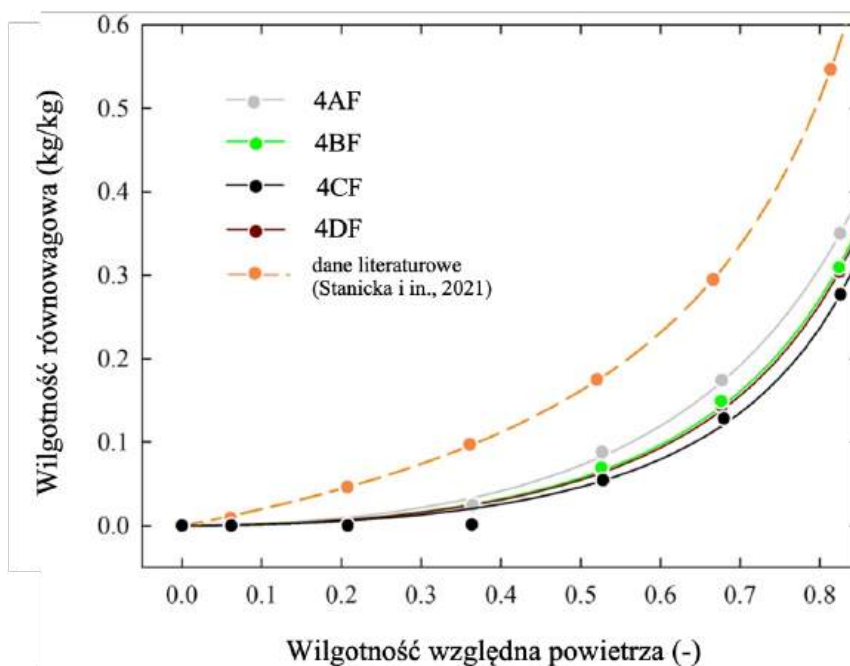
Rycina 25. Aktywność przeciwrodnikowa roztworów błonotwórczych chitozanu oraz standardu – Trolox.

Aktywność wszystkich testowanych roztworów błonotwórczych była co najmniej cztery razy wyższa niż aktywność przeciwrodnikowa Troloxu. Obecność chitozanu w roztworach błonotwórczych wytworzonych przy użyciu kombuchy na bazie herbat (4AR-4CR), zwiększyła aktywność tych roztworów w porównaniu z aktywnością samych roztworów kombuchy (rycina 24). Dane literaturowe wskazują, że chitozan również posiada właściwości przeciwrodnikowe, uwarunkowane masą cząsteczkową i stopniem deacetylacji (Savin i in., 2020). Obserwowane zwiększenie aktywności w porównaniu z roztworami kombuchy prawdopodobnie było związane z synergicznym działaniem chitozanu obecnego w roztworze błonotwórczym oraz obecnością związków aktywnych biologicznie w kombuchy.

7.4.3. Charakterystyka otrzymanych folii chitozanowych

Wilgotność równowagowa (EMC) oraz szacowane współczynniki adsorpcji według modelu Guggenheim-DiMarzio-Waters (GDW)

Wyniki badania wilgotności równowagowej dla otrzymanych folii chitozanowych zestawione z danymi literaturowymi (Stanicka i in., 2021) i zostały przedstawione na rycinie 26.



Rycina 26. Izoterm adsorpcji folii chitozanowych w temp. 25°C uwzględniają zastosowany roztwór kombuchy (kropki – dane eksperymentalne, linie – izoterm obliczone za pomocą modelu GDW).

W celach porównawczych, na wykresie przedstawiono również dane EMC dla folii chitozanowej wytworzonej przy użyciu roztworu kwasu octowego jako rozpuszczalnika chitozanu, uzyskane z zastosowaniem tej samej metody (Stanicka i in., 2021). Otrzymane folie charakteryzowały się niewielkimi różnicami w przebiegu izoterm adsorpcji oraz niską wartością EMC (mniej niż 0,01 kg/kg) w zakresie wilgotności względnej powietrza poniżej 0,35. Spośród badanych próbek największe ograniczenie właściwości higroskopijnych zaobserwowano dla folii chitozanowych wytworzonych przy użyciu kombuchy z czarnej herbaty (4CF). Porównanie izoterm adsorpcji w badanych próbkach folii chitozan-kombucha, z analogiczną izotermą obliczoną na podstawie wcześniej opublikowanych danych, pokazało pozytywny wpływ roztworów kombuchy na obniżenie właściwości higroskopijnych folii chitozanowych. Wartość EMC dla folii chitozanowych otrzymanych z użyciem kwasu octowego była wyraźnie wyższa w całym zakresie wilgotności względnej.

Szacowane współczynniki adsorpcji według modelu GDW dla badanych folii przedstawiono w tabeli 16.

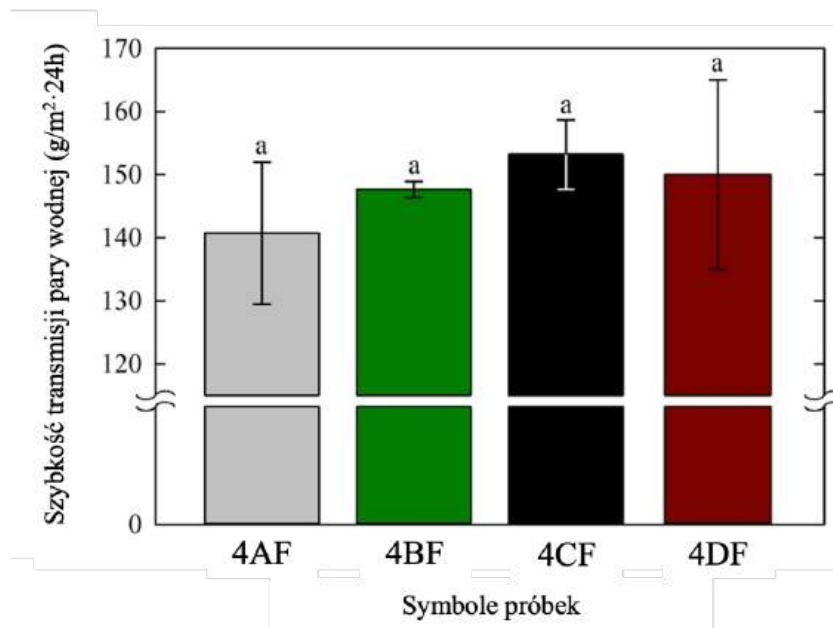
Tabela 16. Szacowane współczynniki adsorpcji według modelu GDW w temp. 25°C dla otrzymanych folii chitozanowych.

Symbol folii	m (kg/kg)	K	k	w	R^2
4AF	0,4804	0,0162	0,8268	25,2774	0,9980
4BF	0,4852	0,0105	0,8866	27,1758	0,9921
4CF	0,4391	0,0119	0,8954	24,8475	0,9921
4DF	0,4075	0,0101	0,9229	25,2628	0,9930
Dane literaturowe (Stanicka i in., 2021)	0,5582	0,3356	0,9202	1,1952	0,9999

Zastosowanie roztworów kombuchy jako rozpuszczalników do wytworzenia folii chitozanowych wpłynęło na zawartość wody w monowarstwie (m), co zostało oszacowane z wykorzystaniem modelu sorpcji GDW. Przedstawiony parametr był niższy dla kombuchy z kawy (4DF) niż dla kombuchy ze wszystkich rodzajów herbat (4AF-4CF). Wartość m dla kombuchy z zielonej i czarnej herbaty, tj. 0,4852 i 0,4391, stanowi odpowiednio 86,9 i 78,7% w stosunku do wartości określonej dla folii chitozanowej wytworzonej przy użyciu kwasu octowego (0,5582). Jeszcze większą redukcję tego parametru (73,0%) stwierdzono dla kombuchy otrzymanej z kawy (0,4075). W wyniku zastosowania roztworu kombuchy dostępność miejsc pierwotnych sorpcji była ograniczona, dlatego też wykorzystanie roztworów kombuchy w produkcji folii chitozanowych spowodowało redukcję właściwości higroskopijnych i ich stabilizację.

Szybkość transmisji pary wodnej (WVTR)

Uzyskane wyniki analizy szybkości transmisji pary wodnej (WVTR) otrzymanych folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 27.

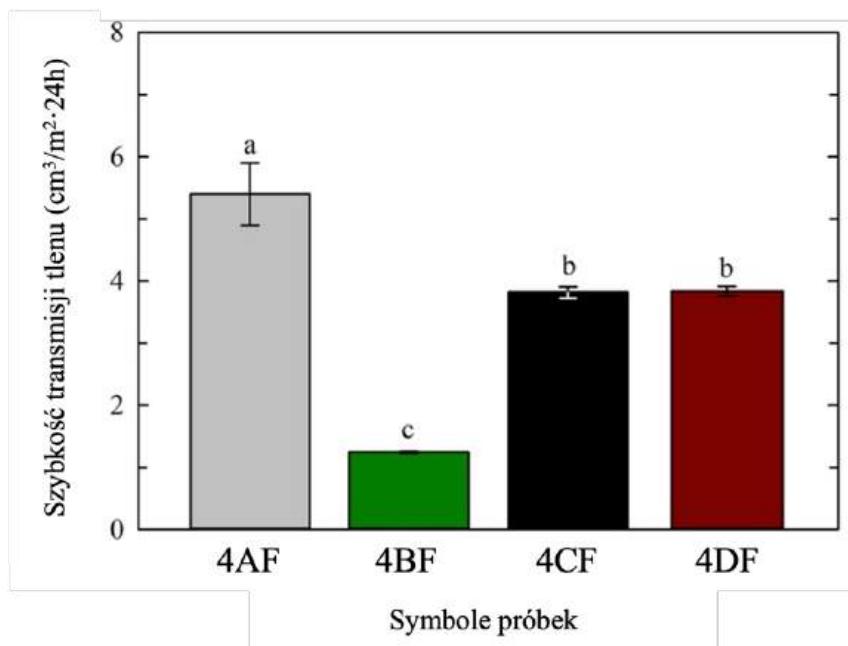


Rycina 27. Szybkość transmisji pary wodnej (WVTR) otrzymanych folii chitozanowych.

Badanie szybkości transmisji pary wodnej wykazało, że folie otrzymane przy użyciu kombuchy jako rozpuszczalnika chitozanu charakteryzowały się wartością WVTR wynoszącą pomiędzy 140,8 (4AF) oraz 153,2 g/m²·24h (4CF), a różnice pomiędzy nimi nie były statystycznie istotne. Analiza danych literaturowych wykazała, że zastosowanie dodatku ekstraktu z herbaty zielonej wpłynęło na poprawę właściwości barierowych otrzymanych folii wobec pary wodnej, co pokazuje, że związki aktywne biologicznie obecne w herbacie oraz kombuchy mogą mieć wpływ na właściwości barierowe folii (Siripatrawan i Harte, 2010).

Szybkość transmisji tlenu (OTR)

Uzyskane wyniki badania szybkości transmisji tlenu (OTR) otrzymanych folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 28.

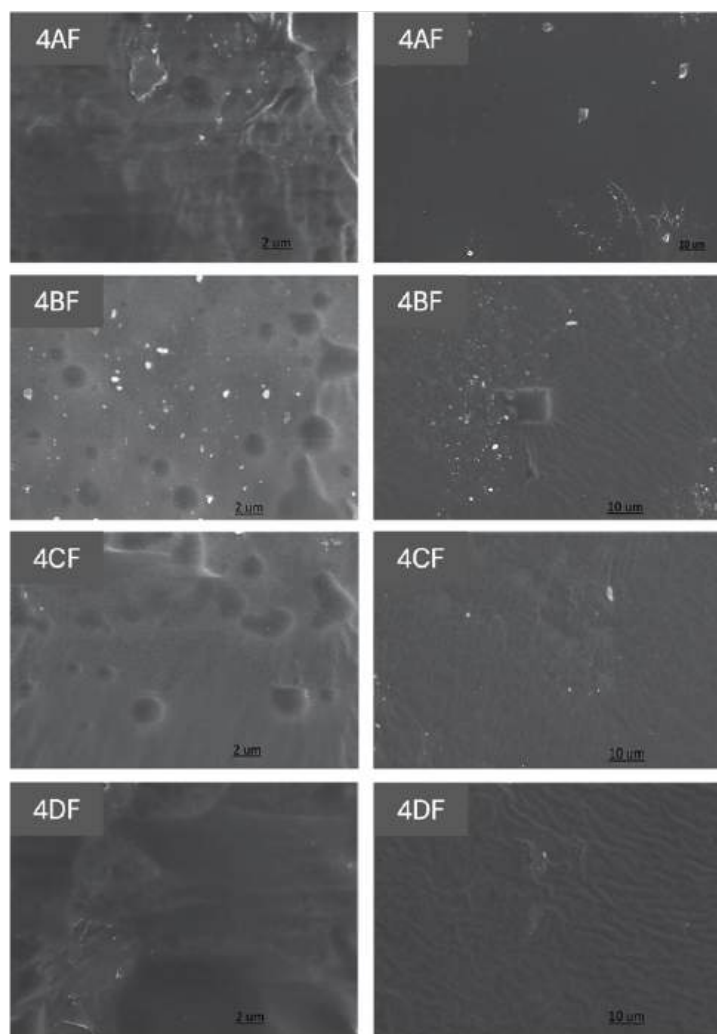


Rycina 28. Szybkość transmisji tlenu (OTR) otrzymanych folii chitozanowych.

Badanie szybkości transmisji tlenu wykazało, że najskuteczniejszą barierę dla tlenu stanowiła folia wytworzona przy użyciu kombuchy na bazie herbaty zielonej (4BF), dla której wartość OTR wynosiła 1,25 cm³/m²·24h, co zostało potwierdzone statystycznie. Najwyższą wartość OTR wynoszącą 5,40 cm³/m²·24h odnotowano dla folii oznaczonej symbolem 4AF.

Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

Analizę struktury otrzymanych folii wykonane za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM), a wyniki zostały przedstawione na rycinie 29.

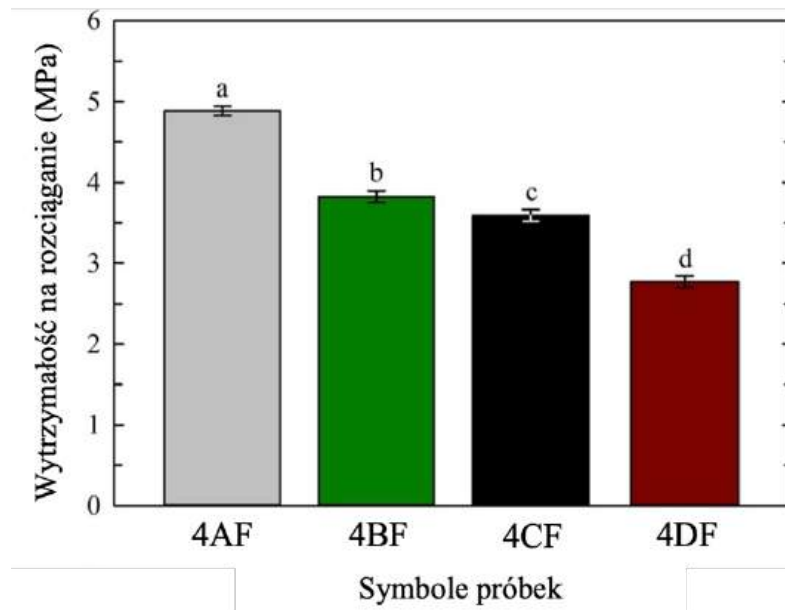


Rycina 29. Obrazy SEM otrzymanych folii chitozanowych.

Na podstawie badania SEM, można stwierdzić, że struktura wszystkich folii chitozanowych była nieporowata i uporządkowana, a użycie kombuchy jako rozpuszczalnika pozwoliło na uzyskanie jednorodnych i gładkich powierzchni w uzyskanych próbkach.

Wytrzymałość na rozciąganie (TS)

W celu oceny właściwości mechanicznych wytworzonych folii chitozanowych określono ich wytrzymałość na rozciąganie, a uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 30.

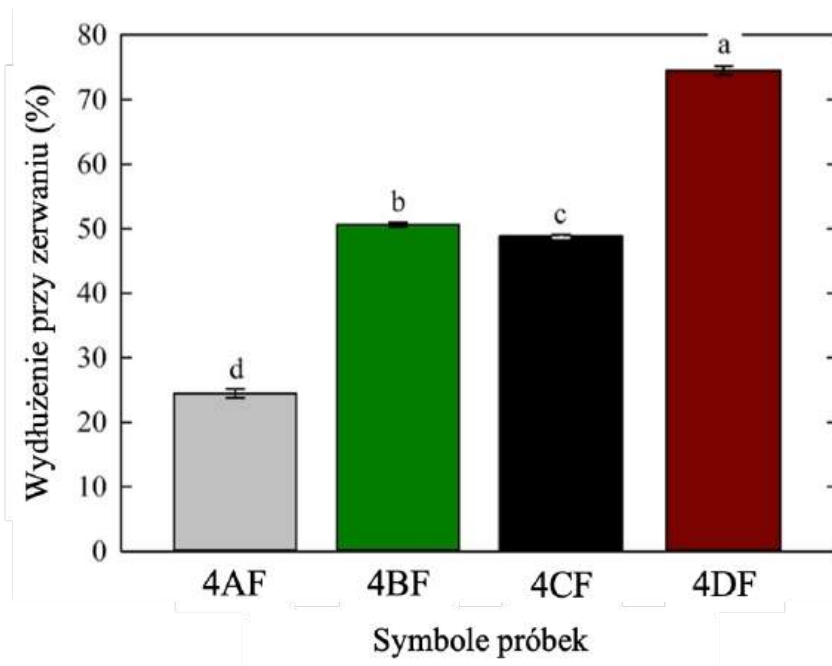


Rycina 30. Wytrzymałość na rozciąganie folii chitozanowych.

Na podstawie wykonanych badań wytrzymałości na rozciąganie stwierdzono, że folia chitozanowa wytworzona przy użyciu kombuchy na bazie białej herbaty jako rozpuszczalnika (4AF) charakteryzowała się najwyższą wartością TS wynoszącą 4,89 MPa, spośród analizowanych folii, co zostało potwierdzone statystycznie. Najniższą wartość TS (2,77 MPa) odnotowano dla folii wytworzonej przy użyciu kombuchy na bazie kawy (4DF). Różnice w wytrzymałości na rozciąganie pomiędzy foliami mogły być spowodowane rodzajem i strukturą związków fenolowych obecnych w danym roztworze kombuchy. Jak wykazano w badaniach opisanych w literaturze, włączenie polifenoli do matrycy folii chitozanowych, szczególnie kwasów fenolowych, skutkowało zakłóceniem struktury krystalicznej chitozanu poprzez rozerwanie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych i osłabienie oddziaływań polimer-polimer, co mogło zmniejszyć ogólną wytrzymałość mechaniczną folii (Agarwal i in., 2021; Sun i in., 2017).

Wydłużenie przy zerwaniu (EB)

Wyniki analizy wydłużenia przy zerwaniu uzyskane dla otrzymanych folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 31.

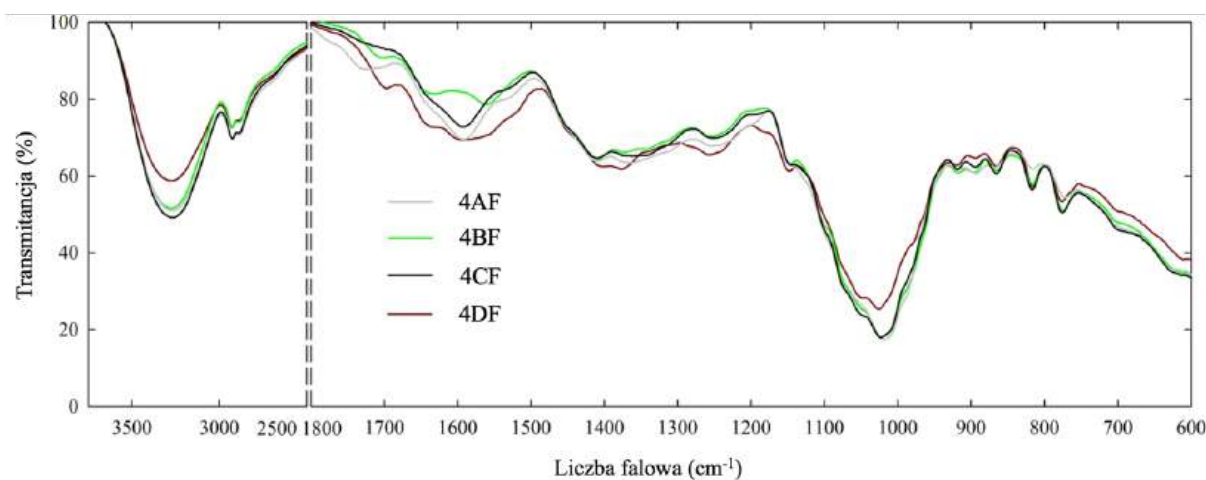


Rycina 31. Wydłużenie przy zerwaniu folii chitozanowych.

W przypadku wydłużenia przy zerwaniu, folia 4AF charakteryzowała się najniższą wartością tego parametru wynoszącą 24,46%, natomiast najwyższą wartość odnotowano dla folii 4DF, czyli odwrotnie niż w przypadku badania wytrzymałości na rozciąganie. Z drugiej strony analiza danych literaturowych pokazała, że dodatki bogate w polifenole zwiększyły elastyczność filmów chitozanowych. Na skutek oddziaływań kwasów fenolowych z uporządkowaną strukturą polimeru, możliwe było zwiększenie ruchów cząsteczek łańcucha pod wpływem naprężeń (Agarwal i in., 2021; Sun i in., 2017).

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR)

W celu oceny struktury folii chitozanowych wykonano widma spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), a uzyskane wyniki zostały przedstawione na rycinie 32.



Rycina 32. Widma ATR-FTIR otrzymanych folii chitozanowych.

Widma ATR-FTIR zarejestrowane dla otrzymanych folii chitozanowych w zakresie ok. 1000 cm^{-1} wskazały na obecność grupy wodorotlenowej. Widma ATR-FTIR wykazały zróżnicowane pasmo w zakresie $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. Pasma to odpowiada wiązaniu C–O. Na podstawie uzyskanych widm ATR-FTIR można wnioskować, że badane próbki różniły się w zakresie obecności pierwszo- i drugorzędowych alkoholi oraz estrów aromatycznych (Kaashyap i in., 2021).

Właściwości przeciwbakteryjnych

Aktywność przeciwbakteryjna folii chitozanowych wobec wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych oraz probiotycznych została przedstawiona w tabeli 17.

Tabela 17. Aktywność przeciwbakteryjna folii chitozanowych.

Symbol folii	Szczep wskaźnikowy						
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>
4AF	--	--	--	--	17	20	--
4BF	--	--	--	--	17	19	--
4CF	--	--	--	22	17	21	--
4DF	--	--	--	--	--	18	--

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność.

Folie chitozanowe otrzymane przy użyciu kombuchy jako rozpuszczalnika, podobnie jak roztwory kombuchy charakteryzowały się specyficzną działaniem przeciwbakteryjnego. Ich zakres działania był taki sam jak roztworów kombuchy (tabela 15). Folia otrzymana przy użyciu kombuchy na bazie herbaty czarnej (4CF) wykazała wyższą aktywność wobec *E. coli* niż roztwór kombuchy, a pozostałe folie charakteryzowały się wyższą aktywnością wobec *S. enterica*, prawdopodobnie ze względu na synergiczne działanie chitozanu i składników aktywnych biologicznie pochodzących z kombuchy (Deghrigue i in., 2013; Vohra i in., 2019).

7.5. Aplikacyjne zastosowanie błonotwórczych roztworów chitozanu

Ostatnim etapem badań zrealizowanym w ramach rozprawy doktorskiej było wskazanie aplikacyjnego zastosowania roztworów błonotwórczych chitozanu. Do ich przygotowania wykorzystano trzy rodzaje kombuchy jako naturalnego rozpuszczalnika chitozanu. W wyniku fermentacji otrzymano trzy roztwory kombuchy o następujących symbolach: 5A – kombucha na bazie rumianku, 5B – na bazie melisy lekarskiej oraz 5C – na bazie czarnej herbaty. Na ich podstawie sporządzono odpowiednio trzy roztwory błonotwórcze chitozanu: 5AR, 5BR i 5CR. Kombucha z melisy (5B) posłużyła także do otrzymania folii chitozanowej (5BF) oraz do powleczenia papryk, oznaczonych symbolem 5D. Jako próbki kontrolne wykorzystano papryki niepowleczone, oznaczone symbolem 5E. Celem tego etapu badań była ocena, czy zastosowana powłoka chitozanowa przyczyni się do poprawy jakości przechowywanych produktów spożywczych.

7.5.1. Charakterystyka roztworów kombuchy

Całkowita zawartość związków fenolowych (TPC) i flawonoidów (TFC)

W celu charakterystyki roztworów kombuchy wykorzystanych jako naturalne rozpuszczalniki chitozanu oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych i flawonoidów w tych roztworach, a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Całkowita zawartość związków fenolowych i flawonoidów w roztworach kombuchy.

Symbol kombuchy	TPC ($\mu\text{g GAeq/ml}$)	TFC ($\mu\text{g Qeq/ml}$)
5A	135,00 ^c \pm 0,16	13,76 ^b \pm 1,68
5B	381,67 ^a \pm 0,05	21,05 ^a \pm 0,37
5C	377,90 ^b \pm 0,08	14,28 ^b \pm 0,11

Najwyższą całkowitą zawartością związków fenolowych (381,67 $\mu\text{g GAeq/ml}$) charakteryzowała się kombucha uzyskana z melisy lekarskiej (5B). Kombucha na bazie

czarnej herbaty (5C) również charakteryzowała się wysokim poziomem TPC (377,90 GAeq/ml). Pod względem całkowitej zawartości flawonoidów kombucha z melisy lekarskiej 5B charakteryzowała się najwyższą ich zawartością, wynoszącą 21,05 µg Qeq/mL, co zostało potwierdzone statystycznie. Oznaczone wartości TPC i TFC w roztworach kombuchy były uzależnione od surowca z jakiego otrzymano daną kombuchę. Analiza danych literaturowych wykazała, że wartość TPC malała wraz z czasem fermentacji kombuchy, natomiast w przypadku TFC obserwowany był wzrost zawartości z czasem trwania tego procesu, co było spowodowane licznymi biotransformacjami zachodzącymi w trakcie procesu fermentacji, a także stabilnością niektórych flawonoidów, takich jak teaflawiny i tearubiginy oraz niższą stabilnością np. epikatechiny (Shahbazi i in., 2018).

7.5.2. Charakterystyka roztworów błonotwórczych

Właściwości przeciwbakteryjne

Aktywność przeciwbakteryjna roztworów błonotwórczych chitozanu wobec wybranych szczepów bakterii została przedstawiona w tabeli 19.

Tabela 19. Aktywność przeciwbakteryjna roztworów błonotwórczych.

Symbol roztworu	Szczep wskaźnikowy			
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>
	Strefa inhibicji (mm)			
5AR	12,97 ± 0,15	11,03 ± 0,15	12,06 ± 0,11	st
5BR	13,13 ± 0,15	11,10 ± 0,10	12,00 ± 0,10	11,93 ± 0,06
5CR	st	st	10,13 ± 0,11	st

Średnica powstałych stref inhibicji: 5-10 mm słaba aktywność; 11-14 mm umiarkowana aktywność; >14 mm silna aktywność; st oznacza działanie statyczne.

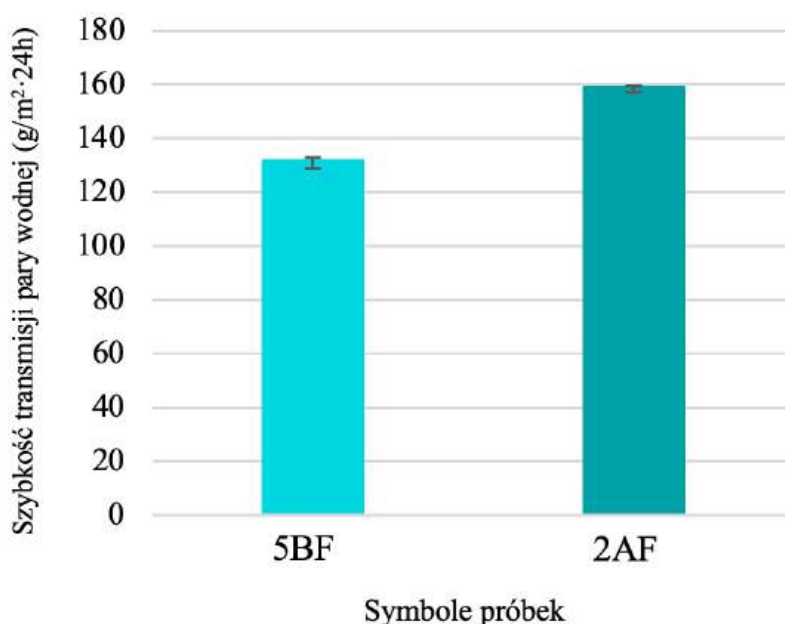
Najszerzym spektrum aktywności przeciwko badanym szczepom bakterii charakteryzował się roztwór błonotwórczy chitozanu, gdzie rozpuszczalnik stanowiła kombucha na bazie melisy lekarskiej (5BR). W przypadku roztworu 5BR zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu bakterii, wskazujące na jego umiarkowaną aktywność względem badanych szczepów, natomiast pozostałe roztwory wykazały jedynie statyczną aktywność przeciwko *S. enterica*, co oznacza, że tylko nieznacznie zmniejszyły intensywność ich wzrostu. Jak pokazały wcześniejsze badania opisane w rozdziale 7.4., aktywność przeciwbakteryjna kombuchy zależała od rodzaju użytego surowca w procesie fermentacji.

7.5.3. Charakterystyka folii chitozanowych

Na tym etapie badań uzyskano folie z roztworów błonotwórczych chitozanu z zastosowaniem kombuchy. Jednak tylko folia otrzymana z kombuchy na bazie melisy lekarskiej, charakteryzująca się najlepszymi parametrami na etapie badań mikrobiologicznych samej kombuchy oraz roztworów błonotwórczych cechowała się jakością umożliwiającą dalsze analizy. Uzyskane wyniki zostały zestawione z danymi uzyskanymi dla folii chitozanowej otrzymanych przy użyciu 3% kwasu octowego jako rozpuszczalnika i scharakteryzowanej w poprzednim etapie badań (rozdział 7.2.).

Szybkość transmisji pary wodnej (WVTR)

Uzyskane wyniki badania szybkości transmisji pary wodnej (WVTR) folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 33.

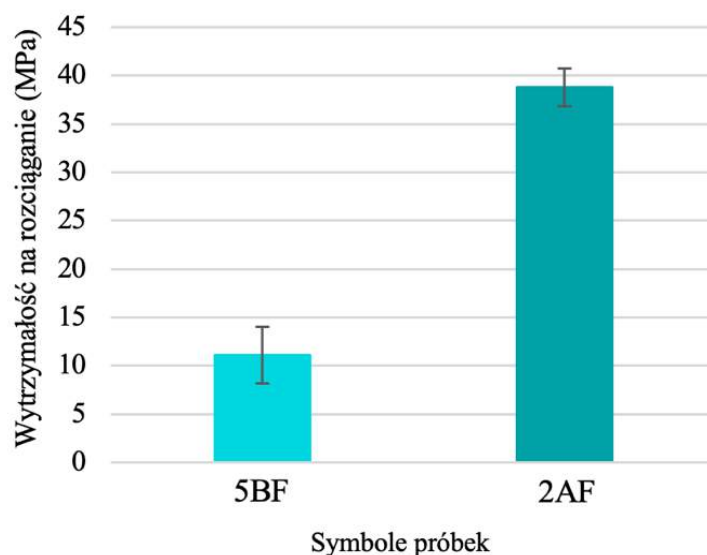


Rycina 33. Szybkość transmisji pary wodnej folii chitozanowych.

Wartość szybkości transmisji pary wodnej dla folii chitozanowej otrzymanej przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej jako rozpuszczalnika wyniosła 131,84 g/m²·24h. Dane uzyskane we wcześniejszym etapie badań wykazały, że wartość WVTR dla folii chitozanowej otrzymanych przy użyciu powszechnie stosowanego rozpuszczalnika, tj. 3% kwasu octowego (2AF), wyniosła 159,09 g/m²·24h i była wyższa niż w przypadku folii 5BF.

Wytrzymałość na rozciąganie (TS)

W celu oceny parametrów mechanicznych otrzymanych folii chitozanowych, wykonano badanie wytrzymałości na rozciąganie, a wyniki zostały przedstawione na rycinie 34.

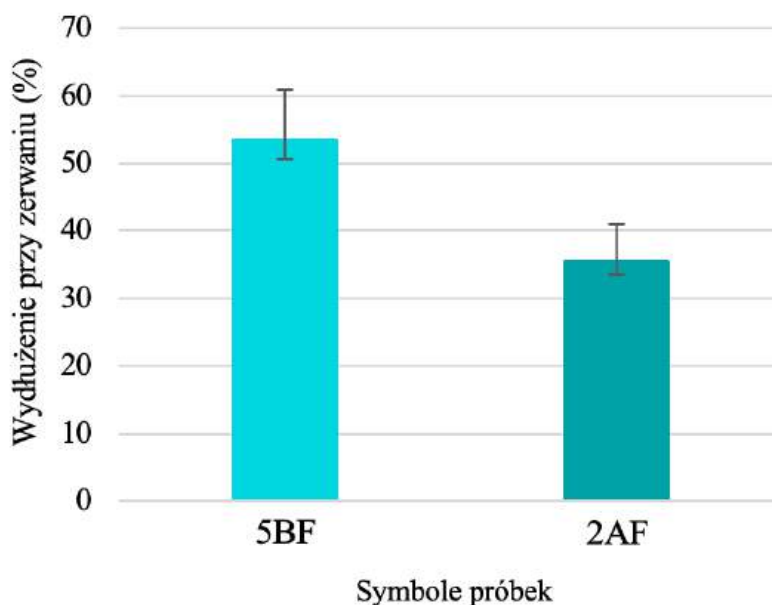


Rycina 34. Wytrzymałość na rozciąganie folii chitozanowych.

Wartość wytrzymałości na rozciąganie uzyskana dla folii chitozanowej otrzymanej przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej jako rozpuszczalnika chitozanu wyniosła 11,08 MPa; uzyskana wartość była wyższa od wartości TS uzyskanych dla folii, gdzie rozpuszczalnik stanowiły kombuche na bazie herbaty białej i czarnej (opisane w rozdziale 7.4.). Uzyskana wartość była jednak znacznie niższa niż w przypadku folii chitozanowej otrzymanej z wykorzystaniem powszechnie stosowanego rozpuszczalnika chitozanu, tj. kwasu octowego, dla których wartość TS wyniosła 38,80 MPa (2AF).

Wydłużenie przy zerwaniu (EB)

Wyniki badania wydłużenia przy zerwaniu uzyskane dla otrzymanych folii chitozanowych zostały przedstawione na rycinie 35.

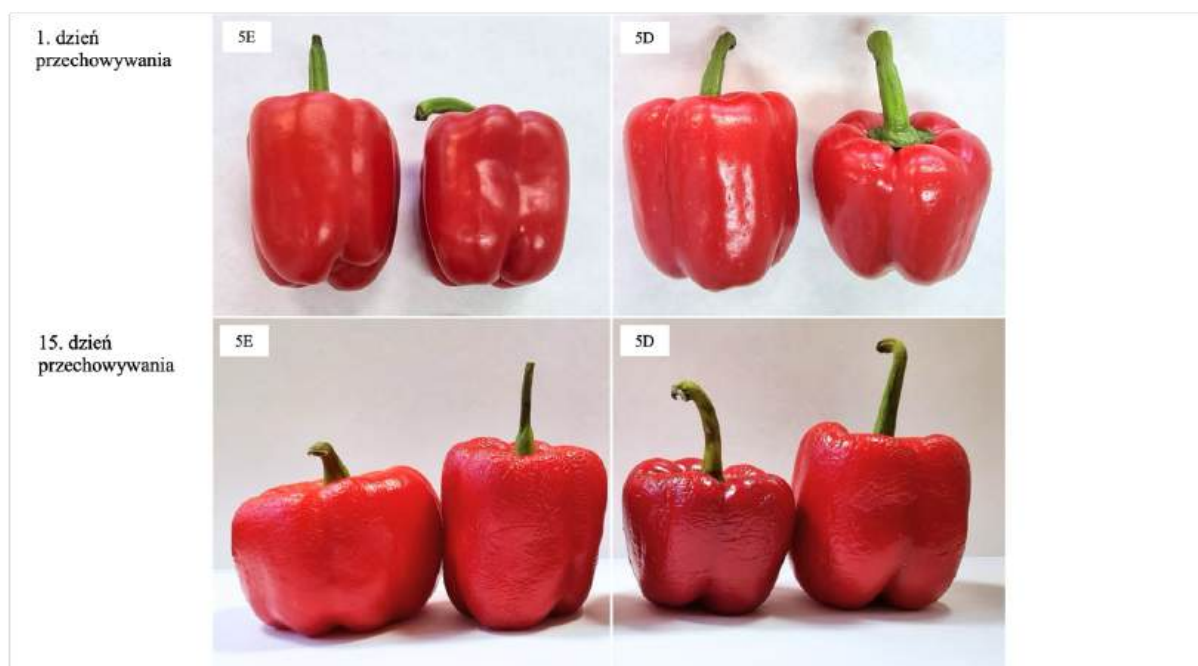


Rycina 35. Wydłużenie przy zerwaniu oznaczone dla folii chitozanowych.

W przypadku wydłużenia przy zerwaniu uzyskana wartość dla folii oznaczonej symbolem 5BF wyniosła 53,45%. Dane dotyczące folii chitozanowych, w których jako rozpuszczalnik zastosowano kombuchę na bazie herbaty białej i zielonej (opisane w rozdziale 7.4.), wykazały niższe wartości, odpowiednio – 24,46% dla folii otrzymanej przy użyciu kombuchy na bazie herbaty białej oraz 50,62% dla folii otrzymanej przy użyciu kombuchy na bazie herbaty zielonej jako rozpuszczalnika. Niższą wartość EB (35,5%) odnotowano również dla folii otrzymanej z użyciem kwasu octowego jako rozpuszczalnika chitozanu (2AF).

7.5.4. Ocena jakości czerwonej papryki pokrytej roztworem błonotwórczym chitozanu

Ocenę jakości niepowlekanych papryk kontrolnych (5E) i papryk powlekanych roztworem błonotwórczym chitozanu na bazie melisy lekarskiej (5D) przeprowadzono na podstawie pomiaru parametrów tekstury, w tym wytrzymałości i elastyczności skórki badanych warzyw, oceny sensorycznej, zawartości kwasu askorbinowego, a także aktywności przeciwutleniającej papryk. Dokumentację fotograficzną powlekanych czerwonych papryk i próbki kontrolnej w pierwszym i piętnastym dniu przechowywania przedstawiono na rycinie 36.



Rycina 36. Dokumentacja fotograficzna powleczonej czerwonej papryki i próby kontrolnej w pierwszym i piętnastym dniu przechowywania.

Ocena parametrów tekstury: siła przebicia i elastyczność skórki

Parametry tekstury mogą służyć jako wskaźniki zmian zachodzących podczas przechowywania świeżej papryki. Zmiany te opisano za pomocą dwóch parametrów: siły przebicia skórki i jej elastyczności. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Parametry tekstury czerwonej papryki pokrytej roztworem błonotwórczym chitozanu i papryki kontrolnej w trakcie 15-dniowego przechowywania w temperaturze 18°C.

Dzień przechowywania	5E	5D
Siła przebicia skórki (N)		
1.	8,55 ^a ± 0,8	11,3 ^c ± 1,2
5.	10,3 ^b ± 0,9	9,8 ^b ± 0,7
10.	7,63 ^a ± 0,7	9,9 ^b ± 1
15.	10,5 ^{b,c} ± 0,9	10,7 ^{b,c} ± 0,9
Elastyczność skórki* (mm)		
1.	3,3 ^a ± 0,7	3,9 ^{a,b} ± 0,4
5.	4,0 ^{a,b} ± 0,7	4,0 ^{a,b} ± 0,8
10.	3,5 ^a ± 0,3	4,2 ^{b,c} ± 0,4
15.	4,7 ^{c,d} ± 0,6	4,9 ^d ± 0,8

*Odległość odchylenia próbki do momentu nakłucia skóry

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że siła przebicia skórki papryki powleczonej błonotwórczym roztworem chitozanu (5D) wykazała znaczący wzrost o około 32% w porównaniu z papryką kontrolną (5E). Do dziesiątego dnia przechowywania zastosowana powłoka poprawiła siłę przebicia skórki. Jednak przedłużone przechowywanie zmniejszyło różnicę w wartościach parametrów do poziomu statystycznie nieistotnego. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku elastyczności skórki, która wykazywała wyższe wartości w próbkach powleczonych do dziesiątego dnia przechowywania; wzrosła o około 18% w dniu 1. i około 20% w dniu dziesiątym. Biorąc pod uwagę, że więdnienie papryki z natury prowadziło do spadku obu parametrów, uzyskane wyniki wskazały na pozytywny wpływ powłoki na ogólną jakość papryki. Analiza danych literaturowych wykazała, że powłoki na bazie lipidów pochodzące z oleju mineralnego, a także powłoki proteinowo-woskowe stosowane na owocach i warzywach, w tym na papryce, zmniejszyły uszkodzenia skórki podczas dystrybucji i transportu, a także urazy związane z przechowywaniem (Kowalczyk i Pikula, 2010; Nasrin i in., 2018).

Ocena sensoryczna

Ocena sensoryczna papryk obejmowała ocenę trzech parametrów, takich jak pożądalność oraz intensywność koloru, aromat i ogólny wygląd. Uzyskane wyniki oceny sensorycznej przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Wyniki oceny sensorycznej czerwonej papryki pokrytej roztworem błonotwórczym chitozanu i papryki kontrolnej w trakcie 15-dniowego przechowywania w temperaturze 18°C

Dzień przechowywania	5E	5D
Pożądalność koloru		
1.	9,8 ^c ± 0,4	9,4 ^{b, c} ± 0,8
5.	9,8 ^c ± 0,4	9,1 ^{a, b, c} ± 1,0
10.	8,4 ^{a, b} ± 0,8	9,2 ^{a, b, c} ± 0,8
15.	8,0 ^a ± 0,8	8,4 ^{a, b} ± 0,9
Intensywność koloru		
1.	9,6 ^c ± 0,5	9,8 ^c ± 0,4
5.	9,6 ^c ± 0,9	9,6 ^c ± 0,5
10.	8,8 ^{a, b, c} ± 0,4	9,2 ^{b, c} ± 0,4
15.	7,8 ^a ± 0,9	8,2 ^{a, b} ± 0,4
Aromat		
1.	9,2 ^c ± 0,8	5,2 ^{a, b} ± 0,7
5.	8,6 ^c ± 1,0	3,8 ^a ± 0,8
10.	8,8 ^c ± 0,9	5,8 ^b ± 0,8
15.	8,0 ^c ± 1,0	6,0 ^b ± 0,9
Ogólny wygląd		
1.	9,2 ^c ± 0,9	8,8 ^{d, e} ± 0,9
5.	7,8 ^{c, d, e} ± 1,0	7,6 ^{c, d} ± 1,0
10.	6,0 ^{a, b} ± 1,0	5,4 ^{a, b} ± 0,9
15.	4,8 ^a ± 0,8	6,6 ^{b, c} ± 0,8

Ocena sensoryczna papryk wykazała porównywalne wyniki dla ocenianych cech w paprykach powleczonych w porównaniu z próbą kontrolną, jednak w przypadku oceny ogólnego wyglądu papryki, odnotowano znacznie wyższy wynik w przypadku papryk powleczonych po piętnastu dniach przechowywania. Aromat ocenianych papryk został oceniony bardziej korzystnie w przypadku papryk niepowlekanych, ponieważ powłoka chitozanowa zmieniła typowy zapach papryki. W przypadku papryk powlekanych aromat opisany jako fermentacyjno-słodko-kwaśny, chociaż nieodczuwany jako negatywny, różnił się od typowego zapachu czerwonej papryki. Niemniej jednak uzyskane wyniki wykazały jedynie niewielkie różnice w jakości sensorycznej między paprykami powleczonymi, a grupą kontrolną. Biorąc pod uwagę poprawę parametrów jakościowych, takich jak właściwości tekstury, wynik ten wydawał się w pełni akceptowalny, co sugeruje skuteczność powłoki chitozanowej w stosowaniu na owocach i warzywach. Podobne badania, w których porównano jakość sensoryczną czerwonej papryki pokrytej 1,5% i 2% roztworem chitozanu z papryką niepowlekaną po dziewięciu dniach przechowywania, stwierdzono, że wygląd i

ogólna akceptowalność próbek pokrytych chitozanem były istotnie wyższe w porównaniu z próbką kontrolną (Nasrin i in., 2018).

Zawartość kwasu askorbinowego oraz aktywność przeciwrodnikowa

Papryka stanowi cenne źródło kwasu askorbinowego, którego stężenie w jej owocach mieści się w przedziale od 60 do 470 mg/100 g świeżej masy. Warto jednak podkreślić, że poziom witaminy C zależy od wielu czynników, takich jak odmiana, warunki uprawy, stopień dojrzałości czy sposób przechowywania. Z tego względu zawartość kwasu askorbinowego może być istotnym wskaźnikiem jakości papryki. Wyniki analizy stężenia kwasu askorbinowego oraz aktywności przeciwrodnikowej przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Zawartość kwasu askorbinowego i aktywność przeciwrodnikowa czerwonej papryki pokrytej roztworem błonotwórczym chitozanu i papryki kontrolnej w trakcie 15-dniowego przechowywania w temperaturze 18°C.

Dzień przechowywania	Zawartość kwasu askorbinowego (mg/100/g ś.m.)		Aktywność przeciwrodnikowa (μmol of Trolox/g ś.m.)	
	5E	5D	5E	5D
1	131,0 ^b ± 1,0	139,0 ^{b, c, d} ± 5,1	10,5 ^{c, d} ± 0,08	11,6 ^e ± 0,2
5	102,0 ^a ± 2,9	143,0 ^d ± 0,4	8,4 ^a ± 0,3	9,4 ^b ± 0,2
10	133,0 ^{b, c} ± 2,8	140,0 ^{c, d} ± 2,6	9,7 ^{b, c} ± 0,2	10,6 ^{c, d} ± 0,7
15	144,0 ^d ± 4,2	160,0 ^e ± 1,6	9,0 ^{a, b} ± 0,3	11,2 ^{d, e} ± 0,1

W przeprowadzonym badaniu zawartość kwasu askorbinowego w papryce kontrolnej wyniosła 131,7 mg/100 g ś.m., podczas gdy w paprykach powleczonych była ona o około 5% wyższa. Melisa lekarska zawiera około 70 mg/100 g świeżej masy kwasu askorbinowego, dlatego też kombucha z melisy lekarskiej mogła również zawierać kwas askorbinowy, co mogło być powodem tej różnicy (Kazimierzak i in., 2011). Podczas przechowywania zawartość kwasu askorbinowego wahała się w obu próbkach, prawdopodobnie z powodu naturalnej zmienności materiału papryki podczas jej przechowywania. Jednak po piętnastu dniach przechowywania ostateczna zawartość kwasu askorbinowego w paprykach powleczonych była o około 11% wyższa niż w paprykach kontrolnych, co zostało potwierdzone statystycznie.

Przeprowadzone analizy aktywności przeciwrodnikowej wykazały istotnie wyższe wartości w paprykach powleczonych, w porównaniu z paprykami kontrolnymi w pierwszym, piątym i piętnastym dniu przechowywania. Wzrost wartości dla analizowanego parametru w paprykach powlekanych w porównaniu z paprykami kontrolnymi wyniósł około 10% po pierwszym, piątym i dziesiątym dniu oraz 24% po piętnastym dniu przechowywania. Co

więcej, zaobserwowano znaczący spadek aktywności przeciwrodnikowej w paprykach kontrolnych po piętnastu dniach przechowywania w porównaniu do dnia pierwszego, gdzie w paprykach powleczonych wartość ta pozostała stabilna, bez znaczącego spadku po piętnastu dniach. Nie stwierdzono istotnej korelacji między aktywnością przeciwrodnikową analizowanych papryk, a zawartością kwasu askorbinowego.

8. Podsumowanie

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka materiałów polimerowych na bazie chitozanu o dobrych właściwościach, m.in. mechanicznych i przeciwdrobnoustrojowych. Badanie przeprowadzono w trzech etapach: (1) zastosowanie dodatków funkcjonalnych w celu poprawy właściwości fizycznych, mechanicznych i przeciwdrobnoustrojowych uzyskanych materiałów, (2) zastąpienie konwencjonalnych rozpuszczalników chitozanu, tj. roztworów kwasu octowego, cytrynowego – naturalnymi rozpuszczalnikami, takimi jak octy owocowe i kombucha oraz (3) aplikacyjne zastosowanie roztworów chitozanu poprzez powleczenie świeżych papryk w celu oceny ich możliwego zastosowania aplikacyjnego.

W pierwszym etapie badań oceniono wpływ dodatku nanocelulozy, etanolowego ekstraktu z propolisu (EEP) oraz kofeiny do matrycy chitozanowej. Uzyskane wyniki badań wykazały, że chociaż dodanie nanocelulozy i EEP nie poprawiło znacząco właściwości mechanicznych folii, takich jak wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu, to jednak folie wykazywały polepszone właściwości barierowe, szczególnie pod względem szybkości przenikania pary wodnej. Zastosowanie ekstraktu z propolisu spowodowało znaczne zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej, szczególnie wobec szczepu chorobotwórczego –

L. monocytogenes., co wskazuje na możliwość wykorzystania materiałów chitozanowych z dodatkiem EEP m.in. jako opakowania do żywności. Uzyskane wyniki podkreśliły znaczenie związków bioaktywnych w poprawie właściwości funkcjonalnych folii na bazie chitozanu do zastosowań związanych z ochroną żywności przed zbyt szybkim psuciem.

Drugi etap badań miał na celu zastąpienie powszechnie stosowanego rozpuszczalnika chitozanu jakim jest kwas octowy, rozpuszczalnikami naturalnymi, takimi jak octy owocowe i kombucha. Naturalne rozpuszczalniki stanowiły również źródło związków bioaktywnych, wzmacniając właściwości funkcjonalne uzyskanych materiałów. Folie przygotowane z wykorzystaniem octów owocowych jako rozpuszczalników chitozanu, wykazały obiecującą aktywność przeciwdrobnoustrojową, szczególnie w przypadku octu wiśniowego, gdzie uzyskane folie wykazały najszersze spektrum działania przeciwbakteryjnego. Wytworzone folie zachowały również dobre właściwości mechaniczne, przy czym zaobserwowano różnice w zależności od rodzaju użytego octu owocowego. Badania wykazały, że octy owocowe mogą być skuteczną, zrównoważoną alternatywą dla kwasów organicznych, zapewniając działanie przeciwdrobnoustrojowe. Kombucha, uzyskana w wyniku fermentacji trzech

rodzajów herbaty oraz kawy, również została z powodzeniem zastosowana jako rozpuszczalnik chitozanu. Rodzaj kombuchy użytej jako rozpuszczalnik wpłynął na właściwości mechaniczne i barierowe folii. Folie chitozanowe wytworzone przy użyciu kombuchy na bazie zielonej herbaty stanowiły najskuteczniejszą barierę tlenową, podczas gdy te wykonane z kombuchy na bazie białej herbaty charakteryzowały się najwyższą wytrzymałością na rozciąganie. Uzyskane wyniki na tym etapie badań wskazały na potencjał wykorzystania kombuchy i octów owocowych jako naturalnych i funkcjonalnych rozpuszczalników do otrzymywania folii chitozanowych, oferując innowacyjne podejście do produkcji zrównoważonych materiałów opakowaniowych do żywności.

W ostatnim etapie badań świeże papryki zostały powleczone błonotwórczym roztworem chitozanu otrzymanym przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej. Badania aplikacyjne skupiły się na ocenie zdolności folii do wydłużenia okresu przydatności do spożycia i zachowania jakości papryk. Powłoka chitozanowa wytworzona przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej jako rozpuszczalnika chitozanu, pozytywnie wpłynęła na zachowanie wysokiej zawartości kwasu askorbinowego w paprykach czerwonych w porównaniu z grupą kontrolną (papryki niepowleczone), co wskazuje na potencjał badanych powłok do utrzymania wysokiej jakości wartości odżywczych świeżych produktów. Ocena sensoryczna badanych warzyw potwierdziła, że powłoka nie wpłynęła negatywnie na wygląd ani ogólną jakość papryk. Ponadto folia chitozanowa otrzymana przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej jako rozpuszczalnika wykazała aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. enterica*, co dodatkowo potwierdza jej praktyczną przydatność w ochronie żywności. Ten etap badań wykazał, że powłoka chitozanowa, wytworzona przy użyciu rozpuszczalnika naturalnego jakim jest kombucha, zawierającego substancje bioaktywne, jak kombucha, może stanowić skuteczną barierę w ochronie świeżych produktów spożywczych przed skażeniem mikrobiologicznym, a jednocześnie przyczynić się do zachowania ich wartości odżywczej podczas transportu i przechowywania.

Uzyskane wyniki badań dostarczyły cennych informacji na temat wykorzystania folii chitozanowych w branży opakowaniowej. Zebrane dane wykazały, że parametry folii chitozanowych można modyfikować stosując dodatki funkcjonalne do matrycy chitozanowej, zastępując konwencjonalne rozpuszczalniki naturalnymi i stosując je w warunkach odzwierciedlających prawdziwe zastosowania aplikacyjne. Wyniki te sugerują, że folie chitozanowe, szczególnie te wytworzone przy użyciu naturalnych rozpuszczalników, oferują obiecujące i zrównoważone rozwiązanie dla branży opakowaniowej. Konieczne są dalsze

badania w celu optymalizacji, zwiększenia skali i przemysłowego zastosowania tych materiałów, aby zapewnić ich długoterminowy wpływ na redukcję odpadów z tworzyw sztucznych i poprawę bezpieczeństwa żywności.

9. Wnioski

- Folie na bazie chitozanu wzbogacone dodatkiem nanocelulozy i etanolowego ekstraktu z propolisu wykazały potencjał jako przyjazne dla środowiska materiały opakowaniowe. Pomimo ograniczonego wpływu dodatków na wytrzymałość mechaniczną i elastyczność folii, włączenie ekstraktu z propolisu znacznie poprawiło współczynnik przepuszczalności pary wodnej (WVTR), zwiększając tym samym funkcjonalność bariery wobec wilgoci. Ponadto, przepuszczalność tlenu i dwutlenku węgla różniła się w zależności od składu folii. Folie z dodatkami wykazały również lepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie przeciwko *L. monocytogenes*. Analiza morfologii powierzchni potwierdziła integralność strukturalną uzyskanych materiałów.
- Roztwory na bazie chitozanu z dodatkiem kofeiny oraz etanolowego ekstraktu z propolisu wykazały wysoką aktywność przeciwutleniającą – przewyższającą w niektórych wariantach nawet aktywność wzorcowego Troloxu, oraz zauważalne działanie przeciwdrobnoustrojowe, zwłaszcza gdy obecne były oba dodatki. Ponadto folie chitozanowe wykazały polepszone właściwości barierowe, a zastosowanie kwasu cytrynowego jako rozpuszczalnika chitozanu spowodowało zwiększenie wydłużenia przy zerwaniu przy jednoczesnym zmniejszeniu wytrzymałości na rozciąganie, co podkreśliło znaczenie wyboru odpowiedniego rozpuszczalnika w uzyskaniu pożądanych właściwości materiału. Naturalne związki bioaktywne, takie jak kofeina i etanolowy ekstrakt z propolisu, skutecznie poprawiły właściwości funkcjonalne folii na bazie chitozanu.
- Folie chitozanowe wytworzone przy użyciu naturalnych rozpuszczalników jakimi są octy owocowe wykazały silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe ze względu na obecność związków fenolowych i kwasów organicznych. Folie chitozanowe na bazie octu wiśniowego wykazały najszersze spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego przy jednoczesnym braku działania wobec korzystnych szczepów bakterii probiotycznych. Właściwości mechaniczne folii, w szczególności wydłużenie przy zerwaniu, zależały od rodzaju użytego octu. Ponadto analiza SEM potwierdziła dobrą jednorodność wytworzonej folii. Wyniki te sugerują, że octy owocowe są obiecującą,

zrównoważoną alternatywą dla tradycyjnych rozpuszczalników w produkcji filmów chitozanowych.

- Kombuche uzyskane w wyniku fermentacji z kawy i różnych herbat (czarnej, zielonej i białej) stanowiły skuteczny rozpuszczalnik dla chitozanu, a także wzbogaciły folie o związki bioaktywne, takie jak polifenole i kwasy organiczne, zwiększając aktywność przeciwbakteryjną. Folie uzyskane przy wykorzystaniu kombuchy na bazie czarnej herbaty wykazały najszersze spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, podczas gdy folie wytworzone przy użyciu kombuchy na bazie zielonej herbaty charakteryzowały się najlepszą barierowością wobec tlenu. Badania wykazały również znaczną redukcję sorpcji i zmniejszenie właściwości higroskopijnych w porównaniu z filmami na bazie kwasu octowego. Wyniki te potwierdziły możliwe zastosowanie kombuchy jako naturalnego, wielofunkcyjnego rozpuszczalnika, który wpłynął na poprawę zarówno właściwości fizycznych, jak i przeciwbakteryjnych uzyskanych materiałów.
- Badania mechaniczne wykazały, że folia chitozanowa wytworzona przy użyciu kombuchy na bazie melisy lekarskiej jako rozpuszczalnika miała znacznie lepszą wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu w porównaniu ze standardowymi foliami na bazie kwasu octowego. Wykazały również działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko patogenom takim jak *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. enterica*. Powłoka chitozanowa pozwoliła na zachowanie wysokiej zawartości kwasu askorbinowego i wydłużenie okresu przydatności do spożycia powleczonych papryk. Zastosowana powłoka nie wpłynęła negatywnie na właściwości sensoryczne czerwonej papryki. Wyniki te potwierdziły potencjał powłok chitozanowych wytworzonych przy użyciu kombuchy jako skutecznych i przyjaznych dla konsumenta rozwiązań wspierających utrzymanie jakości oraz bezpieczeństwa świeżych produktów spożywczych.

10. Spis literary

- Abaci, N., Senol Deniz, F. S., & Orhan, I. E. (2022). Kombucha- An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chemistry*, *10*, *14*, 100302. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2022.100302>
- Adımcılar, V., Kalaycıoğlu, Z., Akın-Evingür, G., Torlak, E., & Erim, F. B. (2023). Comparative physical, antioxidant, and antimicrobial properties of films prepared by dissolving chitosan in bioactive vinegar varieties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *242*, 124735. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124735>
- Agarwal, C., Kóczán, Z., Börcsök, Z., Halász, K., & Pásztor, Z. (2021). Valorization of *Larix decidua* Mill. bark by functionalizing bioextract onto chitosan films for sustainable active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, *271*, 118409. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118409>
- Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*, *11*, 3079–3086. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.09.016>
- Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., De Feo, V., Porta, R., Fechtali, T., & Mauriello, G. (2021). Basil essential oil: composition, antimicrobial properties, and microencapsulation to produce active chitosan films for food packaging. *Foods*, *10*, *1*, 121. <https://doi.org/10.3390/foods10>
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, *101*, 129–138. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.08.066>
- Annu, Ali, A., & Ahmed, S. (2021). Eco-friendly natural extract loaded antioxidative chitosan/polyvinyl alcohol based active films for food packaging. *Heliyon*, *7*, *3*, e06550. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06550>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., Acosta, N., Velasco, H., Mecerreyes, D., Antonio, R., Gimeno, B., María Díez-Pascual, A., Moreno, V. C., & Serra, A. (2021). Chitosan: an overview of its properties and applications. *Polymers*, *13*, *19*, 3256. <https://doi.org/10.3390/POLYM13193256>
- Ashrafi, A., Jokar, M., & Mohammadi Nafchi, A. (2018). Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 444–454. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.12.028>

- Bakir, S., Devecioglu, D., Kayacan, S., Toydemir, G., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2017). Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. *European Food Research and Technology*, 243, 12, 2083–2094. <https://doi.org/10.1007/S00217-017-2908-0/METRICS>
- Borrelle, S. B., Ringma, J., Lavender Law, K., Monnahan, C. C., Lebreton, L., McGivern, A., Murphy, E., Jambeck, J., Leonard, G. H., Hilleary, M. A., Eriksen, M., Possingham, H. P., De Frond, H., Gerber, L. R., Polidoro, B., Tahir, A., Bernard, M., Mallos, N., Barnes, M., & Rochman, C. M. (2020). Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. *Science*, 369, 6509, 1515–1518. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA3656/SUPPL_FILE/ABA3656-BORRELLE-SM-DATA-S4.CSV
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8, 9, 3494–3511. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06635/ASSET/IMAGES/LARGE/SC9B06635_0009.JPEG
- Chan, E. W. C., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3, 4, 266. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.89748>
- CN104610579A - Plant starch-chitosan composite packaging film and preparation method thereof. (2025).
- Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. de L., Martínez-González, M. del C., & Hernández-Romano, J. (2019). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. *Progress in Organic Coatings*, 137, 105326. <https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2019.105326>
- Costa, S. M., Ferreira, D. P., Teixeira, P., Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Figueiro, R. (2021). Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 241–251. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.105>
- Da Silva, C., Prasniewski, A., Calegari, M. A., de Lima, V. A., & Oldoni, T. L. C. (2018). Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11, 7, 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/S12161-018-1161-X/METRICS>

- De Carli, C., Aylanc, V., Mouffok, K. M., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Tomás, A., Pereira, C., Rodrigues, P., Vilas-Boas, M., & Falcão, S. I. (2022). Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *213*, 486–497. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.05.155>
- De Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, *87*, 2, 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Abid, K., & Bakhrouf, A. (2013). Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *African Journal of Microbiology Research*, *7*, 27, 3466–3470. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1230>
- Emenike, E. C., Iwuozor, K. O., Saliu, O. D., Ramontja, J., & Adeniyi, A. G. (2023). Advances in the extraction, classification, modification, emerging and advanced applications of crystalline cellulose: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *6*, 100337. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100337>
- EUR-Lex - 21993A0216(02) - EN - EUR-Lex. (2025).
- Gunasekaran, S., Sankari, G., & Ponnusamy, S. (2005). Vibrational spectral investigation on xanthine and its derivatives—theophylline, caffeine and theobromine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *61*, 1, 117–127. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2004.03.030>
- Hasan, A. N., Antony, U., Bala, G. V., Prabha, D. T., Kavya, C., & Malik, A. F. (2021). Study on Production Vinegar from Apple. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *761*, 1, 012125. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/761/1/012125>
- Ibrahim, S. A., Salameh, M. M., Phetsomphou, S., Yang, H., & Seo, C. W. (2006). Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chemistry*, *99*, 4, 645–650. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.08.026>
- Ikram, M., Park, T. J., Ali, T., & Kim, M. O. (2020). Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and Parkinson's disease: insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9090902>
- Irigoit, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., & Basualdo, M. (2021). The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *115*, 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.06.041>

- Kaashyap, M., Cohen, M., Mantri, N., -Pelaez, M., Li, L., & Muc-Wierzgon, M. (2021). Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients*, *13*, 12, 4446. <https://doi.org/10.3390/NU13124446>
- Kara, M., Assouguem, A., Kamaly, O. M. Al, Benmessaoud, S., Imtara, H., Mechchate, H., Hano, C., Zerhouni, A. R., & Bahhou, J. (2021a). The impact of apple variety and the production methods on the antibacterial activity of vinegar samples. *Molecules*, *26*, 18, 5437. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26185437>
- Kara, M., Assouguem, A., Zerhouni, A. R., & Bahhou, J. (2021b). Phytochemical content and antioxidant activity of vinegar prepared from four apple varieties by different methods. *Tropical Journal of Natural Product Research*, *5*, 9, 1578–1585. <https://doi.org/10.26538/TJNPR/V5I9.9>
- Kasote, D., Bankova, V., & Viljoen, A. M. (2022). Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews*, *21*, 6, 1887–1911. <https://doi.org/10.1007/S11101-022-09816-1>
- Kazimierczak, R., Hallmann, E., Sokołowska, O., Rembiałkowska, E., Kazimierczak, R., Hallmann, E., Sokołowska, O., Rembiałkowska Sggw, E. (2011). Zawartość związków bioaktywnych w roślinach zielarskich z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, *56*, 3, 200–205.
- Khalid, M. Y., Al Rashid, A., Arif, Z. U., Ahmed, W., & Arshad, H. (2021). Recent advances in nanocellulose-based different biomaterials: types, properties, and emerging applications. *Journal of Materials Research and Technology*, *14*, 2601–2623. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2021.07.128>
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M. R., & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, *90*, 4, 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.037>
- Khokhar, S., & Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3, 565–570. <https://doi.org/10.1021/JF010153L>
- Koc, B., Akyuz, L., Cakmak, Y. S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Labidi, J., Ilk, S., Cekic, F. O., Akata, I., & Kaya, M. (2020). Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Bioscience*, *35*, 100545. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2020.100545>

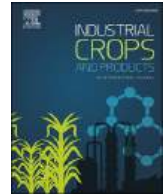
- Kola, V., & Carvalho, I. S. (2023). Plant extracts as additives in biodegradable films and coatings in active food packaging. *Food Bioscience*, 54, 102860. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102860>
- Kowalczyk, D., & Pikula, E. (2010). Wpływ jadalnej powłoki białkowo-woskowej na jakość przechowalnicza winogron (*Vitis vinifera L.*). *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 17, 5, 67–76.
- KR20160119453A- Manufacturing method of functional food packaging film for preventing greening of potato. (2015)
- Lau, W. W. Y., Shiran, Y., Bailey, R. M., Cook, E., Stuchtey, M. R., Koskella, J., Velis, C. A., Godfrey, L., Boucher, J., Murphy, M. B., Thompson, R. C., Jankowska, E., Castillo, A. C., Pilditch, T. D., Dixon, B., Koerselman, L., Kosior, E., Favoino, E., Gutberlet, J., Palardy, J. E. (2020). Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science*, 369, 6509. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA9475/SUPPL_FILE/ABA9475-LAU-SM.PDF
- Liu, Q., Tang, G. Y., Zhao, C. N., Gan, R. Y., & Li, H. Bin. (2019). Antioxidant activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars. *Antioxidants*, 8, 4. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8040078>,
- Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 8, 709–719. <https://doi.org/10.1016/J.APJT.B.2016.06.010>
- Luzón-Quintana, L. M., Castro, R., & Durán-Guerrero, E. (2021). Biotechnological processes in fruit vinegar production. *Foods*, 10, 5, 945. <https://doi.org/10.3390/FOODS10050945>
- Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant activity in bee products: a review. *Antioxidants*, 10, 1, 1–42. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10010071>
- Morrish, C., Whitehead, F., Istivan, T., & Kasapis, S. (2022). The effect of trisodium phosphate crosslinking on the diffusion kinetics of caffeine from chitosan networks. *Food Chemistry*, 381. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132272>
- Moț, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., & Sârbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 4–5, 516–522. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2010.11.006>
- Nasrin, T. A. A., Rahman, M. A., Islam, M. N., Arfin, M. S., & Akter, L. (2018). Effect of edible coating on postharvest quality of bell pepper at ambient storage. *Bulletin Of The Institute Of Tropical Agriculture Kyushu University*, 41, 73-83. <https://doi.org/10.11189/BITA.41.73>

- Nehlig, A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological Reviews*, 70, 2, 384–411. <https://doi.org/10.1124/PR.117.014407>
- Ong, G., Kasi, R., & Subramaniam, R. (2021). A review on plant extracts as natural additives in coating applications. *Progress in Organic Coatings*, 151. <https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2020.106091>
- Ousaaid, D., Laaroussi, H., Bakour, M., Ennaji, H., Lyoussi, B., & El Arabi, I. (2021). Antifungal and antibacterial activities of apple vinegar of different cultivars. *International Journal of Microbiology*, 1, 6087671. <https://doi.org/10.1155/2021/6087671>
- Özen, M., Özdemir, N., Ertekin Filiz, B., Budak, N. H., & Kök-Taş, T. (2020). Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) vinegars produced from fresh fruit or juice concentrate: Bioactive compounds, volatile aroma compounds and antioxidant capacities. *Food Chemistry*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125664>
- Park, J. H., & Kim, H. J. (2023). Modeling and scenario-based risk estimation of *Listeria monocytogenes* in meatballs and Sundae, a Korean black pudding, under different packaging conditions. *Food Control*, 152, 109886. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109886>
- Park, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 67, 1, 194–197. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2002.TB11382.X;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Pennells, J., Godwin, I. D., Amiralian, N., & Martin, D. J. (2020). Trends in the production of cellulose nanofibers from non-wood sources. *Cellulose*, 27, 2, 575–593. <https://doi.org/10.1007/S10570-019-02828-9/METRICS>
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24, 11. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112047>
- Ren, M., Wang, X., Tian, C., Li, X., Zhang, B., Song, X., & Zhang, J. (2017). Characterization of organic acids and phenolic compounds of cereal vinegars and fruit vinegars in china. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, 3, e12937. <https://doi.org/10.1111/JFPP.12937;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:17454549;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Rollini, M., Mascheroni, E., Capretti, G., Coma, V., Musatti, A., & Piergiovanni, L. (2017). Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. *Food Packaging and Shelf Life*, 14, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2017.08.011>

- Savin, S., Craciunescu, O., Oancea, A., Ilie, D., Ciucan, T., Antohi, L. S., Toma, A., Nicolescu, A., Deleanu, C., & Oancea, F. (2020). Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of chitosan preparations extracted from Ganoderma Lucidum Mushroom. *Chemistry and Biodiversity*, 17, 7. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202000175>,
- Schmid, M., Zillinger, W., Müller, K., & Sänglerlaub, S. (2015). Permeation of water vapour, nitrogen, oxygen and carbon dioxide through whey protein isolate based films and coatings – permselectivity and activation energy. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2015.08.002>
- Shahbazi, H., Hashemi Gahruie, H., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H., & Movahedi, M. (2018). Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science & Nutrition*, 6, 8, 2568–2577. <https://doi.org/10.1002/FSN3.873>
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 8, 770–775. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.04.003>
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.06.001>
- Stanicka, K., Dobrucka, R., Woźniak, M., Sip, A., Majka, J., Kozak, W., & Ratajczak, I. (2021). The effect of chitosan type on biological and physicochemical properties of films with propolis extract. *Polymers*, 13, 22, 3888. <https://doi.org/10.3390/POLYM13223888>
- Stefanowska, K., Woźniak, M., Dobrucka, R., & Ratajczak, I. (2023). Chitosan with natural additives as a potential food packaging. *Materials*, 16, 4, 1579. <https://doi.org/10.3390/MA16041579>
- Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X., & Guo, Y. (2017). Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 163, 81–91. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.01.016>,
- Talebi, H., Ghasemi, F. A., & Ashori, A. (2022). The effect of nanocellulose on mechanical and physical properties of chitosan-based biocomposites. *Journal of Elastomers and Plastics*, 54, 1, 22–41. <https://doi.org/10.1177/00952443211017169>
- Tang, W., Wang, J., Hou, H., Li, Y., Wang, J., Fu, J., Lu, L., Gao, D., Liu, Z., Zhao, F., Gao, X., Ling, P., Wang, F., Sun, F., & Tan, H. (2023). Review: Application of chitosan and its

- derivatives in medical materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240, 124398. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124398>
- Tanticharakunsiri, W., Mangmool, S., Wongsariya, K., & Ochaikul, D. (2021). Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. *Journal of Food Biochemistry*, 45, 1. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13574>,
- Teixeira-Costa, B. E., & Andrade, C. T. (2021). Natural polymers used in edible food packaging—history, function and application trends as a sustainable alternative to synthetic plastic. *Polysaccharides*, 3, 1, 32-58. <https://doi.org/10.3390/POLYSACCHARIDES3010002>
- Thambiliyagodage, C., Jayanetti, M., Mendis, A., Ekanayake, G., Liyanaarachchi, H., & Vigneswaran, S. (2023). Recent advances in chitosan-based applications— A Review. *Materials*, 16, 5, 2073. <https://doi.org/10.3390/MA16052073>
- Van Dam, R. M., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2020). Coffee, caffeine, and health. *New England Journal of Medicine*, 383, 4, 369–378. [https://doi.org/10.1056/NEJMRA1816604/SUPPL_FILE/NEJMRA1816604_DISCLOSURE S.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMRA1816604/SUPPL_FILE/NEJMRA1816604_DISCLOSURE_S.PDF)
- Vohra, B. M., Fazry, S., Sairi, F., & Babul-Airianah, O. (2019). Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15, 2–1, 298–302. <https://doi.org/10.11113/MJFAS.V15N2-1.1536>
- Wang, J., & Zhuang, S. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131825. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.131825>
- Wu, Y. W., Sun, S. Q., Zhao, J., Li, Y., & Zhou, Q. (2008). Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 883–884, 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2007.12.009>
- Yeul, V. S., & Rayalu, S. S. (2013). Unprecedented chitin and chitosan: a chemical overview. *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 2, 606–614. <https://doi.org/10.1007/S10924-012-0458-X/METRICS>
- Yildiz, E. (2023). Characterization of fruit vinegars via bioactive and organic acid profile using chemometrics. *Foods*, 12, 20, 3769. <https://doi.org/10.3390/FOODS12203769/S1>

- Yuan, G., Chen, X., & Li, D. (2016). Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*, *89*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.10.004>
- Zhang, W., Jiang, Q., Shen, J., Gao, P., Yu, D., Xu, Y., & Xia, W. (2022). The role of organic acid structures in changes of physicochemical and antioxidant properties of crosslinked chitosan films. *Food Packaging and Shelf Life*, *31*. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100792>
- Zhang, W., Zhang, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2021). Improving the performance of edible food packaging films by using nanocellulose as an additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 288–296. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.185>
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J., & Perera, C. O. (2021). Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: a review. *Foods*, *10*, 6, 1360. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061360>



Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials

Karolina Stefanowska^{a,*}, Matthias Bucher^b, Corina L. Reichert^b, Anna Sip^c,
Magdalena Woźniak^a, Markus Schmid^b, Renata Dobrucka^d, Izabela Ratajczak^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, Poznań 60625, Poland

^b Albstadt-Sigmaringen University, Faculty of Life Sciences, Sustainable Packaging Institute SPI, Anton-Günther-Strasse 51, Sigmaringen 72488, Germany

^c Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, Poznań 60627, Poland

^d Department of Industrial Products and Packaging Quality, Institute of Quality Science, Poznań University of Economics and Business, Al. Niepodległości 10, Poznań 61875, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Chitosan
Nanocellulose
Propolis
Packaging materials

ABSTRACT

The increasing interest in sustainable materials has led to a growing exploration of natural biopolymers as matrices for these materials. Chitosan, valued for its biocompatibility and biodegradability, is a valuable raw material for eco-friendly products. This study assessed the impact of incorporating cellulose nanofibrils (CNF) and propolis extract (EEP) on the mechanical, physical, structural, gas barrier, and antimicrobial properties of chitosan-based films, especially within the scope of their prospective use in the packaging industry. The addition of cellulose nanofibrils and propolis extract to the chitosan matrix did not affect the tensile strength and elongation at break of the obtained films compared with the pure chitosan film. The addition of CNF and EEP to chitosan had effect on barrier properties (water vapor transmission rate, carbon dioxide transmission rate and oxygen transmission rate) of films. The inclusion of propolis extract to chitosan-nanocellulose film caused the antibacterial activity (against *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*) of the produced films and lack of activity against probiotic bacterial strains (*Lactocaseibacillus rhamnosus* and *Lactiplantibacillus plantarum*). The findings provide valuable insights into the development of sustainable and antimicrobial materials intended for packaging food, addressing environmental concerns.

1. Introduction

There is an increasing interest in materials made from natural biopolymers around the world, which is associated with increasing environmental degradation. Polysaccharides, including chitosan, cellulose, agar or starch are increasingly appreciated in the materials industry due to their biocompatibility and ability to degrade naturally (Baranwal et al., 2022; Jayakumar et al., 2010). Polysaccharides can be easily obtained from a number of sources, which are very often a waste product of various processing industry, such as chitosan, which is produced from the shells of crabs or shrimp, making these raw materials readily available and cost-effective to obtain (Baranwal et al., 2022; Stefanowska et al., 2023a).

Chitosan plays an important role among polysaccharides used for biomaterials because of its characteristics as biocompatibility,

biodegradability, nontoxicity, and antimicrobial activity, finding broad usage across various industries (Pellá et al., 2018; Riva et al., 2011). Chitosan can be used to make dressing materials, implants, or drug carriers (Dong et al., 2020; Irastorza et al., 2021; Pellá et al., 2018). It is also a promising polymer for application as a matrix in biodegradable and natural composite materials (Dutta et al., 2021; Tian and Liu, 2020). Research is currently underway to expand the applicability of chitosan in the packaging industry, while looking for ways to improve the mechanical and gas barrier properties of chitosan-based materials. One of the solutions that can contribute to the improvement of chitosan-based composites is the addition of nanocellulose.

Nanocellulose, as one of the most promising materials in the realm of materials science and nanotechnology, is gaining increasing attention from scientists and industry (Trache et al., 2020). Nanocellulose is derived from cellulose and is characterized by very small particle sizes at

* Corresponding author.

E-mail address: karolina.stefanowska@up.poznan.pl (K. Stefanowska).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119112>

Received 25 February 2024; Received in revised form 12 June 2024; Accepted 28 June 2024

Available online 9 July 2024

0926-6690/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

the nanometer level. Cellulose, from which nanocellulose is derived, as a primary element of plant cell structure, is among the most prevalent natural polymers in the world (Mishra et al., 2018; Pennells et al., 2020). Nanocellulose can be divided into three categories: cellulose nanocrystals (CNC), cellulose nanofibrils (CNF), and bacterial cellulose (BC) (Emenike et al., 2023). Different forms of nanocellulose can be produced by using different techniques and by using different raw materials. The structure and size of nanocellulose depend on the starting material, isolation conditions, and additional processing (Emenike et al., 2023; Salimi et al., 2019; Zinge and Kandasubramanian, 2020). Nanocellulose is a material of great scientific interest and wide potential applications due to its properties such as elastic modulus, tensile strength, tailored aspect ratios, large specific surface area, easy surface functionalization, tunable crystallinity, high degree of polymerization, and high chemical resistance (Fagone et al., 2017; Khalid et al., 2021; Onuaguluchi and Bantia, 2016). Over the past few years, there has been increasing attention towards possibility of using nanocellulose as an additive to biopolymer film matrices to improve their mechanical properties, gas permeability, or water resistance (Baranwal et al., 2022). Numerous literature data show that the addition of nanocellulose to the matrix of films has positively improved the mechanical or barrier properties, among others, regarding films produced on the basis of starch (Othman et al., 2021; Patil et al., 2022), alginate (Huq et al., 2012; Lavrič et al., 2021; Zhang et al., 2021), gelatin (Kwak et al., 2020; Mondragon et al., 2015), or chitosan (Blilid et al., 2020; Talebi et al., 2022; Yin et al., 2019).

In the case of biopolymer materials with potential applications in the packaging industry, it is important that these materials, in addition to good mechanical or barrier properties, enable the production of active packaging, i.e. packaging that also has antimicrobial properties and prevents the rapid spoilage of packaged food. Despite the established antimicrobial activity of chitosan solution, studies have shown that materials produced on its basis do not exhibit this activity (Foster and Butt, 2010). Therefore, it is necessary to use additives to the chitosan matrix to provide the materials with antimicrobial activity. The literature findings suggest that chitosan-based films with propolis extract showed activity against various pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* or *Salmonella* Enteritidis (Siripatrawan and Vitchayakitti, 2016; Stanicka et al., 2021).

Propolis is a natural material gathered by bees from diverse plant and tree species, having various pharmacological properties (antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer), thanks to which it is used in various industries (Frag et al., 2021; Irigoiti et al., 2021; Šuran et al., 2021; Vică et al., 2021). Propolis extracts have shown effectiveness against pathogenic microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* (Almuhayawi, 2020; Petrucci et al., 2020; Pobiega et al., 2019). The wide biological activity of propolis extracts is based on its complex chemical composition, which includes numerous groups of compounds, such as phenolic acids and their esters, flavonoids, terpenes, amino acids, as well as vitamins and minerals (De Vita et al., 2022; Frag et al., 2021; Ożarowski et al., 2022).

The study was conducted to assess the impact of varying nanocellulose concentration and addition of propolis extract on mechanical, physical, structural and antibacterial properties of chitosan-based films to assess their potential for use in the sector focused on packaging for food products.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Crab shells chitosan (CHT) and Tween 20 were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), acetic acid from Avantor Performance Materials (Gliwice, Poland), nanocellulose (CNF) from Cellulose Lab (Fredericton, Canada), and ethanolic propolis extract (EEP) from

PROP-MAD (Poznań, Poland). Tryptic Soy Broth, Mueller-Hilton Agar and phosphate buffered saline were purchased from Graso Biotech (Starogard Gdański, Poland). Ethylene glycol and diiodomethane were from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany). Deionized water (max conductivity 0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$) was purified using Milli-Q Ultra-pure Water System (Merck Millipore, Burlington, USA).

2.2. Preparation of chitosan-based films

Crab shells chitosan (8 g) was dissolved in 3 % acetic acid solution (800 ml) and homogenized using laboratory homogenizer Ika (Warsaw, Poland).

The chitosan-based film with nanocellulose was prepared by addition of nanocellulose to chitosan solution dissolved in 3 % acetic acid (800 ml), to obtain final concentrations of nanocellulose in solutions equal to 0.25 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 % w/v.

The chitosan films with nanocellulose and propolis were produced by mixing of chitosan-nanocellulose solutions (400 ml) with CNF concentrations of 0.25 % and 0.5 % with ethanolic propolis extract to obtain a final propolis concentration of 1 %. Additionally, Tween 20 (4 ml) was added to the solutions.

All chitosan-based solutions were homogenized using laboratory homogenizer Ika (Warsaw, Poland) transferred to Petri dishes lined with Teflon and finally dried at room temperature for 24 h.

The symbols and compositions of all chitosan-based films are presented in Table 1.

2.3. Mechanical tests

The mechanical properties of the films (1.5 cm \times 10 cm strips) were assessed via an Instron testing machine (model 5965, Instron, USA) in accordance with ASTM D882–12 at a testing speed of 100 mm/min. The mean values of the samples' measurements were documented for mechanical characteristics, encompassing tensile strength (TS) and elongation at break (EB).

2.4. Physical tests

2.4.1. Water vapor transmission rate

For water vapor transmission rate (WVTR) measurement, a gravimetric screw cup method was conducted in accordance with the DIN 53 122–1 standard. The constructions were stored in a climate chamber (KMF720, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) at 23°C and 85 % relative humidity (R.H.). WVTR was calculated based on the change in weight according to Eq. 3.

$$WVTR = Q = \frac{24}{t} \times \frac{\Delta m}{A} \times 10^4 \quad (3)$$

Where: Q – water vapor transmission rate ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$; where d – day); t – time between two weighing measurements (h); Δm – the difference in weight of two successive weighing measurements (g); A – the testing surface area (m^2).

The mean value of the WVTR of each sample was calculated from the steady-state values (deviation <10 % from the calculated mean) of three

Table 1
Symbols of chitosan-based films.

Symbol	Nanocellulose (%)	Propolis extract (%)
A	–	–
B	0.25	–
C	0.5	–
D	0.75	–
E	1	–
F	0.25	1
G	0.5	1

succeeding measurement points. The difference between two successive weightings, related to the same time period, remained within 5 % constancy, while the increase in mass between successive weightings was at minimum 5 mg. The values for Q and Q_{mean} are expressed in the unit of ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$) and are normalized to a thickness (d) of $100 \mu\text{m}$ (Q_{100}) using Eq. (4):

$$Q_{100: \text{WVTR}} = Q_{\text{mean}} \times \frac{d}{100\mu\text{m}} \quad (4)$$

Five different films of each variant were analyzed.

2.4.2. Oxygen and carbon dioxide transmission rate

The measurements were carried out at 23°C and 50 % R.H. in accordance with ISO 15105-1:2007-10 using the differential pressure method. The measurement was performed with the GTT measuring instrument (Brugger Feinmechanik GmbH, Munich, Germany). The specimens were conditioned in a climate chamber (KMF720, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) for at least 48 h at 23°C and 50 % R.H. After oxygen transmission rate (OTR) measurement, the carbon dioxide transmission rate (CO_2TR) was determined (23°C , 50 % R.H.) directly afterwards in the identical procedure using the same sample. The respective thickness normalized to $100 \mu\text{m}$ (Q_{100}) was calculated from the corresponding OTR and CO_2TR values according to the following Eqs. (5 and 6).

$$Q_{100: \text{OTR}} = \text{OTR} \times \frac{d}{100\mu\text{m}} \quad (5)$$

$$Q_{100: \text{CO}_2\text{TR}} = \text{CO}_2\text{TR} \times \frac{d}{100\mu\text{m}} \quad (6)$$

A two replicates determination was carried out for all sample types.

2.4.3. Surface free energy

The determination of the surface energy and the dispersive and polar part was carried out using the sessile drop method of a contact angle measurement device (DSA30, KRÜSS GmbH, Hamburg, Germany) according to DIN EN ISO 19403-2:2020-04. The samples were manual sliced into strips of 1×4 cm and fixed on a holder using double-sided adhesive tape. Deionized water, ethylene glycol, and diiodomethane were used as test liquids. Three droplets of $2 \mu\text{l}$ each were applied to the samples for measurement. Up to 20 measurements were taken for each droplet, captured and measured for 2 s after the droplet has been placed on the surface and a waiting time of 1 s has elapsed. The samples were measured at room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and relative humidity of 50 ± 5 %. The evaluation was carried out according to the method of Owens, Wendt, Rabel and Kaelble described in DIN EN ISO 19403-2:2020-04. Five different films of each variant were analyzed.

2.4.4. Film thickness

The chitosan-based samples were analyzed for their film thickness using the precision thickness device (FT3, Rhopoint Instruments Ltd., St. Leonards-on-Sea, United Kingdom). The measurement was carried out at room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and 50 ± 5 % relative humidity with a fivefold determination at different measuring points on the film sample. The mean value, of the film thickness measurement was used to determine the standardized gas permeability values (Q_{100}).

2.5. Structural characterization

2.5.1. Infrared spectroscopy

The spectra of the films were obtained using a Nicolet iS5 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), recording 32 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} in the range of $4000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$. The spectrometer was equipped with deuterated triglycine sulfate detector and an attenuated total reflectance (ATR) diamante cell.

2.5.2. Scanning electron microscopy

Structure and morphology of tested materials were performed with an Evo 40 scanning electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating in beam mode at 20 kV with a secondary electron detector.

2.6. Antibacterial activity

The antibacterial effect of chitosan-based films was evaluated against four bacterial strains, including *Bacillus subtilis* (food isolate), *Listeria monocytogenes* (food isolate), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (ATCC 53103) and *Lactiplantibacillus plantarum* 299 v (isolate from the commercial product SanProbi IBS) by the diffusion method. The strains from criobanks (bacteria storage system, MAST Diagnostica), in which they were stored at -20°C , were transferred to Tryptic Soy Broth (TSB) and incubated at 37°C for 18–24 h, depending on the strain and its growth rate. Then the strains were transferred to 10 ml of sterile TSB medium and grown at 37°C for the next 18–24 h. After culturing the bacterial biomass were collected by centrifugation (4.500 rpm, 10 min) and suspended in phosphate buffered saline (PBS). The cell suspensions were spectrophotometrically adjusted to O.D. $600 \text{ nm} = 0.5$ (equivalent to 1.5×10^8 CFUs/ml) and used for inoculation of plates with Mueller-Hilton Agar. Next, 10×10 mm pieces of film were placed on such prepared plates (to the surface of the inoculated medium) and incubated at 37°C for 24 h. After incubation the growth inhibition zones were measured using a Computer Scanning System (MultiScaneBase v14.02). Antibacterial activity was expressed in mm of the inhibition zones.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses included factorial one-way ANOVA, followed by Tukey's honest significant difference (HSD) test at $\alpha = 0.05$. All statistical analyses were performed using the TIBCO Software Inc. Statistica version 13.3 (Palo Alto, CA, USA) and Minitab software version 21.4.1 (Minitab GmbH; Munich, Germany).

3. Results

3.1. Mechanical parameters of chitosan-based films

Fig. 1 illustrates the outcomes of mechanical tests conducted on chitosan-based films, represented by TS and EB.

The tensile strength values of chitosan films ranged from 60 (sample A, CHT film) to 78.30 MPa (sample B, CHT/0.25CNF film). The addition of cellulose nanofibrils in the entire tested concentration range (0.25 % – sample B to 1 % – sample E) to the chitosan matrix did not affect their tensile strength, which was confirmed by statistical analysis. Literature data indicate that the incorporation of various types of nanocellulose in the chitosan matrix improves the mechanical properties of the obtained films, resulting in an increase in tensile strength and Young's modulus (Costa et al., 2021; Talebi et al., 2022). However, the concentrations of nanocellulose introduced into chitosan by other authors were much higher (up to 50 wt%) compared with the CNF content used in this study. Costa et al. (2021) examined the effect of cellulose nanocrystals content (5, 10, 25 and 50 wt%) on tensile strength of CNC-chitosan films and found that only addition of 50 wt% CNC caused statistically significant increase in TS parameter compared with films with lower CNC content. In turn, Talebi et al. (2022) stated that tensile strength of chitosan-nanocellulose composite material increased with the increasing content of nanocellulose (from 1 % to 7 %) in chitosan matrix. Therefore, the lack of a statistically significant effect of the addition of cellulose nanofibrils on the tensile strength of final materials may be related to too low range of CNF concentrations used. Also, addition of ethanolic propolis extract did not effect on TS parameter of the obtained films. The results presented in the literature indicate that the addition of propolis extract to the chitosan solution resulted in an increase in the mechanical parameters of chitosan-propolis films, while a significant

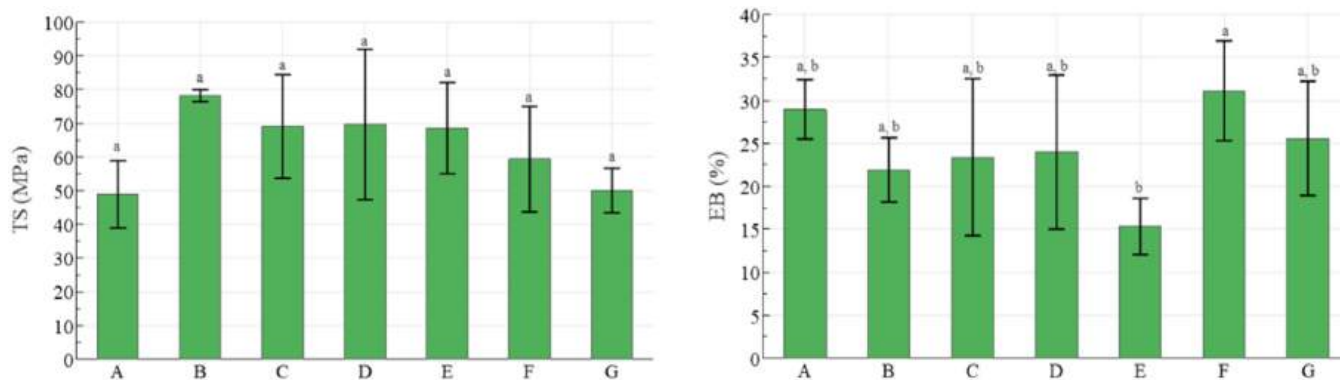


Fig. 1. The tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of chitosan-based films. Different letters above the bars correspond to samples statistically different ($p = 0.05$).

improvement was observed in the case of the use of a high propolis content of approximately 20 % (De Carli et al., 2022; Siripatrawan and Vitchayakitti, 2016). Therefore, as in the case of CNF, the concentration of EEP added to the chitosan matrix was too low to show a statistical effect on the mechanical parameters of the obtained films.

The highest value of elongation at break (31.16 %) was determined for film consisted of chitosan with 0.25 % CNF and 1 % EEP (sample F), while the lowest value (15.39 %) was observed for samples based on chitosan and 1 % CNF (sample E). Statistical analysis confirms that the concentration of CNF added to chitosan had no effect on EB values of the obtained films. The results of the research by Talebi et al. (2022) indicated that chitosan-based films with nanocellulose (cellulose nanofibers and cellulose nanocrystals) showed improved EB values with increasing nanocellulose content (from 1 to 7 wt%) compared with pure chitosan films. In turn, Khan et al. (2012) stated decrease in EB value from 8.58 % (pure chitosan film) to 3.95 % (chitosan-based film with 10 % w/w content of nanocrystalline cellulose). A similar decrease in the EB value for chitosan films after the addition of cellulose nanocrystals to the chitosan matrix was observed by Li et al. (2009). The reduction in EB values of chitosan films after incorporation of nanocellulose is caused by strong interactions between filler and matrix, which restricted the motion of the matrix and hence decreased elongation at break (Azeredo et al., 2010; Li et al., 2009). In turn, higher elasticity of sample F (CHT/0.25 %CNF/1 %EEP) could be due to the interaction between the hydrophilic groups of chitosan and the polyphenolic compounds of propolis, resulting in a tightening of the polymer chain-chain interaction and leading to stronger interfacial adhesion and higher tensile strength (Zehra et al., 2022).

Literature data indicate that the incorporation of nanocellulose into the chitosan matrix affects the mechanical behavior (tensile strength and elongation at break) of the obtained films, but many parameters, such as the type of nanocellulose, the type of acid used to dissolve chitosan, as well as the concentration of nanocellulose and plasticizer have a notable influence on these characteristics (Azeredo et al., 2010; Costa et al., 2021; Talebi et al., 2022; Velázquez-Cock et al., 2014).

3.2. Physical characterization of films

3.2.1. Water vapor transmission rate

The barrier properties of packaging materials are crucial for preserving products. The barrier properties of active films and edible coatings are directly linked to their capacity to preserve food, typically demonstrated by their water vapor permeability (Zhang et al., 2022). Furthermore, limiting the passage of water vapor and oxygen through the packaging is essential to prevent both the growth of microorganisms and the degradation of certain active substances (Zehra et al., 2022). Therefore, the water vapor transmission rate (WVTR), oxygen transmission rate (OTR) and carbon dioxide transmission rate (CO_2TR) by the

obtained materials were determined. Modifications and additives applied to chitosan films unquestionably hold significant importance and can influence their barrier properties. Based on the literature, it is known that the factors affecting the WVTR values of chitosan films are the molecular weight and deacetylation rate of chitosan, and the type and amount of plasticizers added and the sample preparation conditions (Ashrafi et al., 2018). The findings of the WVTR measurement of the chitosan-based films are summarized and displayed in Fig. 2. The mean values for the films without the addition of propolis range from 65 to 75 ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$). Although the transmission rate shows a slight increase on average with increasing nanocellulose content, no statistically significant differences could be detected between the samples with symbols A to E. When comparing these values with those of Wiles et al. (2000) on chitosan films without additive, the samples show a reduced WVTR and thus improved water vapor permeability. If these values are calculated to a comparable thickness-normalized Q_{100} value, the value is around 125 ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$) with an almost comparable moisture gradient of 84 % R.H. to 0 % R.H. Such a result can be explained by the presence of nanocellulose nanoparticles with a dense crystalline structure, which form an impermeable barrier to the diffusion of water molecules through the films. The diffusing water molecules have to move along a curved track instead of a straight path through the clean films. As a result, their rate of permeation is slowed down. An alternative explanation for the reduced water vapour permeability is the thickening of the surface layers and partial closure of the surface pores due to the presence of the nanocellulose molecule (Poonguzhali et al., 2017; Taheri et al., 2020). It was found that the average transmission rate of films with nanocellulose was significantly lower than the average transmission rate of films with propolis extract added.

Furthermore, Fig. 2 illustrating the remarkable increase for those

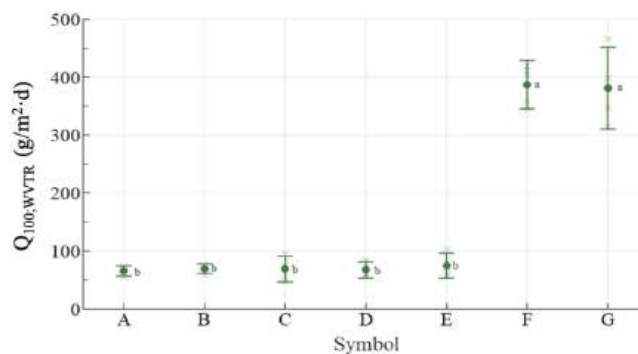


Fig. 2. $Q_{100,WVTR}$ for the chitosan-based films. Interval bars show the 95 % confidence intervals, dots represent the individual mean values, the crosses indicate the results of the individual measurements. The small letters next to the mean values indicate the significant differences at $p = 0.05$.

samples F and G with added propolis to values of 387 and 380 (g/m²-d), respectively. This suggests that propolis has a significant impact on the WVTR of these chitosan-based films and should possibly be considered as an important component for adjusting their water vapor transmission rate. What makes this significant increase in WVTR particularly interesting is that in a previous study the addition of propolis extract to various types of chitosan film led to a reduction. For example, although propolis extract at 0.75 % concentration initially led to an increase in the measured WVTR, the increased addition of propolis extract (2.5 and 5 %) led to a significant reduction below the WVTR of the untreated chitosan types (Stanicka et al., 2021). In addition, there was also a decreasing trend in WVTR determined with increasing propolis concentration (0 – 20 %) in chitosan-based films (De Carli et al., 2022; Siripatrawan and Vitchayakitti, 2016).

3.2.2. Oxygen and carbon dioxide transmission rate

Oxygen, as is well known, is highly reactive and exhibits strong oxidising properties. The limitation of oxygen permeation through packaging is essential in reducing the oxidation of food products (Costa et al., 2021). Therefore, the oxygen transmission rate for prepared films was assessed. With regard to oxygen permeability, it was noticeable that all mean values of the measurements were below 3 (cm³/m²-d) (Fig. 3). This indicates that the samples tested generally exhibit a good barrier to oxygen with regard to application in the packaging sector. Such results were also observed in the international literature. The incorporation of nanocellulose resulted in an improvement in the oxygen barrier properties of the biopolymers. This correlated with an increase in crystallinity, loss of chain mobility and low free volume upon addition of nanocellulose to the polymer matrix, as discussed previously (Costa et al., 2021; Lavrič et al., 2021, Zhang et al., 2021).

EEP incorporation caused a barrier to oxygen reduction. Samples to which propolis extract was added as an additive showed slightly higher average oxygen permeability values of 2.5 and 2.7 (cm³/m²-d). This suggests that propolis may affect the oxygen permeability of the films. The effect of phenolic compounds on the decrease in barrier properties of chitosan matrices against oxygen was also observed by Siripatrawan and Vitchayakitti (2016) who used propolis and cinnamon oil in their study. This may be due to the presence of flavonoids in the film, which disrupt the ordered structure of the film, causing a reduction in the crystallinity of the film structure and, consequently, increased diffusivity of the material (Liu et al., 2017).

In terms of carbon dioxide permeability, samples generally showed a reduced rate of CO₂ transmission compared with oxygen. For samples A to E, a value of 1.2–2.5 (cm³/m²-d) was observed. Comparable to the Q_{100;OTR}, again samples F and G showed the highest Q_{100;CO₂TR} values, which could indicate a particular material composition or structure favoring CO₂ transmission (Fig. 4). The main interesting points here are that CO₂TR values were generally lower than the OTR values. In the packaging sector, by contrast, this is not the case with common (mostly

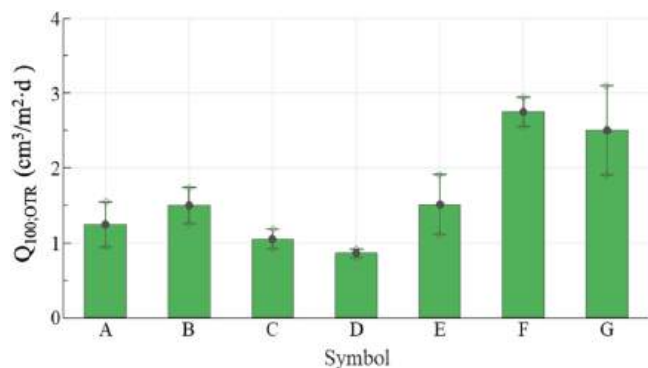


Fig. 3. Q_{100;OTR} for the chitosan-based films. Interval bars show one standard error from the mean, dots represent the individual mean values.

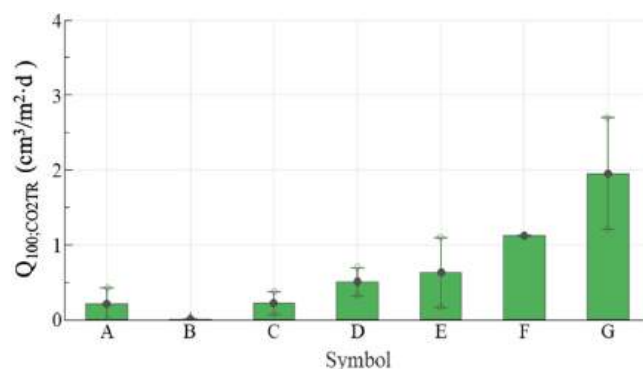


Fig. 4. Q_{100;CO₂TR} for the chitosan-based films. Interval bars show one standard error from the mean, dots represent the individual mean values.

petrochemically based) polymers. The permeation for CO₂ is approx. 3–4 times higher for these common polymers such as PP, PET or PE (Schmid et al., 2015). This special effect is presumably due to the ambient humidity caused by the measurement conditions in humid air on the one hand, and to the production or dissolution of the chitosan on the other. Kurek et al. (2012) observed a similar reversal of the perm selectivity of aqueous acid solvent chitosan in measurements but only for measurements with >96 % (humid gas) and without glycerol. This described perm selectivity was also previously observed with chitosan-acetic acid complex membranes by Bai et al. (1988). One possible reason for this effect could be the increased solubility of CO₂ in water. Which is greater by a factor of 26 for CO₂ than for O₂ at 25°C (Kurek et al., 2012).

This effect could be very interesting in the area of food packaging, because in many packages of fresh products with high moisture levels inside, modified gas atmosphere packaging with CO₂ is used to prolong the duration of shelf life. This type of material could be of interest here in order to maintain the ideal CO₂ values for longer, or perhaps to achieve material reductions compared with conventional packaging. Patented applications leveraging the unique characteristics of chitosan, particularly in the form of films for food packaging, have already been developed (EP1245617A1, 2003).

3.2.3. Surface free energy

The surface free energy test allows the surface activity of the solid under investigation to be determined. For the tested samples, the value of surface free energy is in the range 28–41 (mN/m). The obtained result is within the range of surface free energy values for plastics. The adhesive strength of packaging materials holds significant practical importance, as it determines the effectiveness of bonding for gluing or printing. The low surface free energy of most polymers is the cause of poor coating adhesive. The surface free energy analysis showed

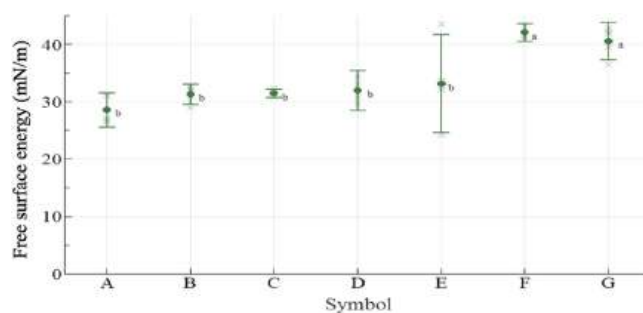


Fig. 5. Free surface energy for the chitosan-based films. Interval bars show the 95 % confidence intervals, dots represent the individual mean values, the crosses indicate the results of the individual measurements. The small letters next to the mean values indicate the significant differences at $p = 0.05$.

significant differences between samples with and without the addition of EEP (Fig. 5). Hence, incorporating propolis extract enhances the adhesion of the resulting packaging materials. For the samples lacking propolis extract incorporation, there seemed to be a slight upward trend in the mean values. However, due to the confidence intervals, it is not possible to conclude that there was a significant increase in surface energy as a function of the amount of nanocellulose. A particularly large variance of the values was observed for the samples with the label E, which represents the highest concentration of nanocellulose.

3.3. Structural characterization of films

3.3.1. Infrared spectroscopy

Incorporating CNF into the chitosan matrix induced minor alterations in the structure of the resulting film, as shown in Fig. 6.

In the spectrum of pure chitosan film (sample A) and CHT/0.25 % CNF film (sample C), bands characteristic of polysaccharide materials are observed. The bands observed at 3340 and 3285 cm^{-1} can be correspond to N-H and/or O-H stretching vibration, as well as intramolecular hydrogen bonds. The absorption band at 2880 cm^{-1} can be describe to C-H asymmetric stretching vibrations (Costa et al., 2021; Panahian et al., 2014; Queiroz et al., 2014). The bands at 1640 and 1555 and 1340 cm^{-1} can be attributed to amide I (C=O stretching), amide II (N-H bending), and amide III (C-N stretching), respectively (Annu et al., 2021; Koc et al., 2020). The bands at 1155 and 1030 cm^{-1} can be assigned to symmetric stretching of C-O-C bond and C-O stretching vibrations, respectively (Costa et al., 2021; Koc et al., 2020). In turn, the band at 895 cm^{-1} come from β -glycosidic linkages in the cellulose structure (Costa et al., 2021).

The addition of propolis extract to CHT/CNF film-forming solution caused changes in the structure of obtained films, as presented in Fig. 7. The main changes visible in the IR spectra of the CHT/CNF/EEP films are related to the presence of propolis components, mainly phenolic compounds. The peaks at 2925 and 2855 cm^{-1} can be connected with stretching modes of C-H, arising from methyl and methylene groups. The peak at 1700 cm^{-1} indicates the C=O bond, which is presented in propolis constituents, such as lipid or phenols. The peak at 1640 cm^{-1} may be assigned to C=O, C=C, N-H bonds from amino acids and flavonoids, while the band at 1605 cm^{-1} to C=C in aromatic and/or C=O in amide. The bands observed at 1515 and 1455 cm^{-1} (C=C) were associated with the aromatic rings of phenolic compounds in the propolis. In turn, the bands between 1300 and 1020 cm^{-1} may represent C-O stretching and C-OH bending vibration from propolis components – carboxylic acid, ethers, esters and alcohols, which are functions found

mainly in phenolic compounds (Correa-Pacheco et al., 2019; da Silva et al., 2018; Moř et al., 2011; Surek et al., 2022; Wu et al., 2008).

3.3.2. Scanning electron microscopy

The surface morphology of the pure chitosan film (sample A) was almost identical to chitosan-nanocellulose films (samples B-E) what was shown in Fig. 8. The surface of these samples was generally smooth, dense, and free of cracks and pores, suggesting good structural integrity and homogeneous structure of the obtained films.

In the case of chitosan films with CNF and EEP (sample F and G) as shown in Fig. 9, an integrated structure but with deliquescent bulges was observed, which may be related to the presence of insoluble propolis components.

3.4. Antibacterial activity of films

The chitosan-based film samples were characterized by different antibacterial effect. The pure chitosan film and CHT/CNF films did not exhibited activity any of the bacterial strains tested (data not shown). The antibacterial effect of CHT/CNF/EEP films are outlined in Table 2.

The literature data indicate that films prepared with chitosan and different type of nanocellulose showed varied activity against tested bacterial strains (Costa et al., 2021; Talebi et al., 2022). Research conducted by other researchers has indicated that films composed of chitosan dissolved in acetic acid with the inclusion of bacterial nanocellulose did not exhibit any significant inhibitory effects against *S. aureus*, in contrast to chitosan-nanocellulose films in which lactic acid was applied to the dissolved chitosan (Velásquez-Cock et al., 2014). In turn, Costa et al. (2021) indicated that the chitosan films both without and with cellulose nanocrystals (in the concentration range of 5–50 %) showed a bactericidal effect against *S. aureus* and *E. coli*, and films with the incorporation of 10 and 25 wt% of nanocellulose showed complete inhibition of bacterial growth. Paper sheets crafted from bagasse pulp, enhanced with cellulose nanocrystals and chitosan demonstrated strong antagonistic effect against foodborne microorganisms, including *Salmonella* Typhimurium and *B. cereus* (El-Samahy et al., 2017). As per literature findings, the antibacterial impact of chitosan-nanocellulose films could stem from the synergistic action of chitosan and nanocellulose. In this material, bacterial cells encounter narrow and rigid nanocellulose molecules that cause damage to their cell membrane. As a consequence of such damage microbial cells became susceptible to the action of protonated (cationic) chitosan (Costa et al., 2021; Tyagi et al., 2019). The lack of antibacterial effect of the tested films based on chitosan and nanocellulose may be due to low a CNF concentration used in

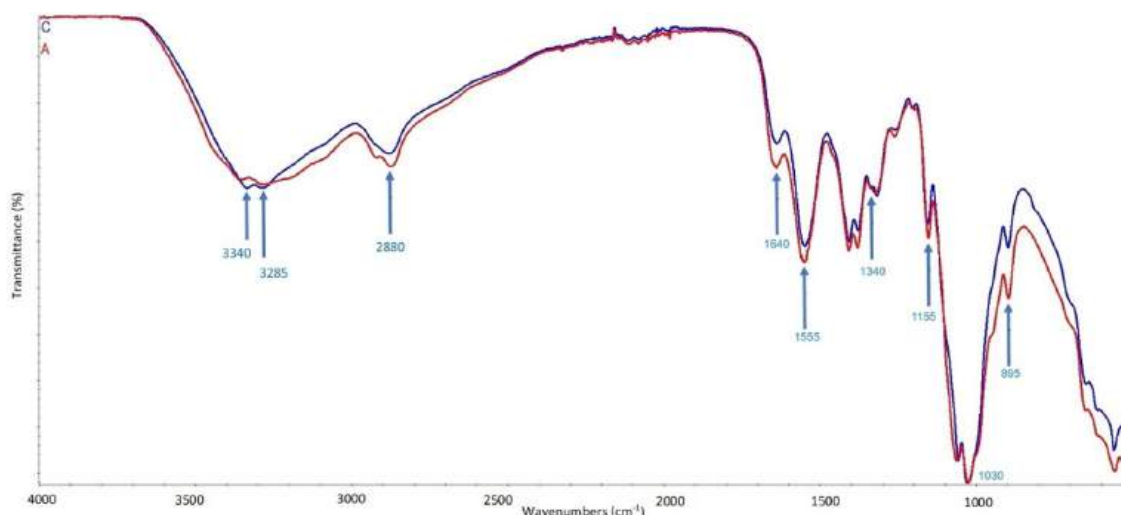


Fig. 6. The spectra of the chitosan-based films: sample A and C.

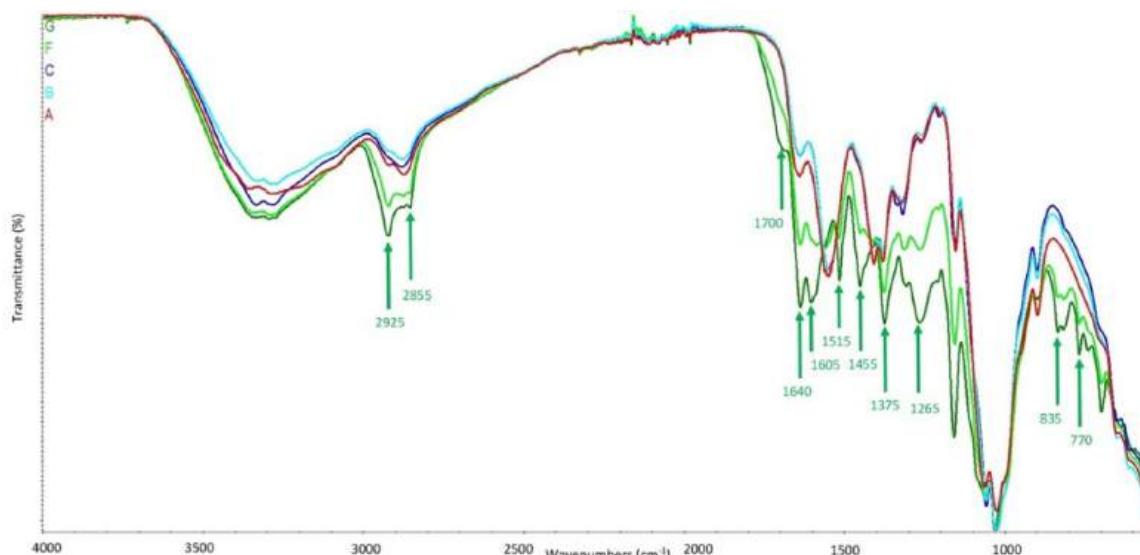


Fig. 7. The spectra of the chitosan-based film samples: A, B, C, F, G.

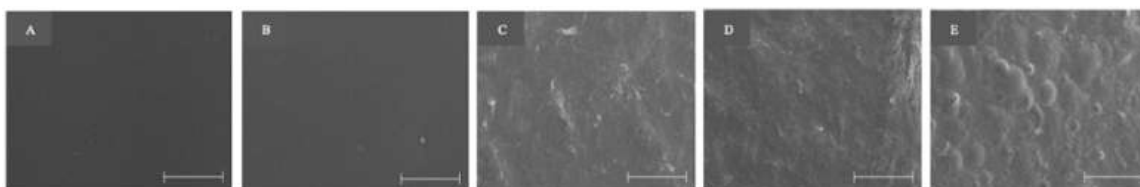


Fig. 8. SEM images of film samples A-E in scale bar 100 μm.

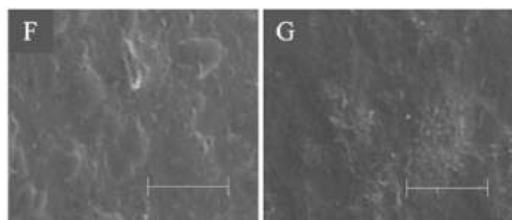


Fig. 9. SEM images of film samples F and G in scale bar 100 μm.

Table 2
The antibacterial activity of chitosan-based films.

Bacterial strains	Sample F (CHT/0.25 %CNF/1 % EEP)	Sample G (CHT/0.5 %CNF/1 % EEP)
	Activity (mm)	
<i>B. subtilis</i>	16	16
<i>L. rhamnosus</i>	0	0
<i>L. plantarum</i>	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	20	17.5

these studies.

In turn, the chitosan-CNF films with propolis extract (samples F and G) exhibited activity against *B. subtilis* and *L. monocytogenes* strains, with inhibition zone from 16 mm (both films against *B. subtilis*) to 20 mm (film F against *L. monocytogenes*), as presented in Table 2. The antibacterial activity against these strains is a very high added value and the application properties of obtained films are highly possible. *L. monocytogenes* is often detected in both food processing and foods. *Listeria* food contamination usually occurs through equipment and

surfaces coming (or not) into contact with food, where these bacteria can form biofilms that are difficult to remove. Unsuitable cleaning and disinfection procedures can lead to the remain of this bacteria in food processing environments over an extended period of time (Bourdoux et al., 2018). Therefore, *Listeria* spp. is a primary pathogen of concern in ready-to-eat and vacuum-packed foods. These bacteria can thrive in low-oxygen environments, at refrigeration temperatures, and exhibit salt tolerance as well. This bacterium is of special concern because it causes listeriosis, a severe disease carried by food with a high mortality rate (Park and Kim, 2023). In recent years, there has been a significant upward trend of listeriosis cases in the European Union/European Economic Area (EU/EEA) (Ricci et al., 2022). The evidence that special attention is being focused on this bacterium are the numerous RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) notifications confirming the presence of *Listeria* in packaged food. Therefore, the achievement of material with activity against such a problematic microorganism is interesting especially from an application point of view.

The results obtained imply that the efficacy of the films is linked to the presence of bioactive compounds derived from propolis extract. Propolis is a natural antimicrobial agent with activity against various pathogenic bacteria, therefore its incorporation in the chitosan matrix and use as packaging films appears to be an effective method for safeguarding packaged materials against the proliferation of both pathogenic and spoilage bacteria in food products. It had already been determined that the chitosan-propolis films showed activity against various pathogens, including *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* (Stanicka et al., 2021; Stefanowska et al., 2023c). Moreover, all tested films showed no activity against probiotic bacterial strains (*L. rhamnosus* and *L. plantarum*), this finding is also in line with previous research (Stefanowska et al., 2023b). This is a beneficial phenomenon from the point of view of the potential use of chitosan-based films with

CNF and EEP as materials for encapsulating probiotics or for manufacturing films utilized for packaging food products that contain probiotic bacteria.

4. Conclusions

This study underscores the significant potential of chitosan-based films enriched with cellulose nanofibrils and propolis extract as a sustainable solution for food packaging. The findings reveal a promising avenue for addressing environmental concerns while enhancing the performance and safety of food packaging materials. The study demonstrates that although the addition of cellulose nanofibrils and ethanolic propolis extract had limited impact on tensile strength, and elongation at break values of chitosan-based films, the resulting films have the potential for tailored mechanical properties in sustainable materials for food packaging industry. This study highlights the crucial role of barrier properties, particularly water vapor transmission rate (WVTR), in the preservation of food products using chitosan-based films. The incorporation of propolis significantly influences and enhances the WVTR, suggesting its potential as a valuable component for adjusting the water vapor transmission rate in chitosan-based films. The study underscores the importance of assessing barrier properties, specifically oxygen and carbon dioxide transmission rates, in chitosan-based films for food packaging. While the samples generally exhibited favorable oxygen barrier properties, the addition of propolis extract had a notable impact, potentially increasing oxygen permeability. Moreover, carbon dioxide transmission rates were generally lower than oxygen, with specific material compositions possibly favoring CO₂ transmission. The surface free energy analysis of the tested samples highlights the practical significance of adhesive strength in packaging materials. The addition of propolis extract demonstrates a notable improvement in the adhesion of the packaging materials, particularly when compared with samples without EEP. While there appears to be a slight upward trend in surface energy for samples without propolis extract, the presence of nanocellulose alone does not significantly impact surface energy. The surface morphology analysis indicates that chitosan-based films with or without the addition of nanocellulose maintain a smooth and dense structure, demonstrating good structural integrity and homogeneity. However, the presence of deliquescent bulges in chitosan films with both CNF and EEP suggests a possible interaction with insoluble propolis constituents. The antibacterial properties of chitosan-based films, especially those incorporating propolis extract, offer considerable promise for practical applications in food packaging. These films have demonstrated effective inhibition of bacteria, including those of concern, such as *L. monocytogenes*. Incorporating propolis into the films has given them selective antimicrobial properties, through which they have become promising materials for protecting packaged products from bacterial growth. These discoveries offer valuable insights into the potential applications of chitosan-based films within the packaging industry, while demonstrating the impact of different additives on their properties.

CRedit authorship contribution statement

Isabela Ratajczak: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Karolina Stefanowska:** Writing – original draft, Conceptualization. **Anna Sip:** Methodology, Formal analysis. **Magdalena Woźniak:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Matthias Bucher:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Corina L. Reichert:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Markus Schmid:** Writing – original draft, Methodology, Conceptualization. **Renata Dobrucka:** Writing – original draft, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The publication was financed by the Polish Minister of Science and Higher Education as part of the Strategy of the Poznan University of Life Sciences for 2024-2026 in the field of improving scientific research and development work in priority research areas.

References

- Almuhayawi, M.S., 2020. Propolis as a novel antibacterial agent. Saudi J. Biol. Sci. 27, 3079–3086. <https://doi.org/10.1016/j.SJBS.2020.09.016>.
- Annu, Ali, A., Ahmed, S., 2021. Eco-friendly natural extract loaded antioxidative chitosan/polyvinyl alcohol based active films for food packaging. Heliyon 7, e06550. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06550>.
- Ashrafi, A., Jokar, M., Mohammadi Nafchi, A., 2018. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. Int J. Biol. Macromol. 108, 444–454. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.12.028>.
- Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Avena-Bustillos, R.J., Filho, G.C., Munford, M.L., Wood, D., McHugh, T.H., 2010. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. J. Food Sci. 75 <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2009.01386.X>.
- Bai, R.K., Huang, M.Y., Jiang, Y.Y., 1988. Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide. Polym. Bull. 20, 83–88. <https://doi.org/10.1007/BF00262253/METRICS>.
- Baranwal, J., Barse, B., Fais, A., Delogu, G.L., Kumar, A., 2022. Biopolymer: a sustainable material for food and medical applications. Polymers 14, 983. <https://doi.org/10.3390/POLYM14050983>.
- Bliłid, S., Kędzierska, M., Miłowska, K., Wrońska, N., El Achaby, M., Katir, N., Belamie, E., Alonso, B., Lisowska, K., Lahcini, M., Bryszewska, M., El Kadib, A., 2020. Phosphorylated micro- and nanocellulose-filled chitosan nanocomposites as fully sustainable, biologically active bioplastics. ACS Sustain. Chem. Eng. 8, 18354–18365. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.0C04426>.
- Bourdoux, S., Rajkovic, A., De Sutter, S., Vermeulen, A., Spilimbergo, S., Zambon, A., Hofland, G., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., 2018. Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on coriander by freeze-drying and supercritical CO₂ drying. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 47, 180–186. <https://doi.org/10.1016/J.IJFSET.2018.02.007>.
- Correa-Pacheco, Z.N., Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. de L., Martínez-González, M. del C., Hernández-Romano, J., 2019. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. Prog. Org. Coat. 137, 105326 <https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2019.105326>.
- Costa, S.M., Ferreira, D.P., Teixeira, P., Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Fangueiro, R., 2021. Active natural-based films for food packaging applications: the combined effect of chitosan and nanocellulose. Int J. Biol. Macromol. 177, 241–251. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.105>.
- D882 Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. <https://www.astm.org/d0882-12.html>.
- Da Silva, C., Prasniewski, A., Calejari, M.A., de Lima, V.A., Oldoni, T.L.C., 2018. Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. Food Anal. Methods 11, 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/S12161-018-1161-X>.
- De Carli, C., Aylanc, V., Mouffok, K.M., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Tomás, A., Pereira, C., Rodrigues, P., Vilas-Boas, M., Falcão, S.I., 2022. Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications. Int J. Biol. Macromol. 213, 486–497. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.05.155>.
- De Vita, D., Lachowicz, S., Wiśniewski, W., Da Rosa, C., Bueno, I.L., Clara, A., Quaresma, M., Longato, G.B., 2022. Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. Pharmaceuticals 15. <https://doi.org/10.3390/ph15091143>.
- DIN 53 122-1 Deutsches Institut für Normung e.V., 2001. Bestimmung der Wasserdampfdurchlässigkeit. Teil 1: Gravimetrisches Verfahren.
- DIN EN ISO 19403-2:2020-04 Deutsches Institut für Normung e.V., 2020. Beschichtungsstoffe- Benetzbarkeit- Teil 2: Bestimmung der freien Oberflächenenergie fester Oberflächen durch Messung des Kontaktwinkels.
- Dong, X., Cheng, Q., Long, Y., Xu, C., Fang, H., Chen, Y., Dai, H., 2020. A chitosan-based scaffold with enhanced mechanical and biocompatible performance for biomedical

- applications. *Polym. Degrad. Stab.* 181 <https://doi.org/10.1016/J.POLYMEDEGRADSTAB.2020.109322>.
- Dutta, P.K., Yadav, S., Mehrotra, G.K., 2021. Modified chitosan films/coatings for active food packaging. *Adv. Polym. Sci.* 287 203–232. https://doi.org/10.1007/12_2021_84.
- El-Samahy, M.A., Mohamed, S.A.A., Abdel Rehim, M.H., Mohram, M.E., 2017. Synthesis of hybrid paper sheets with enhanced air barrier and antimicrobial properties for food packaging. *Carbohydr. Polym.* 168, 212–219. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.03.041>.
- Emenike, E.C., Iwuozor, K.O., Saliu, O.D., Ramontja, J., Adeniyi, A.G., 2023. Advances in the extraction, classification, modification, emerging and advanced applications of crystalline cellulose: a review. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 6, 100337 <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100337>.
- EP1245617A1 - Film selectively permeable to carbon dioxide and food packaging film comprising the same. <https://patents.google.com/patent/EP1245617A1/en>.
- Fagone, M., Loccarini, F., Ranocchiai, G., 2017. Strength evaluation of jute fabric for the reinforcement of rammed earth structures. *Compos B Eng.* 113, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2016.12.054>.
- Farag, M.R., Abdelnour, S.A., Patra, A.K., Dhama, K., Dawood, M.A.O., Elnesr, S.S., Alagawany, M., 2021. Propolis: Properties and composition, health benefits and applications in fish nutrition. *Fish. Shellfish Immunol.* 115, 179–188. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.06.010>.
- Foster, L.J.R., Butt, J., 2010. Chitosan films are NOT antimicrobial. *Biotechnol. Lett.* 33, 417–421. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0435-1>.
- Huq, T., Salmieri, S., Khan, A., Khan, R.A., Le Tien, C., Riedl, B., Frascini, C., Bouchard, J., Uribe-Calderon, J., Kamal, M.R., Lacroix, M., 2012. Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. *Carbohydr. Polym.* 90, 1757–1763. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.065>.
- Irastorza, A., Zarandona, I., Andonegi, M., Guerrero, P., de la Caba, K., 2021. The versatility of collagen and chitosan: from food to biomedical applications. *Food Hydrocoll.* 116 <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106633>.
- Irigoitia, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., Basualdo, M., 2021. The use of propolis as a functional food ingredient: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 115, 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.06.041>.
- ISO 15105-1:2007-10 Deutsches Institut für Normung e.V., 2007. *Kunststoffe - Folien und Flächengebilde - Bestimmung der Gasdurchlässigkeit - Teil 1: Differentialdruck-Verfahren*.
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S.V., Tamura, H., 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. *Carbohydr. Polym.* 82, 227–232. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.04.074>.
- Khalid, M.Y., Al Rashid, A., Arif, Z.U., Ahmed, W., Arshad, H., 2021. Recent advances in nanocellulose-based different biomaterials: types, properties, and emerging applications. *J. Mat. Res Technol.* 14, 2601–2623. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2021.07.128>.
- Khan, A., Khan, R.A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M.R., Lacroix, M., 2012. Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydr. Polym.* 90, 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.037>.
- Koc, B., Akyuz, L., Cakmak, Y.S., Sargin, I., Salaberria, A.M., Labidi, J., Ilk, S., Cekic, F., Akata, I., Kaya, M., 2020. Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Biosci.* 35, 100545 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100545>.
- Kurek, M., Ścetar, M., Voilley, A., Galić, K., Debeaufort, F., 2012. Barrier properties of chitosan coated polyethylene. *J. Memb. Sci.* 403–404 162–168. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2012.02.037>.
- Kwak, H.W., Lee, H., Park, S., Lee, M.E., Jin, H.J., 2020. Chemical and physical reinforcement of hydrophilic gelatin film with di-aldehyde nanocellulose. *Int J. Biol. Macromol.* 146, 332–342. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.12.254>.
- Lavric, G., Oberlinter, A., Filipova, I., Novak, U., Likozar, B., Vrabčić-Brodnjak, U., 2021. Functional nanocellulose, alginate and chitosan nanocomposites designed as active film packaging materials. *Polymers* 13, 2523. <https://doi.org/10.3390/POLYM13152523/S1>.
- Li, Q., Zhou, J., Zhang, L., 2009. Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 47, 1069–1077. <https://doi.org/10.1002/POLB.21711>.
- Liu, J., Liu, S., Wu, Q., Gu, Y., Kan, J., Jin, C., 2017. Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. *Food Hydrocoll.* 73, 90–100. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.06.035>.
- Mishra, R.K., Sabu, A., Tiwari, S.K., 2018. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. *J. Saudi Chem. Soc.* 22, 949–978. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2018.02.005>.
- Mondragon, G., Peña-Rodríguez, C., González, A., Eceiza, A., Arbelaz, A., 2015. Bionanocomposites based on gelatin matrix and nanocellulose. *Eur. Polym. J.* 62, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2014.11.003>.
- Moț, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Sârbu, C., 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *J. Food Comp. Anal.* 24, 516–522. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2010.11.006>.
- Onuaguolu, O., Banthia, N., 2016. Plant-based natural fibre reinforced cement composites: a review. *Cem. Compos* 68, 96–108. <https://doi.org/10.1016/J.CEMCONCOMP.2016.02.014>.
- Othman, S.H., Nordin, N., Azman, N.A.A., Tawakkal, I.S.M.A., Basha, R.K., 2021. Effects of nanocellulose fiber and thymol on mechanical, thermal, and barrier properties of corn starch films. *Int J. Biol. Macromol.* 183, 1352–1361. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.05.082>.
- Ożarowski, M., Karpiński, T.M., Alam, R., Łochyńska, M., 2022. Antifungal properties of chemically defined propolis from various geographical regions. *Microorganisms* 10, 364. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020364>.
- Panahian, P., Salami-Kalajahi, M., Salami Hosseini, M., 2014. Synthesis of dual thermoresponsive and pH-sensitive hollow nanospheres by atom transfer radical polymerization. *J. Polym. Res* 21. <https://doi.org/10.1007/S10965-014-0455-Y>.
- Park, J.H., Kim, H.J., 2023. Modeling and scenario-based risk estimation of *Listeria monocytogenes* in meatballs and Sundae, a Korean black pudding, under different packaging conditions. *Food Control* 152, 109886. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109886>.
- Patil, S., Bharimalla, A.K., Nadanathangam, V., Dhakane-Lad, J., Mahapatra, A., Jagajanantha, P., Saxena, S., 2022. Nanocellulose reinforced corn starch-based biocomposite films: Composite optimization, characterization and storage studies. *Food Packag Shelf Life* 33, 100860. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2022.100860>.
- Pellá, M.C.G., Lima-Tenório, M.K., Tenório-Neto, E.T., Guilherme, M.R., Muniiz, E.C., Rubira, A.F., 2018. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 196, 233–245. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.05.033>.
- Pennells, J., Godwin, I.D., Amiralian, N., Martin, D.J., 2020. Trends in the production of cellulose nanofibers from non-wood sources. *Cellulose* 27, 575–593. <https://doi.org/10.1007/S10570-019-02828-9>.
- Petruzzini, L., Corbo, M.R., Campaniello, D., Speranza, B., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2020. Antifungal and antibacterial effect of propolis: a comparative hit for food-borne *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and fungi. *Foods* 9, 559. <https://doi.org/10.3390/FOODS9050559>.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., Gniewosz, M., 2019. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J. Food Sci. Technol.* 56, 5386–5395. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-04009-9/TABLES/3>.
- Poonguzhali, R., Basha, S.K., Kumari, V.S., 2017. Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application. *Int J. Biol. Macromol.* 105, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.07.006>.
- Queiroz, M.F., Melo, K.R.T., Sabry, D.A., Sasaki, G.L., Rocha, H.A.O., 2014. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation. *Mar. Drugs* 13, 141–158. <https://doi.org/10.3390/MD13010141>.
- Ricci, A., Martelli, F., Alinovi, M., Garofalo, A., Perna, G., Neviani, E., Mucchetti, G., Bernini, V., 2022. Behaviour and adhesion capacity of *Listeria monocytogenes* on Mozzarella di Bufala Campana PDO cheese and in fluids involved in the production process. *Food Control* 140. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109110>.
- Riva, Raphaël, Duhem, N.J., Ragelle, H., Éloïse, Des Rieux, Anne, Duhem, Nicolas, Jérôme, Christine, Prétat, V., Éronique, Riva, R., Jérôme, C., Ragelle, H., Des Rieux, A., Duhem, N., Prétat, V., 2011. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. 244. Springer, pp. 19–44. https://doi.org/10.1007/12_2011_137.
- Salimi, S., Sotudeh-Gharebagh, R., Zarghami, R., Chan, S.Y., Yuen, K.H., 2019. Production of nanocellulose and its applications in drug delivery: a critical review. *ACS Sustain Chem. Eng.* 7, 15800–15827. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B02744>.
- Schmid, M., Zillinger, W., Müller, K., Sänglerlaub, S., 2015. Permeation of water vapour, nitrogen, oxygen and carbon dioxide through whey protein isolate based films and coatings- permselectivity and activation energy. *Food Packag Shelf Life* 6, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2015.08.002>.
- Siripatrawan, U., Vitthayakitti, W., 2016. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll.* 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.06.001>.
- Staniccka, K., Dobrucka, R., Woźniak, M., Sip, A., Majka, J., Kozak, W., Ratajczak, I., 2021. The effect of chitosan type on biological and physicochemical properties of films with propolis extract. *Polymers* 13, 3888. <https://doi.org/10.3390/POLYM13223888>.
- Stefanowska, K., Woźniak, M., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2023a. Chitosan with natural additives as a potential food packaging. *Materials* 16, 1579. <https://doi.org/10.3390/MA16041579>.
- Stefanowska, K., Woźniak, M., Majka, J., Sip, A., Mrówczyńska, L., Kozak, W., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2023b. Chitosan films with caffeine and propolis as promising and ecofriendly packaging materials. *Appl. Sci.* 13, 12351. <https://doi.org/10.3390/APP132212351>.
- Stefanowska, K., Woźniak, M., Sip, A., Mrówczyńska, L., Majka, J., Kozak, W., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2023c. Characteristics of chitosan films with the bioactive substances- caffeine and propolis. *J. Funct. Biomater.* 14, 358. <https://doi.org/10.3390/JFB14070358>.
- Šuran, J., Cepanec, I., Mašek, T., Radič, B., Radič, S., Gajger, I.T., Vlanič, J., 2021. Propolis extract and its bioactive compounds- from traditional to modern extraction technologies. *Molecules* 26, 2930. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26102930>.
- Surek, M., Cobre, A. de F., Fachi, M.M., Santos, T.G., Pontarolo, R., Crisma, A.R., Felipe, K.B., Souza, W.M. de, 2022. Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. *LWT* 161, 113370. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113370>.
- Taberi, P., Jahanmardi, R., Koosha, M., Abdi, S., 2020. Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. *Int J. Biol. Macromol.* 154, 421–432. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.114>.
- Talebi, H., Ghasemi, F.A., Ashori, A., 2022. The effect of nanocellulose on mechanical and physical properties of chitosan-based biocomposites. *J. Elastom. Plast.* 54, 22–41. <https://doi.org/10.1177/00952443211017169/FORMAT/EPUB>.
- Tian, B., Liu, Y., 2020. Chitosan-based biomaterials: from discovery to food application. *Polym. Adv. Technol.* 31, 2408–2421. <https://doi.org/10.1002/PAT.5010>.

- Trache, D., Tarchoun, A.F., Derradji, M., Hamidon, T.S., Masruchin, N., Brosse, N., Hussin, M.H., 2020. Nanocellulose: from fundamentals to advanced applications. *Front Chem.* 8, 535734 <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2020.00392/BIBTEX>.
- Tyagi, P., Mathew, R., Opperman, C., Jameel, H., Gonzalez, R., Lucia, L., Hubbe, M., Pal, L., 2019. High-strength antibacterial chitosan-cellulose nanocrystal composite tissue paper. *Langmuir* 35, 104–112. <https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.8B02655>.
- Velásquez-Cock, J., Ramírez, E., Betancourt, S., Putaux, J.L., Osorio, M., Castro, C., Gañán, P., Zuluaga, R., 2014. Influence of the acid type in the production of chitosan films reinforced with bacterial nanocellulose. *Int J. Biol. Macromol.* 69, 208–213. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.05.040>.
- Vică, M.L., Glevitzky, M., Tit, D.M., Behl, T., Hegheduş-Mîndru, R.C., Zaha, D.C., Ursu, F., Popa, M., Glevitzky, I., Bungău, S., 2021. The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Biosci.* 41, 101014 <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101014>.
- Wiles, J.L., Vergano, P.J., Barron, F.H., Bunn, J.M., Testin, R.F., 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *J. Food Sci.* 65, 1175–1179. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2000.TB10261.X>.
- Wu, Y.W., Sun, S.Q., Zhao, J., Li, Y., Zhou, Q., 2008. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 883–884 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2007.12.009>.
- Yin, K., Divakar, P., Wegst, U.G.K., 2019. Plant-derived nanocellulose as structural and mechanical reinforcement of freeze-cast chitosan scaffolds for biomedical applications. *Biomacromol.* 20, 3733–3745. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.9B00784>.
- Zehra, A., Wani, S.M., Bhat, T.A., Jan, N., Hussain, S.Z., Naik, H.R., 2022. Preparation of a biodegradable chitosan packaging film based on zinc oxide, calcium chloride, nano clay and polyethylene glycol incorporated with thyme oil for shelf-life prolongation of sweet cherry. *Int J. Biol. Macromol.* 217, 572–582. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.013>.
- Zhang, W., Cao, J., Jiang, W., 2022. Analysis of film-forming properties of chitosan with different molecular weights and its adhesion properties with different postharvest fruit surfaces. *Food Chem.* 395, 133605 <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133605>.
- Zhang, W., Zhang, Y., Cao, J., Jiang, W., 2021. Improving the performance of edible food packaging films by using nanocellulose as an additive. *Int J. Biol. Macromol.* 166, 288–296. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.185>.
- Zinge, C., Kandasubramanian, B., 2020. Nanocellulose based biodegradable polymers. *Eur. Polym. J.* 133, 109758 <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109758>.

Article

Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials

Karolina Stefanowska ^{1,*}, Magdalena Woźniak ^{1,*}, Jerzy Majka ², Anna Sip ³, Lucyna Mrówczyńska ⁴,
Wojciech Kozak ⁵, Renata Dobrucka ⁵ and Izabela Ratajczak ¹

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60625 Poznan, Poland; izabela.ratajczak@up.poznan.pl
- ² Department of Wood Science and Thermal Techniques, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 38/42, 60637 Poznan, Poland; jerzy.majka@up.poznan.pl
- ³ Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60627 Poznan, Poland; anna.sip@up.poznan.pl
- ⁴ Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61614 Poznan, Poland; lucyna.mrowczyńska@amu.edu.pl
- ⁵ Department of Industrial Products and Packaging Quality, Institute of Quality Science, Poznań University of Economics and Business, al. Niepodległości 10, 61875 Poznan, Poland; wojciech.kozak@ue.poznan.pl (W.K.); renata.dobrucka@ue.poznan.pl (R.D.)
- * Correspondence: karolina.stefanowska@up.poznan.pl (K.S.); magdalena.wozniak@up.poznan.pl (M.W.)

Abstract: This study addresses challenges faced by the packaging industry in finding suitable natural and biodegradable materials that can replace plastics while preserving the superior quality and freshness of the items contained within. Chitosan, a biodegradable natural polymer, shows great potential as a matrix for ecofriendly and biodegradable composite materials. In the present study, bioactive substances such as caffeine (CAF) and propolis extract (EP) were used for the enhancement of the bioactivity of chitosan-based films. Two acidic solvents, acetic acid and citric acid, were used to produce chitosan films. The study examined the antioxidant capabilities of the solutions used for film formation; similarly, the characteristics of the resultant films were also examined, encompassing antimicrobial, barrier, and mechanical characteristics. The findings suggested that the use of additives exhibiting antioxidant activity, such as CAF and EP in the chitosan matrix can be an effective method to counteract oxidative stress in food packaging. The study also showed that films produced with citric acid exhibit antimicrobial activity against many strains of bacteria, including foodborne pathogens. In addition, the antimicrobial activity of chitosan/citric acid film can be increased by adding CAF and EP. The results confirmed that both the additives and the acids used affect the mechanical and barrier features of the obtained chitosan-based films. This study suggests that chitosan films supplemented with natural bioactive substances have the potential to serve as viable replacements for traditional plastics in the packaging sector.



Citation: Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 12351. <https://doi.org/10.3390/app132212351>

Academic Editor: Leonel Pereira

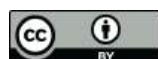
Received: 23 September 2023

Revised: 8 November 2023

Accepted: 9 November 2023

Published: 15 November 2023

Keywords: packaging materials; chitosan; propolis; caffeine; foodborne pathogens



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nowadays, plastics are materials commonly used in the packaging sector. This can be attributed to their easy accessibility, affordability, and exceptional longevity. Unfortunately, the durability of plastics does not necessarily yield positive results. A substantial time investment is necessary to break them down, which is a serious problem if they are not properly disposed of. Due to the observed degradation of the environment associated with excessive consumption and the increase in consumer awareness, the packaging industry is facing the challenge of finding appropriate materials that could replace plastics. This challenge is being addressed by the quest for new, natural and biodegradable materials that will be ecofriendly, while, like plastics, being noted for their advantageous mechanical

or optical properties. In addition, these materials, through the use of appropriate additives, can ensure the preservation of high quality and freshness of packaged products [1,2].

The initial purpose of food packaging is to safeguard the enclosed food while it is being transported or stored. Moreover, it is important for the packaging to shield the packaged food from the detrimental impact of external factors such as UV radiation and to exhibit appropriate mechanical or barrier properties. Packaging serves the essential purpose of maximizing the lifespan of food products, preserving their quality, and protecting them from external factors that could accelerate spoilage or compromise their nutritional properties [3]. The greatest food losses during production and transport are caused by microbial transformations. One way to protect finished food products from negative external influences is packaging. However, traditional packaging does not guarantee that food will be durable and fully safe for consumers. This is because many products succumb to microbial contamination during or even after the final stages of production. In such cases, protecting food with traditional packaging is insufficient. This is because a number of undesirable microorganisms, both pathogenic and spoilage-causing, can thrive in contaminated products packaged in traditional packaging. These include pathogenic strains of the genus *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Brochothrix* and psychrophilic molds, among others [4,5]. Reducing the growth of these microorganisms is possible by replacing traditional packaging, or the so-called passive packaging, with active packaging. One form of active packaging that is attracting increasing interest from consumers and food manufacturers is active antimicrobial packaging. Such packaging can be produced with components that exhibit natural activity, such as, e.g., chitosan, or gain such activity following their physical or chemical modification. Many chemical compounds have proven to be agents through which antimicrobial activity can be imparted to packaging [5].

Packaging materials that are both natural and biodegradable are typically composed of film-forming substances, commonly from proteins, polysaccharides, lipids, and resins, either individually or as composite materials [1,5]. Studies have shown that chitosan is an effective packaging material because it is a biodegradable natural polymer. Chitosan is a polysaccharide that offers various advantages, including lack of toxicity, biocompatibility and ability to break down naturally. Derived from the shells of crustaceans, which are a byproduct of the seafood industry [6]. This versatile material finds applications in several industries, including medicine, agriculture, textiles, food, and environmental protection [7,8]. Also, chitosan exhibits great potential as a biopolymer used for the production of functional and natural packaging [9–11]. Therefore, it holds significant promise as a suitable choice for serving as a base material in natural and biodegradable composite materials, thanks to its multitude of advantageous characteristics. While chitosan solutions have demonstrated antimicrobial capabilities against specific pathogenic bacteria, chitosan films produced from these solutions do not seem to retain these properties. This discrepancy is probably attributable to the way chitosan binds within the films, limiting immediate interaction between its molecular chains and microbial cells [12]. Therefore, researchers are exploring the addition of natural components, for example, essential oils or botanical extracts, to enhance the microbial activity of chitosan films [13,14].

Propolis is a natural material gathered by honeybees from resinous and balsamic plant materials, including flowers, pollen, branches and tree exudates [15]. Throughout history, bee glue has been employed in traditional medicinal practices because of the various advantageous qualities found in its extracts. These include antibacterial, antifungal, anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant properties, inter alia [16,17]. The diverse biological effects of propolis extract are linked to their intricate chemical composition. According to the literature data, propolis samples from diverse geographic sources encompass phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids, and their esters), alcohols, terpenes, enzymes, vitamins, amino acids, sugars, and minerals [16,18]. Propolis extracts exhibit activity against a wide spectrum of bacterial strains, including microorganisms that cause foodborne illnesses, such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* [19–21]. As a result, propo-

lis extracts have been incorporated as additives in films composed of biopolymers, among others, chitosan [9,22–26].

Caffeine is an organic chemical compound (1,3,7-trimethylxanthine) found in coffee, tea, energy drinks and some carbonated beverages [27]. It stands as one of the most widely recognized and frequently consumed stimulants on a global scale [28,29]. Caffeine is a chemical compound that exhibits antimicrobial and antioxidant properties, making it a potentially important ingredient in many pharmaceutical and cosmetic products [29–31]. Caffeine displays potent antioxidant characteristics, shielding the body from harmful free radicals and potentially lowering the likelihood of diseases linked to oxidative stress [32]. Coffee extracts exhibit antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus mutans*), Gram-negative bacteria (*E. coli*) and yeast (*Candida albicans*) [33–35]. The literature data show that caffeine as an additive can be used in the production of natural biopolymer films and affect their mechanical or antioxidant properties [36].

In this investigation, films made from chitosan obtained from crabs were produced, incorporating both propolis extract (EP) and caffeine (CAF). Two solvents, acetic acid and citric acid, were employed to formulate solutions for film production. The primary objective of this research was to assess the functional attributes of these materials, which encompass mechanical properties, oxygen and water vapor barrier properties, structural features, and antibacterial activity, with the aim of evaluating appropriateness for application in the food packaging sector.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Chitosan Films

The film-forming solutions were produced based on methods described in our previous paper [37]. In this study, 4 g of chitosan from crab shells (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was dissolved in 400 mL of a 3% acetic acid solution (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) and a 3% citric acid solution (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland). The chitosan solutions (400 mL) were blended with caffeine (CAF) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) to achieve the CAF concentration of 1% and combined with 1.5 mL of Tween-20 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). Subsequently, the chitosan–CAF solutions (400 mL) were combined with an ethanolic extract of propolis (EP) (PROP-MAD, Poznań, Poland) to achieve an EP concentration of 1%. The solutions were thoroughly mixed using a homogenizer and then poured into Petri dishes lined with Teflon. Finally, the films were left to dry at room temperature.

Following the experiment, a total of six distinct film samples were produced, and their labels are detailed in Table 1.

Table 1. Symbols of film samples.

Symbol	Acidic Solvent	Additives
A	acetic	--
AC	acetic	CAF
ACP	acetic	CAF, EP
C	citric	--
CC	citric	CAF
CCP	citric	CAF, EP

2.2. Antiradical Properties

The antiradical activity of all film-forming solutions was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) radical scavenging assay.

Each chitosan-based solution (3 μ L) was added to 297 μ L of deionized water and vortexed. Subsequently, 300 μ L of a 0.1 mM DPPH ethanol solution was added to each sample. The samples were vortexed and incubated for 30 min at room temperature in the dark. After incubation, the samples were vortexed, and the absorbance values of the

solutions were measured at a wavelength of 517 nm using a BioMate™ 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Each sample was replicated three times, and each experiment was performed thrice. Trolox (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as the reference antioxidant. The antiradical properties of the chitosan-based solutions and Trolox were calculated using the equation:

$$AP (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance value of the control sample, and A_1 is the absorbance value of the test sample. The results ($n = 9$) are presented as mean values \pm standard deviation (SD).

2.3. Antibacterial Activity

The antimicrobial activities of chitosan films were determined via the diffusion method. The indicator stains used were pathogenic or potentially pathogenic bacteria strains: *Bacillus subtilis* (food isolate), *Enterococcus faecalis* (food isolate), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15443), *Pseudomonas fluorescens* (food isolate), *Salmonella enterica* (clinical isolate), and probiotic bacteria strains: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (isolated from Sanprobi IBS, Szczecin, Poland) and *Lacticaseibacillus paracasei* (CNCM I-1572). The study films (discs with a diameter of 10 mm) were applied to Petri dishes with Mueller–Hilton Agar (Graso, Jablkowo, Poland) inoculated with 10^7 CFU/mL indicator strains (24 h culture in a nutrient broth with the addition of 2% glucose). After 24 h incubation at 35 ± 2 °C, the diameters of the zones of inhibition formed around the discs of chitosan films were measured in millimeters using a Computer Scanning System (MultiScaneBase v14.02).

2.4. Oxygen Transmission Rate (OTR)

The oxygen transmission rate (OTR) of the prepared films was determined using the Oxysense 325i apparatus equipped with special OTR measurement chambers (Industrial Physics, Boston, MA, USA). The measurements were performed according to ASTM F3136—15 standard [38]. Test samples were shaped into squares (6.5 cm on each side). The test conditions were as follows: a temperature of 23 °C and a relative humidity (RH) of 65%. The OTR test was performed three times for each sample variant.

2.5. Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

The water vapor transmission rate (WVTR) of the films was measured according to the standard ISO 2528:2017 [39]. To conduct the measurements, vessels containing 10 g of anhydrous calcium chloride (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) were covered with a film sample, sealed tightly, and placed inside a desiccator that contained a saturated solution of sodium chloride (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) with a relative humidity (RH) of 65% and a temperature of 23 °C. The vessels were then weighed accurately to 0.001 g. The water vapor transmission rate (WVTR) was calculated using the following Formula (2):

$$WVTR = \frac{m \cdot 24}{A} \quad (2)$$

where WVTR is the water vapor transmission rate ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h}$), m (g) is the mass increase and A (m^2) is the water vapor transmission area.

2.6. Sorption Experiments

Before the sorption experiment, a set of produced chitosan film samples (10 mm in diameter) was stored in a desiccator over phosphorus pentoxide (P_2O_5) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). Equilibrium moisture content (EMC) measurements were conducted

using a dynamic vapour sorption apparatus (DVS Advantage 2, Surface Measurement Systems, London, UK) at a temperature of 25 °C. The schedule of the sorption experiment consists of an initial phase of sample equilibration in dry nitrogen at a flow rate of 150 cm³·s⁻¹ to obtain a dry state. The initial mass of each sample was 10 ± 1 mg. The EMCs were determined in the adsorption mode from 0 to 0.80 relative humidity (RH). A sample was considered to have reached equilibrium at a given RH when the change in mass was less than 0.0005%·min⁻¹ over a 10 min window. The EMC data were used to determine experimental adsorption isotherms.

2.7. Sorption Modelling

Adsorption isotherms were calculated using the generalized D'Arcy and Watt (GDW) sorption model [40–42], given by the formula:

$$\text{EMC (kg/kg)} = \frac{m \cdot K \cdot \text{RH}}{(1 + K \cdot \text{RH})} \cdot \frac{1 - k \cdot (1 - w) \cdot \text{RH}}{(1 - k \cdot \text{RH})} \quad (3)$$

where *m* is the maximum amount of monolayer water content (kg/kg), *K* and *k* are the kinetic constant related to sorption on primary and secondary sorption centers, respectively, *w* is the ratio of water molecules bound to primary sorption centers and converted into secondary sorption centers, and RH is the air relative humidity (-). The coefficients of the GDW model were estimated using the Levenberg–Marquardt approach. Calculations were performed using STATISTICA 13.3 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

2.8. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphology of the chitosan-based films was measured using an Evo 40 scanning electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a secondary electron detector.

2.9. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

The Nicolet iS5 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a Fourier transform was employed to record the spectra relating to chitosan-based film samples. The spectra were obtained with a resolution of 4 cm⁻¹, covering a range from 4000 to 600 cm⁻¹, and recorded by averaging 32 scans.

2.10. Mechanical Properties

The mechanical properties of the produced films were evaluated with an Instron Universal Testing Machine (Model 5965, Instron, Norwood, MA, USA) in accordance with the standard (ASTMD882-12) [43]. Tensile strength (TS) and elongation at break (EB) were among the mechanical properties measured, and the average results from ten samples were reported.

2.11. Statistical Analysis

Statistical analyses encompassed a factorial one-way ANOVA, which was followed by Tukey's honest significant difference (HSD) test at a significance level (α) of 0.05. These analyses were conducted using TIBCO Software Inc. Statistica version 13.3 (Palo Alto, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Antiradical Activity of Film-Forming Solutions

Examining the antioxidant properties of materials with potential applications in food packaging is of significant importance, especially in the context of their ability to mitigate food oxidation during storage [3]. In order to prevent food oxidation, new solutions which will improve the antioxidant properties of packaged food are sought in the packaging industry. The solution may be provided by packaging materials made of natural polymers with additives showing proven antioxidant properties [44–46].

The antiradical activity was investigated in the chitosan-based solution with CAF and EP prepared with two acids, acetic and citric, and the results are presented in Figure 1.

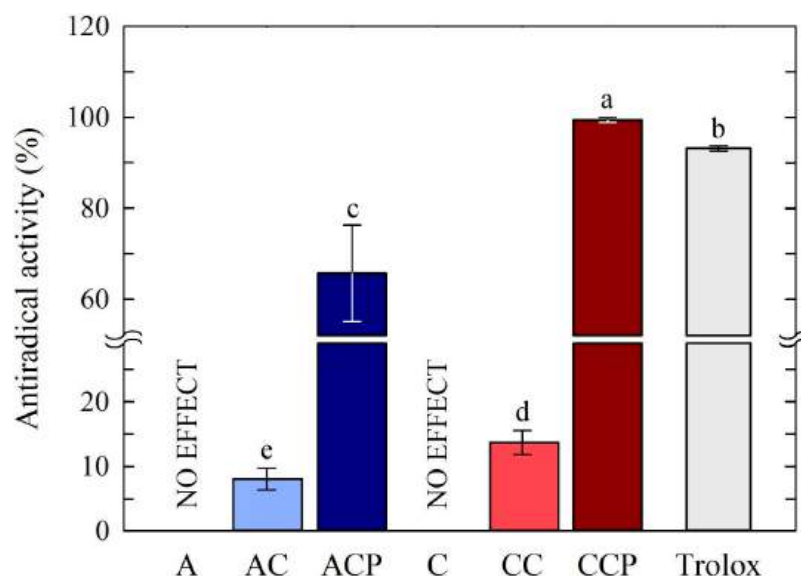


Figure 1. Antiradical activity of chitosan-based solutions. Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

The outcomes of the antiradical activity tests revealed that chitosan solutions lacking the inclusion of natural active components (EP and CAF) exhibited no ability to capture free radicals, regardless of the acid used. The addition of CAF resulted in a minor elevation in the antioxidant activity of the tested film-forming solutions—sample AC (8.07%) and sample CC (17.47%). The value of antiradical activity in chitosan solutions was found to increase after the addition of CAF and EP to the solutions. Moreover, when comparing the activity of the chitosan-based solutions with both natural additives, it was observed that the acid used to dissolve the chitosan also affected the antioxidant activity of the final solutions. Statistical analysis indicates that the greatest antiradical properties were exhibited by a solution consisting of chitosan prepared with citric acid and the addition of CAF and EP. This ability to scavenge free radicals was higher (99.42%) than for standard antioxidant Trolox (92.82%). This high antiradical activity of the chitosan/citric acid film with propolis and caffeine may be due to the well-known antioxidant properties of caffeine and propolis. The high antioxidant activity of propolis extracts has been confirmed in numerous literature reports [47–49]. The antioxidant effect of caffeine is related to its ability to neutralize free radicals [28,32], while ethanolic propolis extract (EP) comprises numerous compounds, notably flavonoids and phenolic acids, known for their potent antioxidant properties [47,50–52].

The use of additives such as caffeine and propolis extract exhibiting antioxidant effects to chitosan-forming solutions may be an effective method to mitigate oxidative stress in food packaging.

3.2. Antibacterial Activity of Films

One of the primary factors leading to the hastened deterioration of food is its contamination with microorganisms during processing or transportation [53]. Hence, there is a quest for innovative and environmentally friendly solutions to facilitate food packaging while simultaneously shielding against the detrimental impact of microorganisms. In this context, the use of films featuring antimicrobial properties seems to be a good solution, with chitosan films being promising examples.

The effectiveness of chitosan-based films in inhibiting the growth of pathogenic and probiotic bacterial strains was assessed, and the findings are outlined in Table 2.

Table 2. The antibacterial activity of chitosan-based films.

Indicator Strains	Inhibition Zone [mm]					
	A	AC	ACP	C	CC	CCP
Pathogenic Strains of Bacteria						
<i>Bacillus subtilis</i>	--	--	--	18	18	>28
<i>Enterococcus faecalis</i>	--	--	--	28	28	>28
<i>Listeria monocytogenes</i>	--	--	--	27	27	>28
<i>Staphylococcus aureus</i>	--	--	--	--	18	20
<i>Escherichia coli</i>	--	--	--	22	22	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	--	--	20	19	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	--	--	--	24	19	25
<i>Salmonella enterica</i>	--	--	--	17	17	24
Probiotic Strains of Bacteria						
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Lactobacillus plantarum</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Lactobacillus paracasei</i>	--	--	--	--	--	--

-- lack of activity.

The obtained results showed that the films were characterized by varied activity against pathogenic bacteria. All films, also with natural additives, obtained using acetic acid to dissolve chitosan, showed no antimicrobial activity against any tested strains of bacteria. On the other hand, films with citric acid used as a chitosan solvent showed activity against all the tested strains of pathogenic bacteria—the inhibition zone ranged from 17 to >28 mm. The exception was the chitosan film without additives, which was not active against *S. aureus*. The findings indicated that utilizing citric acid as a solvent positively impacted the antimicrobial effectiveness of the resulting films. None of the films made from chitosan exhibited any activity against probiotic bacterial strains. This is a very favorable result and shows that the obtained films can be used in packaging functional food which contains such strains, and their elimination would be unfavorable. Chitosan-based films can also serve as a beneficial option for encapsulating probiotic strains. The results obtained align with existing literature, affirming the potential utility of chitosan materials for encapsulating viable probiotic bacteria, among other applications [54,55].

Literature data show that caffeine exhibits antibacterial activity against *P. fluorescens*, *E. coli* and *P. aeruginosa* [30,31]. However, the antibacterial activity of the caffeine-chitosan films was comparable and, in the case of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, even lower than that of films prepared with chitosan alone. The films with the most substantial antibacterial effectiveness were those produced using chitosan dissolved in citric acid, along with the inclusion of CAF and EP. Numerous literature data indicate that propolis extract has antibacterial activity against many strains of pathogenic bacteria, mainly Gram-positive, such as *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* and *E. faecalis*. However, it is less effective against Gram-negative bacteria, including *E. coli* or *P. aeruginosa* [19,20,56]. The antagonistic activity of Polish propolis extracts against such bacterial strains as *S. aureus*, *Salmonella epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes* has already been demonstrated [57,58]. Literature reports indicate that the antimicrobial activity of poplar-type propolis may be associated with the high content of phenolic compounds [59–61]. The results described by Siripatrawan and Vitchayakitti [9] indicated that chitosan films containing propolis extract showed activity against *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* in contrast to films obtained from chitosan alone. In turn, propolis–chitosan nanoparticle films strongly inhibited the growth of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* [62]. Furthermore, packaging materials based on cellulose and containing the active combination of chitosan and propolis complex exhibited antibacterial properties against *L. innocua* and *S. aureus* [24]. The literature data indicated that films based on high molecular weight chitosan with

propolis extract showed activity against Gram-positive bacteria: *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* [26].

More research is required to explain the reasons for the loss of antibacterial activity by both CAF and EP in the environment of chitosan and acetic acid.

3.3. Barrier Properties of Films

The barrier properties of packaging are pivotal in the preservation of products during storage. Attributes like the barrier characteristics of active films and edible coatings are closely tied to their capacity to safeguard food, often gauged through water vapor permeability [63]. Furthermore, it is essential to restrict the ingress of water vapor and oxygen through packaging to hinder the growth of microorganisms and the degradation of specific active components [64]. Hence, the water vapor transmission rate (WVTR) and oxygen transmission rate (OTR) of the chitosan-based films produced were assessed, and the findings are outlined in Table 3.

Table 3. Water vapor transmission rate (WVTR) and oxygen transmission rate (OTR) of chitosan-based films.

Sample	WVTR (g/m ² ·24 h)	OTR (cm ³ /m ² ·24 h)
A	159.09 ^a ± 0.79	5.3 ^d ± 0.10
AC	110.91 ^b ± 0.10	6.26 ^c ± 0.04
ACP	80.90 ^c ± 0.88	12.8 ^a ± 0.71
C	108.79 ^d ± 0.71	7.7 ^b ± 0.58
CC	80.91 ^d ± 0.02	3.3 ^e ± 0.61
CCP	77.88 ^e ± 0.83	7.4 ^b ± 0.12

Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

The application of citric and acetic acids influenced the water vapor permeability parameter of the obtained films. Chitosan films prepared with the application of acetic acid as a chitosan solvent were characterized by a higher water vapor transmission rate (WVTR) amounting to 159.09 g/m²·24 h than films where citric acid was used (108.79 g/m²·24 h). The addition of caffeine to the chitosan film where acetic acid was used reduced WVTR to 110.91 g/m²·24 h, while in the case of the chitosan film with citric acid, the WVTR reduction was greater and amounted to 80.91 g/m²·24 h. The addition of propolis extract to both chitosan–caffeine solutions (with both acids) resulted in an even greater decrease in the WVTR parameter. This effect is due to the crosslinking reaction, which can restrict the movement of molecules and thus reduce the moisture transmission rate [53].

Modifications and supplements to films based on chitosan are unquestionably of significant importance and impact on their barrier properties. Literature data indicated that factors affecting the WVTR of chitosan films include molecular weight and the deacetylation degree of chitosan, the type and number of added plasticizers, and the conditions of sample preparation [65]. The findings obtained align with existing literature data confirming that the addition of propolis extracts to chitosan films resulted in a reduction in their water vapor permeability [9,26]. The results presented by Correa-Pacheco et al. [62] showed that propolis–chitosan nanoparticle films were characterized by a lower value of the water vapor diffusion coefficient (WVDC) than chitosan films without propolis. Moreover, a higher concentration of propolis extract added to chitosan film resulted in a decrease in WVDC, which was connected with the lipophilic nature of propolis [62]. Additionally, Velickova et al. [66] found that the incorporation of other hive products, the incorporation of beeswax into edible chitosan films, led to a reduction in the permeability of the initial chitosan films.

The films were also characterized by varied oxygen transmission rates (OTRs), as presented in Table 3. The film based on chitosan prepared with citric acid and caffeine (sample CC) was the greatest oxygen barrier material, with the lowest OTR at 3.3 cm³/m²·24 h. This is mainly because citric acid contains three carboxyl groups. Thus, the reaction

caused the formation of more hydrogen bonds between the chitosan and the acid, thus leading to the formation of a dense structure that reduced the barrier of the material. Furthermore, caffeine caused additional crosslinking and consequently provided an enhanced oxygen barrier. Therefore, the crosslinked film formed after the addition of caffeine can be recognized as an effective method to enhance the barrier properties of chitosan films.

3.4. Sorption Experiments

The experimental EMC data and fitted adsorption isotherms of the examined film samples are presented in Figure 2. The adsorption isotherm for these chitosan-based films demonstrated a minor increase in EMC below RH 0.50, followed by a notable surge in EMC in the range of RH exceeding 0.50. This occurrence has been documented in prior studies [67–70]. The results showed a positive effect of caffeine and caffeine-propolis on reducing the hygroscopicity of chitosan films. The characteristic feature of tested chitosan-based created using the studied additives is a negligibly low EMC (less than 0.01 kg/kg) in the RH range below 0.35. A similar effect of lowering EMC in the described RH range was observed in earlier studies of films created using chitosan and kombucha solutions derived from coffee as well as three different types of tea [71].

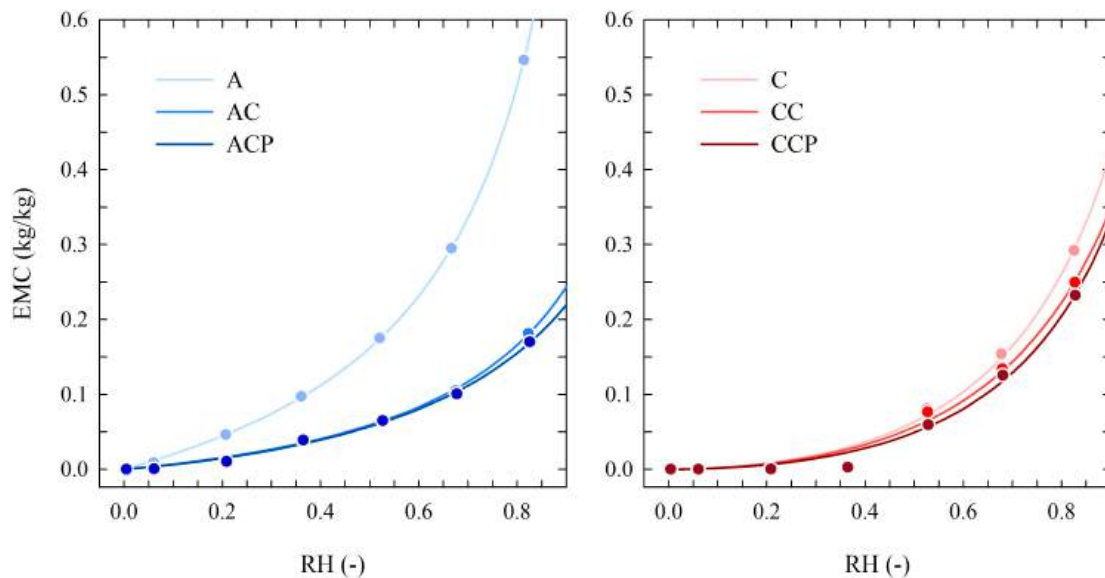


Figure 2. Adsorption isotherms of chitosan-based film samples including caffeine and caffeine-propolis solution (chitosan dissolved in acetic acid—left plot; chitosan dissolved in citric acid—right plot; dots represent experimental data; solid lines—fitting with the GDW sorption model, temperature of 25 °C).

The EMC of pure chitosan film (sample A) produced with acetic acid is clearly higher in the whole RH range. In turn, the application of citric acid as a solvent in the production process of crab chitosan-based films (pure chitosan) results in a greater reduction in their hygroscopic properties than in the case of acetic acid. When exposed to air at a temperature of 25 °C RH below 0.80, the maximum value of equilibrium moisture content (EMC) of the tested samples of the C-type film did not exceed 0.292 kg/kg. Under analogous conditions, the observed EMC for samples of A film was almost 2-fold greater (0.546 kg/kg). The results of the sorption experiment shown in Figure 2 confirmed that the hygroscopicity of the tested film samples based on crab chitosan may be significantly reduced by the addition of CAF and CAF with EP. The proposed modification variants for chitosan-based films, i.e., an addition of CAF and CAF with EP, cause a further decrease in EMC within the RH range below 0.80. An advantageous effect of EP on the reduction in hygroscopicity of film based on crab chitosan confirmed the results of earlier studies [26].

The results of the conducted sorption experiments confirmed that a greater range of EMC reduction is found for film samples produced using acetic acid (A-type samples). The application of an addition of caffeine or caffeine–propolis in the case of samples obtained using citric acid (C type samples) causes only a slight reduction in the hygroscopicity of the produced chitosan films.

The estimated coefficients of the GDW model for the investigated chitosan-based films, taking into account the caffeine and caffeine with propolis extract used, are presented in Table 4.

Table 4. Estimated coefficients of the sorption GDW model at 25 °C for chitosan-based films.

Chitosan-Based Films	m (kg/kg)	K	k	w	R^2
A	0.5609	0.3341	0.9205	1.1920	0.9999
AC	0.1216	0.5106	0.7994	2.0868	0.9974
ACP	0.0984	0.5612	0.7439	2.7808	0.9967
C	0.5419	0.0110	0.8006	30.5221	0.9882
CC	0.5237	0.0105	0.7632	32.0767	0.9855
CCP	0.4108	0.0102	0.8042	33.5309	0.9892

Generally, the estimated parameter m (monolayer water content) is lower than 1 for all the investigated chitosan-based films since the water molecules absorbed on primary sites do not undergo a complete transformation into secondary sorption sites. Moreover, the use of caffeine and caffeine with propolis extract as additives to produce a chitosan film affected the monolayer water content. Nevertheless, while in samples of film A and C (pure chitosan) samples, the value of the described parameter varies slightly (i.e., 0.5609 vs. 0.5419, respectively), in the case of chitosan-based films produced with the addition of acetic acid it was significantly reduced.

As a result of the use of caffeine and caffeine with propolis extract, the accessibility of the primary sorption sites is limited. The value of m for the caffeine (AC) and caffeine–propolis (ACP) variants, i.e., 0.1216 and 0.0984, represents, respectively, 21.7 and 17.5% of the corresponding value determined for the chitosan film produced with acetic acid (0.5609). Consequently, the anticipated impact of incorporating the examined additives into the chitosan-based films could include diminishing their moisture-absorbing characteristics, enhancing their stability, and potentially improving mechanical properties such as tensile strength (TS) and elongation at break (EB).

3.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface attributes of the films, as examined via scanning electron microscopy, are presented in Figure 3.

The studies revealed that the film samples A (chitosan prepared in acetic acid) and C (chitosan prepared in citric acid) were characterized by a smooth surface structure in most areas, without obvious holes or bubbles, with all major areas being smooth and homogeneous. This is evidence for a great dispersion of chitosan in both used acids. A homogenous appearance is an indication of the structural stability of the chitosan/acid systems. The inclusion of CAF in the tested chitosan film samples (AC and CC) caused the emergence of unequally sized irregular clusters, probably due to the aggregation of caffeine particles on the surface. In the case of samples AC and CC, agglomeration caused a decrease in the sample elasticity (decrease in elongation). Also, the addition of EP to chitosan films caused the emergence of irregular clusters on the surface (samples ACP and CCP). This agglomeration reduced the mechanical properties of samples ACP and CCP and caused a deterioration of the OTR, as presented in Section 3.3.

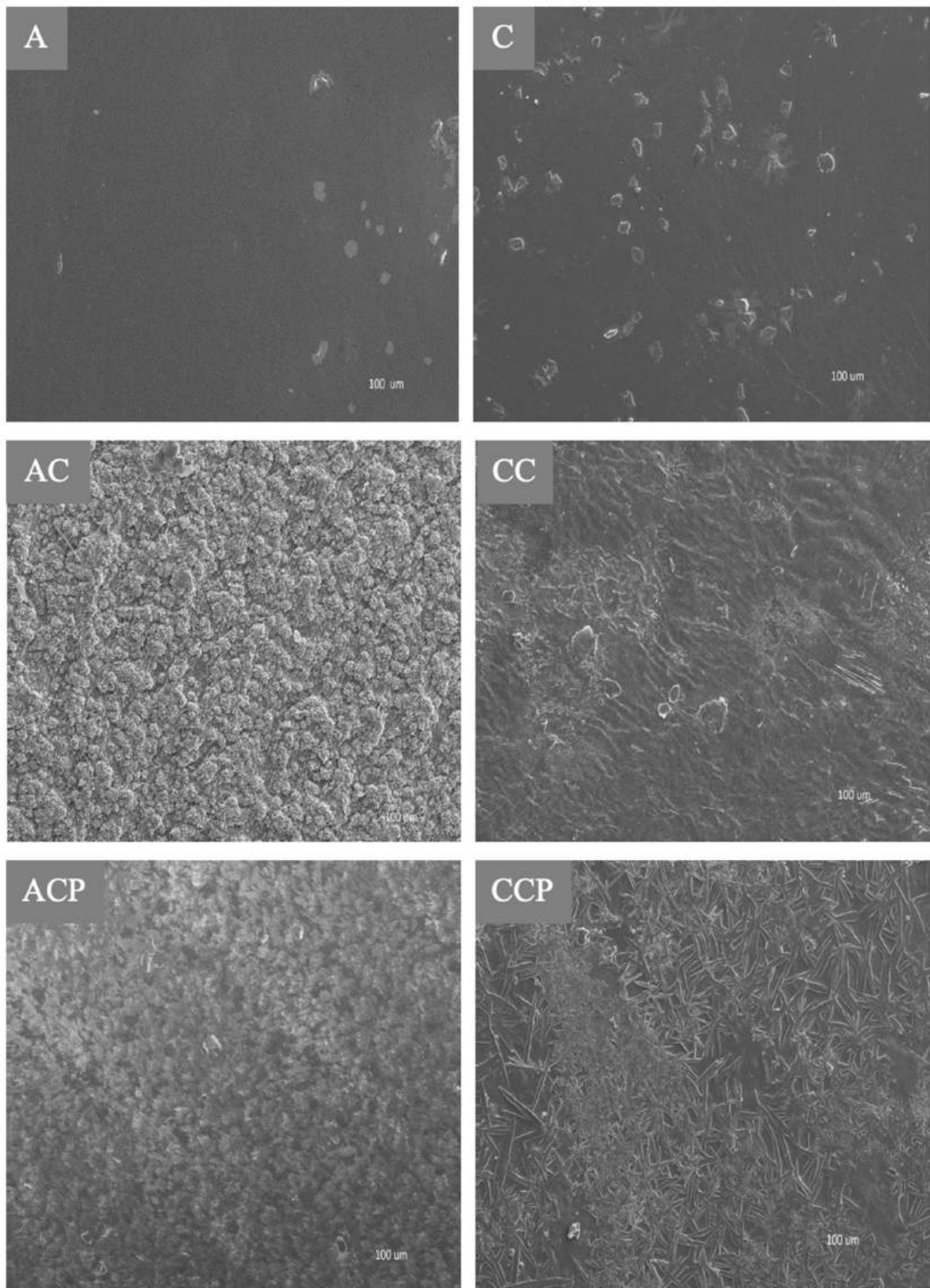


Figure 3. SEM images of the chitosan-based films samples: (A) (acetic acid/no additives), (AC) (acetic acid/CAF), (ACP) (acetic acid/CAF/EP), (C) (citric acid/no additives), (CC) (citric acid/CAF), (CCP) (citric acid/CAF/EP).

3.6. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

In order to evaluate the interaction among chitosan and used natural additives—caffeine and propolis extract—an FTIR infrared study was carried out, and the outcomes in the form of spectra are illustrated in Figure 4.

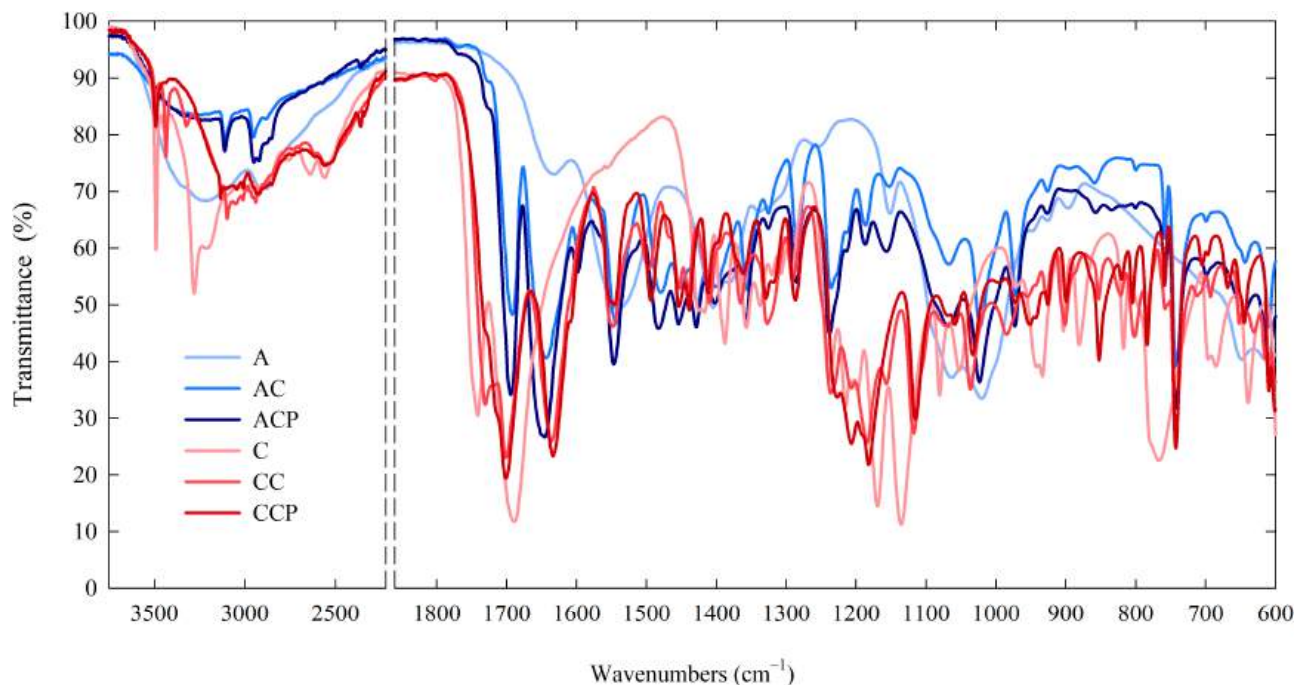


Figure 4. ATR-FTIR spectra of chitosan-based films.

The spectra of all the films exhibited a pattern akin to that of chitosan films devoid of additives, with the majority of peaks displaying chitosan characteristics. However, there were variations in transmittance intensities at specific peaks. The peaks in the range of 3500–3000 cm^{-1} and at 2880 cm^{-1} are related to the -OH bonds and aliphatic C-H stretching vibration [62,72]. The peaks at 1650, 1557 and 1371 cm^{-1} can be assigned to C-O stretching in amide I, N-H bending in amide II and C-N stretching in amide III [9,62]. The peak at 1025 cm^{-1} is attributed to C-O stretching in the alcohol group [72].

In the spectra of films containing caffeine, distinctive bands corresponding to the caffeine molecule were observed, specifically at 1700 and 1650 cm^{-1} , which can be attributed to the stretching vibrations of C=O bonds within the acetamide groups of amide I, as well as at 1550 and 765 cm^{-1} , indicative of the stretching vibrations of N-H and/or C-N groups of amide II [73–75]. On the other hand, in the spectra of films containing both caffeine and propolis extracts, distinctive bands originating from propolis, primarily associated with phenolic compounds, can be discerned. The bands at 2924 and 2850 cm^{-1} are ascribed to C-H stretching vibrations and confirm the presence of long-chain alkyl compounds in the bee glue extract. The peak at 1732 cm^{-1} corresponds to C-O stretching vibration. The stretching and bending bands at 1634 (C=O), 1515 and 1451 (C=C) cm^{-1} may be assigned mainly to aromatic rings of phenolic compounds. Moreover, the wide band around 3420 cm^{-1} corresponding to the stretching vibrations of the O-H band also confirms the presence of phenolic compounds from propolis [62,76,77]. Alterations, such as shifting and broadening of certain bonds observed in the FTIR spectra, may be attributed to the presence of intermolecular interactions between the -OH and -NH₂ groups within chitosan and the phenolic compounds found in propolis. This aligns with information from the existing literature [9,62,72].

3.7. Tensile Properties

Mechanical testing holds significance in terms of assessing the practicality of the fabricated materials. Hence, the tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of the chitosan-based films under investigation have been assessed, and the outcomes are illustrated in Figures 5 and 6, respectively.

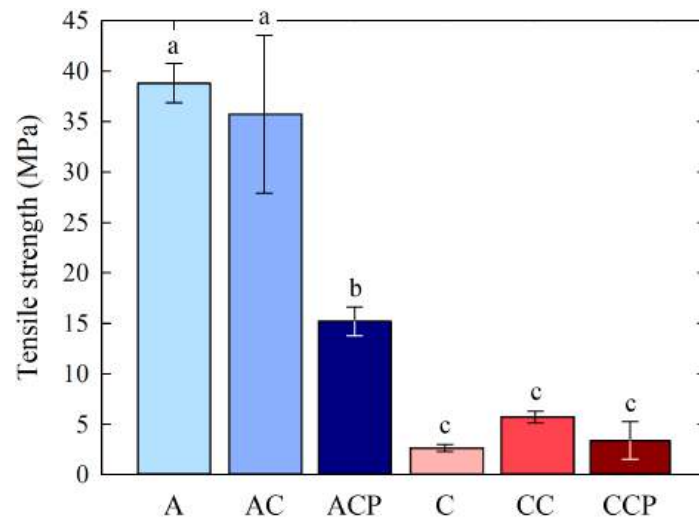


Figure 5. Tensile strength (TS) for prepared chitosan films. Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

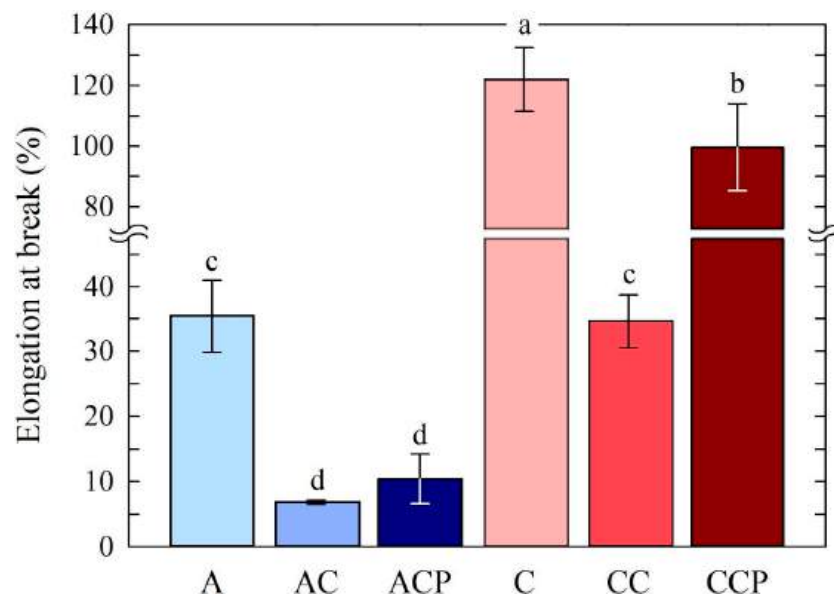


Figure 6. Elongation at break (EB) for prepared chitosan films. Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

The films obtained had various values of tensile strength, whereby the highest values were found in the samples with acetic acid. The TS for sample A was 38.80 MPa, and for sample AC, it was 35.73 MPa. Sample ACP, which involved the use of additional caffeine and EP, had a TS of 15.22 MPa. Samples where citric acid was used were characterized by the following tensile strengths. Sample C, with pure chitosan in citric acid, had a TS of 2.65 MPa. The addition of caffeine resulted in a minor tensile strength of 5.72 MPa. On the other hand, sample CCP, which is a combination of chitosan dissolved in citric acid, caffeine and EP, obtained a value of 3.40 MPa. The mere addition of caffeine had no

major effect on changes in tensile strength. However, the solvent used was an important factor. The selection of a natural carboxylic acid is essential for evaluating the potential utility of food packaging materials. Furthermore, investigating the interplay between the structure and properties of chitosan films in conjunction with the type of acid can optimize the attributes of the base film without the need for additional additives. This can offer substantial insights into film selection to meet the requirements of food packaging [78].

Regarding elongation at break, an opposite relationship to tensile strength (TS) can be observed. Samples C, CC and CCP are characterized by the highest elongation at break (EB) for the prepared chitosan films, while samples ACP and CCP are marked by the highest value of elongation at break at 121.87 and 99.4%, respectively. Therefore, the use of citric acid as a solvent has a positive effect on elongation at break and, thus, the flexibility of the sample. For sample CC, where caffeine was applied, there was a decrease in elongation to 34.71%. Samples in which acetic acid was used were marked by lesser elongation. For pure sample A, EB was 35.5%, while samples AC and ACP had elongation values of 6.92 and 10.46%, respectively.

The research on the mechanical properties of the prepared films demonstrated that the solvent had a key impact on the results. As is known, acetic acid is a common solvent that acts as a proton donor, creating a dense chitosan film. The study demonstrated no effect of acetic acid on the deterioration of tensile strength in the tested films. The samples with acetic acid were characterized by greater tensile strength than the samples with citric acid. As reported in the literature [78], acidic structure affects the properties of the resulting films through electrostatic interactions, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions. Therefore, acids with more carboxyl groups can improve film elongation by means of ionic crosslinking. In this study, citric acid improved the elongation at break of the obtained films. Elongation for the samples with citric acid was significantly greater than for the film where acetic acid was used. Citric acid is recognized for containing three carboxyl groups, which leads to a greater number of hydroxyl groups in the film matrix. This increase in hydroxyl groups promotes enhanced chain mobility and reduces intermolecular forces, resulting in an augmentation of the elongation at break while simultaneously causing a decrease in the tensile strength of the tested samples [79].

4. Conclusions

Chitosan solutions supplemented with caffeine and propolis extract have been demonstrated to display strong antioxidant properties, contributing to the antioxidant efficacy of chitosan-based solutions. Among the chitosan-based solutions tested, the highest antioxidant properties were observed in solution prepared with citric acid with the addition of CAF and EP, showing a greater free radical scavenging capacity than the standard antioxidant Trolox. Furthermore, the study demonstrated that chitosan-based films dissolved in citric acid exhibited strong antimicrobial activity against harmful bacterial strains, and this effect was further heightened with the inclusion of propolis extract and caffeine. The addition of acids, caffeine, and propolis extract can alter the barrier properties of chitosan-based films, consequently influencing their water vapor and oxygen permeability. This modification renders them well-suited for application in the food packaging sector. The choice of solvent was observed to influence the mechanical characteristics of chitosan films, with citric acid resulting in higher elongation at break but lower tensile strength in comparison to acetic acid. This underscores the significance of selecting appropriate natural acids for potential food packaging applications.

The findings indicate that natural additives like propolis extract and caffeine possess the capacity to enhance the antioxidant, antimicrobial, and barrier characteristics of chitosan-based materials, rendering them a promising choice for food packaging applications.

Author Contributions: Conceptualization, K.S., M.W., R.D. and I.R.; methodology, K.S., J.M., A.S., L.M. and W.K.; formal analysis, K.S., J.M., A.S., L.M. and W.K.; writing—original draft preparation, K.S. and M.W.; visualization, K.S. and J.M.; supervision, R.D. and I.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Porta, R.; Sabbah, M.; Di Pierro, P. Biopolymers as Food Packaging Materials. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Asgher, M.; Qamar, S.A.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N. Bio-Based Active Food Packaging Materials: Sustainable Alternative to Conventional Petrochemical-Based Packaging Materials. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Calligaris, S.; Manzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M.C. Shelf-Life Assessment of Food Undergoing Oxidation—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 1903–1912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bintsis, T. Foodborne Pathogens. *AIMS Microbiol.* **2017**, *3*, 529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, P.K. Chitosan Based Antimicrobial Films for Food Packaging Applications. *e-Polymers* **2008**, *8*, 93. [[CrossRef](#)]
6. Yadav, M.; Goswami, P.; Paritosh, K.; Kumar, M.; Pareek, N.; Vivekanand, V. Seafood Waste: A Source for Preparation of Commercially Employable Chitin/Chitosan Materials. *Bioresour. Bioprocess.* **2019**, *6*, 8. [[CrossRef](#)]
7. Wang, H.; Qian, J.; Ding, F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 395–413. [[CrossRef](#)]
8. Leceta, I.; Guerrero, P.; De La Caba, K. Functional Properties of Chitosan-Based Films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 339–346. [[CrossRef](#)]
9. Siripatrawan, U.; Vitchayakitti, W. Improving Functional Properties of Chitosan Films as Active Food Packaging by Incorporating with Propolis. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 695–702. [[CrossRef](#)]
10. Pereda, M.; Amica, G.; Marcovich, N.E. Development and Characterization of Edible Chitosan/Olive Oil Emulsion Films. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 1318–1325. [[CrossRef](#)]
11. Van Den Broek, L.A.M.; Knoop, R.J.I.; Kappen, F.H.J.; Boeriu, C.G. Chitosan Films and Blends for Packaging Material. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *116*, 237–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Foster, L.J.R.; Butt, J. Chitosan Films Are NOT Antimicrobial. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 417–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sharma, S.; Barkauskaite, S.; Jaiswal, A.K.; Jaiswal, S. Essential Oils as Additives in Active Food Packaging. *Food Chem.* **2021**, *343*, 128403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Chitosan with Natural Additives as a Potential Food Packaging. *Materials* **2023**, *16*, 1579. [[CrossRef](#)]
15. Irigoiti, Y.; Navarro, A.; Yamul, D.; Libonatti, C.; Tabera, A.; Basualdo, M. The Use of Propolis as a Functional Food Ingredient: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *115*, 297–306. [[CrossRef](#)]
16. Kasote, D.; Bankova, V.; Viljoen, A.M. Propolis: Chemical Diversity and Challenges in Quality Control. *Phytochem. Rev.* **2022**, *21*, 1887–1911. [[CrossRef](#)]
17. Zuhlendri, F.; Chandrasekaran, K.; Kowacz, M.; Ravalia, M.; Kripal, K.; Fearnley, J.; Perera, C.O. Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 1360. [[CrossRef](#)]
18. Šturm, L.; Ulrih, N.P. Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood* **2020**, *1*, 24–37. [[CrossRef](#)]
19. Almuhayawi, M.S. Propolis as a Novel Antibacterial Agent. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 3079–3086. [[CrossRef](#)]
20. Petrucci, L.; Corbo, M.R.; Campaniello, D.; Speranza, B.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. Antifungal and Antibacterial Effect of Propolis: A Comparative Hit for Food-Borne *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and Fungi. *Foods* **2020**, *9*, 559. [[CrossRef](#)]
21. Pobiega, K.; Kraśniewska, K.; Przybył, J.L.; Bączek, K.; Żubernik, J.; Witrowa-Rajchert, D.; Gniewosz, M. Growth Biocontrol of Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms of Food by Polish Propolis Extracts. *Molecules* **2019**, *24*, 2965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Torlak, E.; Sert, D. Antibacterial Effectiveness of Chitosan-Propolis Coated Polypropylene Films against Foodborne Pathogens. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 52–55. [[CrossRef](#)]
23. Ismail, M.I.; Roslan, A.; Saari, N.S.; Hashim, K.H.; Kalamullah, M.R. Ethanollic Extract of Propolis for Biodegradable Films Packaging Enhanced with Chitosan. *AIP Conf. Proc.* **2017**, *1885*, 020231. [[CrossRef](#)]
24. Rollini, M.; Mascheroni, E.; Capretti, G.; Coma, V.; Musatti, A.; Piergiovanni, L. Propolis and Chitosan as Antimicrobial and Polyphenols Retainer for the Development of Paper Based Active Packaging Materials. *Food Packag. Shelf Life* **2017**, *14*, 75–82. [[CrossRef](#)]
25. Pastor, C.; Sánchez-González, L.; Cháfer, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. Physical and Antifungal Properties of Hydroxypropylmethylcellulose Based Films Containing Propolis as Affected by Moisture Content. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 1174–1183. [[CrossRef](#)]

26. Stanicka, K.; Dobrucka, R.; Woźniak, M.; Sip, A.; Majka, J.; Kozak, W.; Ratajczak, I. The Effect of Chitosan Type on Biological and Physicochemical Properties of Films with Propolis Extract. *Polymers* **2021**, *13*, 3888. [[CrossRef](#)]
27. Van Dam, R.M.; Hu, F.B.; Willett, W.C. Coffee, Caffeine, and Health. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 369–378. [[CrossRef](#)]
28. Nehlig, A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 384–411. [[CrossRef](#)]
29. Temple, J.L.; Bernard, C.; Lipshultz, S.E.; Czachor, J.D.; Westphal, J.A.; Mestre, M.A. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Front. Psychiatry* **2017**, *8*, 80. [[CrossRef](#)]
30. Ramanaviėienė, A.; Mostovojus, V.; Bachmatova, I.; Ramanaviėius, A. Anti-Bacterial Effect of Caffeine on Escherichia Coli and *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Med. Litu.* **2003**, *10*, 185–188.
31. Chakraborty, P.; Dastidar, D.G.; Paul, P.; Dutta, S.; Basu, D.; Sharma, S.R.; Basu, S.; Sarker, R.K.; Sen, A.; Sarkar, A.; et al. Inhibition of Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* by Caffeine: A Potential Approach for Sustainable Management of Biofilm. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 623–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ikram, M.; Park, T.J.; Ali, T.; Kim, M.O. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Caffeine against Alzheimer's and Parkinson's Disease: Insight into the Role of Nrf-2 and A2AR Signaling. *Antioxidants* **2020**, *9*, 902. [[CrossRef](#)]
33. Monente, C.; Bravo, J.; Vitas, A.I.; Arbilla, L.; De Peña, M.P.; Cid, C. Coffee and Spent Coffee Extracts Protect against Cell Mutagens and Inhibit Growth of Food-Borne Pathogen Microorganisms. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 365–374. [[CrossRef](#)]
34. Ibrahim, S.A.; Salameh, M.M.; Phetsomphou, S.; Yang, H.; Seo, C.W. Application of Caffeine, 1,3,7-Trimethylxanthine, to Control *Escherichia Coli* O157:H7. *Food Chem.* **2006**, *99*, 645–650. [[CrossRef](#)]
35. Almeida, A.A.P.; Naghetini, C.C.; Santos, V.R.; Antonio, A.G.; Farah, A.; Glória, M.B.A. Influence of Natural Coffee Compounds, Coffee Extracts and Increased Levels of Caffeine on the Inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 459–461. [[CrossRef](#)]
36. Bajer, D.; Burkowska-But, A. Innovative and Environmentally Safe Composites Based on Starch Modified with Dialdehyde Starch, Caffeine, or Ascorbic Acid for Applications in the Food Packaging Industry. *Food Chem.* **2022**, *374*, 131639. [[CrossRef](#)]
37. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Majka, J.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Characteristics of Chitosan Films with the Bioactive Substances—Caffeine and Propolis. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14*, 358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. ASTM F3136-15; Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate through Plastic Film and Sheeting Using a Dynamic Accumulation Method. ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2015.
39. ISO 2528:2017; Sheet Materials—Determination of Water Vapour Transmission Rate (WVTR)—Gravimetric (Dish) Method. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017.
40. Furmaniak, S.; Terzyk, A.P.; Gauden, P.A. Some Remarks on the Classification of Water Vapor Sorption Isotherms and Blahovec and Yanniotis Isotherm Equation. *Dry. Technol.* **2011**, *29*, 984–991. [[CrossRef](#)]
41. Furmaniak, S.; Terzyk, A.P.; Gauden, P.A.; Rychlicki, G. Applicability of the Generalised D'Arcy and Watt Model to Description of Water Sorption on Pineapple and Other Foodstuffs. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 718–723. [[CrossRef](#)]
42. Furmaniak, S.; Terzyk, A.P.; Gołembiewski, R.; Gauden, P.A.; Czepirski, L. Searching the Most Optimal Model of Water Sorption on Foodstuffs in the Whole Range of Relative Humidity. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1203–1214. [[CrossRef](#)]
43. ASTM D 882-12; Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2015.
44. Nunes, C.; Maricato, É.; Cunha, Á.; Nunes, A.; Da Silva, J.A.L.; Coimbra, M.A. Chitosan–Caffeic Acid–Genipin Films Presenting Enhanced Antioxidant Activity and Stability in Acidic Media. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 236–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, Q.; Tian, F.; Feng, Z.; Fan, X.; Pan, Z.; Zhou, J. Antioxidant Activity and Physicochemical Properties of Chitosan Films Incorporated with *Lycium Barbarum* Fruit Extract for Active Food Packaging. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *50*, 458–464. [[CrossRef](#)]
46. Siripatrawan, U.; Harte, B.R. Physical Properties and Antioxidant Activity of an Active Film from Chitosan Incorporated with Green Tea Extract. *Food Hydrocoll.* **2010**, *24*, 770–775. [[CrossRef](#)]
47. Andrade, J.K.S.; Denadai, M.; de Oliveira, C.S.; Nunes, M.L.; Narain, N. Evaluation of Bioactive Compounds Potential and Antioxidant Activity of Brown, Green and Red Propolis from Brazilian Northeast Region. *Food Res. Int.* **2017**, *101*, 129–138. [[CrossRef](#)]
48. Kurek-Górecka, A.; Keskin, Ş.; Bobis, O.; Felitti, R.; Górecki, M.; Otręba, M.; Stojko, J.; Olczyk, P.; Kolayli, S.; Rzepecka-Stojko, A. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. *Plants* **2022**, *11*, 1203. [[CrossRef](#)]
49. Martinello, M.; Mutinelli, F.; Zooprofilattico, I.; Delle Venezie, S. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 71. [[CrossRef](#)]
50. Socha, R.; Gałkowska, D.; Bugaj, M.; Juszcak, L. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Various Regions of Poland. *Curr. Bioact.* **2015**, *29*, 416–422. [[CrossRef](#)]
51. Miłek, M.; Ciszkowicz, E.; Tomczyk, M.; Sidor, E.; Zaguła, G.; Lecka-Szlachta, K.; Pasternakiewicz, A.; Dżugan, M. The Study of Chemical Profile and Antioxidant Properties of Poplar-Type Polish Propolis Considering Local Flora Diversity in Relation to Antibacterial and Anticancer Activities in Human Breast Cancer Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Woźniak, M.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Rogoziński, T.; Ratajczak, I. The Role of Seasonality on the Chemical Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Polish Propolis in Human Erythrocytes. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *29*, 301–308. [[CrossRef](#)]

53. Uranga, J.; Puertas, A.I.; Etxabide, A.; Dueñas, M.T.; Guerrero, P.; de la Caba, K. Citric Acid-Incorporated Fish Gelatin/Chitosan Composite Films. *Food Hydrocoll.* **2019**, *86*, 95–103. [[CrossRef](#)]
54. Calinoiu, L.F.; Ștefanescu, B.E.; Pop, I.D.; Muntean, L.; Vodnar, D.C. Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation. *Coatings* **2019**, *9*, 194. [[CrossRef](#)]
55. Pavli, F.; Tassou, C.; Nychas, G.J.E.; Chorianopoulos, N. Probiotic Incorporation in Edible Films and Coatings: Bioactive Solution for Functional Foods. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 150. [[CrossRef](#)]
56. Przybyłek, I.; Karpiński, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* **2019**, *24*, 2047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Popova, M.; Giannopoulou, E.; Skalicka-Wóznia, K.; Graikou, K.; Widelski, J.; Bankova, V.; Kalofonos, H.; Sivolapenko, G.; Gawel-Bęben, K.; Antosiewicz, B.; et al. Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland. *Molecules* **2017**, *22*, 1159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Woźniak, M.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Broniarczyk, J.; Waśkiewicz, A.; Ratajczak, I. Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland. *Molecules* **2023**, *28*, 141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Veiga, R.S.; De Mendonça, S.; Mendes, P.B.; Paulino, N.; Mimica, M.J.; Netto, A.A.L.; Lira, I.S.; Opez, G.-C.L.; Negrao, V.; Marcucci, M.C. Artepillin C and Phenolic Compounds Responsible for Antimicrobial and Antioxidant Activity of Green Propolis and *Baccharis Dracunculifolia* DC. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 911–920. [[CrossRef](#)]
60. Yilmaz, S.; Sova, M.; Microbiology, S.E.-J.A. Antimicrobial Activity of Trans-cinnamic Acid and Commonly Used Antibiotics against Important Fish Pathogens and Nonpathogenic Isolates. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1714–1727. [[CrossRef](#)]
61. Uzel, A.; Öncü, Ö.; Çoğulu, D.; Research, Ö.G.-M. Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Four Different Anatolian Propolis Samples. *Microbiol. Res.* **2005**, *160*, 189–195. [[CrossRef](#)]
62. Correa-Pacheco, Z.N.; Bautista-Baños, S.; Ramos-García, M.d.L.; Martínez-González, M.d.C.; Hernández-Romano, J. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Edible Propolis-Chitosan Nanoparticle Films. *Prog. Org. Coat.* **2019**, *137*, 105326. [[CrossRef](#)]
63. Zhang, W.; Cao, J.; Jiang, W. Analysis of Film-Forming Properties of Chitosan with Different Molecular Weights and Its Adhesion Properties with Different Postharvest Fruit Surfaces. *Food Chem.* **2022**, *395*, 133605. [[CrossRef](#)]
64. Zehra, A.; Wani, S.M.; Bhat, T.A.; Jan, N.; Hussain, S.Z.; Naik, H.R. Preparation of a Biodegradable Chitosan Packaging Film Based on Zinc Oxide, Calcium Chloride, Nano Clay and Poly Ethylene Glycol Incorporated with Thyme Oil for Shelf-Life Prolongation of Sweet Cherry. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *217*, 572–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ashrafi, A.; Jokar, M.; Mohammadi Nafchi, A. Preparation and Characterization of Biocomposite Film Based on Chitosan and Kombucha Tea as Active Food Packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 444–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Velickova, E.; Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S.; Alves, V.D.; Moldão-Martins, M. Impact of Chitosan-Beeswax Edible Coatings on the Quality of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa* Cv Camarosa) under Commercial Storage Conditions. *LWT* **2013**, *52*, 80–92. [[CrossRef](#)]
67. Wiles, J.L.; Vergano, P.J.; Barron, F.H.; Bunn, J.M.; Testin, R.F. Water Vapor Transmission Rates and Sorption Behavior of Chitosan Films. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1175–1179. [[CrossRef](#)]
68. Cervera, M.F.; Karjalainen, M.; Airaksinen, S.; Rantanen, J.; Krogars, K.; Heinämäki, J.; Colarte, A.I.; Yliruusi, J. Physical Stability and Moisture Sorption of Aqueous Chitosan-Amylose Starch Films Plasticized with Polyols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 69–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Srinivasa, P.C.; Ramesh, M.N.; Tharanathan, R.N. Effect of Plasticizers and Fatty Acids on Mechanical and Permeability Characteristics of Chitosan Films. *Food Hydrocoll.* **2007**, *21*, 1113–1122. [[CrossRef](#)]
70. Aguirre-Loredo, R.Y.; Rodríguez-Hernández, A.I.; Morales-Sánchez, E.; Gómez-Aldapa, C.A.; Velazquez, G. Effect of Equilibrium Moisture Content on Barrier, Mechanical and Thermal Properties of Chitosan Films. *Food Chem.* **2016**, *196*, 560–566. [[CrossRef](#)]
71. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. A New Approach to Obtain Chitosan Films—Characteristics of Films Prepared with Tea and Coffee Kombucha as Natural Chitosan Solvents. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *197*, 116634. [[CrossRef](#)]
72. De Carli, C.; Aylanc, V.; Mouffok, K.M.; Santamaria-Echart, A.; Barreiro, F.; Tomás, A.; Pereira, C.; Rodrigues, P.; Vilas-Boas, M.; Falcão, S.I. Production of Chitosan-Based Biodegradable Active Films Using Bio-Waste Enriched with Polyphenol Propolis Extract Envisaging Food Packaging Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *213*, 486–497. [[CrossRef](#)]
73. Gunasekaran, S.; Sankari, G.; Ponnusamy, S. Vibrational Spectral Investigation on Xanthine and Its Derivatives—Theophylline, Caffeine and Theobromine. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 117–127. [[CrossRef](#)]
74. Belscak-Cvitanovic, A.; Komes, D.; Karlović, S.; Djaković, S.; Špoljarić, I.; Mršić, G.; Ježek, D. Improving the Controlled Delivery Formulations of Caffeine in Alginate Hydrogel Beads Combined with Pectin, Carrageenan, Chitosan and Psyllium. *Food Chem.* **2015**, *167*, 378–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Morrish, C.; Whitehead, F.; Istivan, T.; Kasapis, S. The Effect of Trisodium Phosphate Crosslinking on the Diffusion Kinetics of Caffeine from Chitosan Networks. *Food Chem.* **2022**, *381*, 132272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Moț, A.C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Sârbu, C. Rapid and Effective Evaluation of the Antioxidant Capacity of Propolis Extracts Using DPPH Bleaching Kinetic Profiles, FT-IR and UV-Vis Spectroscopic Data. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 516–522. [[CrossRef](#)]
77. Wu, Y.W.; Sun, S.Q.; Zhao, J.; Li, Y.; Zhou, Q. Rapid Discrimination of Extracts of Chinese Propolis and Poplar Buds by FT-IR and 2D IR Correlation Spectroscopy. *JMoSt* **2008**, *883–884*, 48–54. [[CrossRef](#)]

78. Zhang, W.; Jiang, Q.; Shen, J.; Gao, P.; Yu, D.; Xu, Y.; Xia, W. The Role of Organic Acid Structures in Changes of Physicochemical and Antioxidant Properties of Crosslinked Chitosan Films. *Food Packag. Shelf Life* **2022**, *31*, 100792. [[CrossRef](#)]
79. Mittal, A.; Singh, A.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; Nilsuwan, K.; Huda, N.; de la Caba, K. Composite Films Based on Chitosan and Epigallocatechin Gallate Grafted Chitosan: Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Food Hydrocoll.* **2021**, *111*, 106384. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Fruit Vinegars as Natural and Bioactive Chitosan Solvents in the Production of Chitosan-Based Films

Karolina Stefanowska ¹, Magdalena Woźniak ^{1,*}, Renata Dobrucka ², Anna Sip ³, Lucyna Mrówczyńska ⁴, Agnieszka Waśkiewicz ¹ and Izabela Ratajczak ¹

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60625 Poznan, Poland; karolina.stefanowska@up.poznan.pl (K.S.); agnieszka.waskiewicz@up.poznan.pl (A.W.); izabela.ratajczak@up.poznan.pl (I.R.)
- ² Department of Industrial Products and Packaging Quality, Institute of Quality Science, Poznań University of Economics and Business, al. Niepodległości 10, 61875 Poznan, Poland; renata.dobrucka@ue.poznan.pl
- ³ Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60627 Poznan, Poland; anna.sip@up.poznan.pl
- ⁴ Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61614 Poznan, Poland; lucyna.mrowczynska@amu.edu.pl
- * Correspondence: magdalena.wozniak@up.poznan.pl

Abstract: Natural fruit vinegars, derived from various fruits, enhance culinary experience and offer potential health benefits due to their bioactive compounds. In this study, fruit vinegars (apple, blackcurrant, and cherry) were used as natural solvents for producing chitosan films, introducing an environmentally friendly approach. Fruit vinegars and chitosan-based solutions were examined for their antioxidant and antimicrobial properties. In turn, the obtained chitosan films were characterized by their antimicrobial, mechanical, and structural properties. Both fruit vinegars and film-forming chitosan solutions showed antioxidant activity, and chitosan–cherry vinegar solutions exhibited the highest antiradical and ferrous ion-chelating effect. All solvents and chitosan-based solutions were characterized by antimicrobial properties, especially against *Pseudomonas aeruginosa* (inhibition zone > 28 mm). Antimicrobial activity was also preserved in the case of chitosan-based film, especially when produced with cherry vinegar, which showed activity against the broadest spectrum of bacteria. The largest zone of inhibition for all samples was observed for *P. aeruginosa* in the range of 19 mm from the inhibition zone to >28 mm, depending on the type of vinegar used as a solvent. The conducted tests showed that the type of vinegar used also affects the mechanical parameters of the films obtained, such as elongation at break, for which values were recorded from 3.97 to 4.93 MPa, or tensile strength, for which the values were recorded from 48.48 to 70.58 MPa. The results obtained demonstrate that natural fruit vinegars, serving as chitosan solvents, can be an alternative to traditionally used acidic solvents, yielding films with favorable properties.

Keywords: antimicrobial effect; antioxidant activity; mechanical properties



Academic Editor: Xiaowen Shi

Received: 8 November 2024

Revised: 18 December 2024

Accepted: 23 December 2024

Published: 25 December 2024

Citation: Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Dobrucka, R.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Ratajczak, I. Fruit Vinegars as Natural and Bioactive Chitosan Solvents in the Production of Chitosan-Based Films. *Polymers* **2025**, *17*, 11. <https://doi.org/10.3390/polym17010011>

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chitosan, a biopolymer derived from chitin, holds promising prospects in the production of films and packaging materials due to its advantageous properties. As a polysaccharide, chitosan exhibits biodegradability, making it an eco-friendly alternative to conventional plastic materials [1]. Its film-forming ability, oxygen barrier properties, and antimicrobial activity make it suitable for various packaging applications, particularly in the food industry, where extending shelf life and maintaining product freshness are

paramount [1–3]. The use of chitosan as a natural biopolymer in food packaging makes it possible to take advantage of its positive capabilities to protect food from spoilage while reducing dependence on synthetic plastics [1].

In order to increase biological activity, especially the antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films, various bioactive additives, such as essential oils [4] or plant extracts [5], among others, are added to the chitosan matrix. Current research efforts are focused on identifying novel and bioactive solvents, thus paving the way for the development of innovative chitosan-based packaging materials with enhanced functionality and sustainability. A particularly interesting approach is the use of natural solutions, which, in addition to the ability to dissolve chitosan, also have beneficial biological properties, including kombucha solutions or vinegars [3,6]. Chitosan-based films obtained by dissolving chitosan in tea and coffee kombucha solutions showed activity against *Salmonella* Enterica and *Pseudomonas aeruginosa*, especially when a black tea kombucha solution was used as the solvent [3]. The chitosan films prepared with pomegranate and hawthorn vinegars exhibited high activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [6].

The production process of natural fruit vinegars, based on carefully controlled fermentation, imparts not only a unique flavor but also an abundance of bioactive substances, which appear to positively impact human health [7]. Numerous studies indicate that fruit vinegars have many benefits when it comes to human health, positively influencing glucose and lipid control [8] while also playing a crucial role in preventing hypertension [9] with proven anticancer effects [10]. Vinegars produced from fruits are rich in bioactive compounds like amino acids, organic acids, phenols, and mineral compounds. Depending on the raw material subjected to the fermentation process and the production methods employed, fruit vinegars exhibit varying degrees of antioxidant and antimicrobial activity [11–13]. The predominant acid in fruit vinegars is acetic acid, which inhibits the growth of microorganisms, including *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus hirae*, and *Aspergillus brasiliensis* [14,15].

The purpose of this study was to obtain chitosan-based films where fruit vinegars were used as natural and bioactive solvents for chitosan. The results of Adimcilar et al. [6] indicate that natural vinegars (grape, pomegranate, hawthorn, and apple) have great potential in the production of chitosan-based films, and their biological and physico-mechanical properties suggest their potential application in the food packaging industry. In this study, three types of fruit vinegars commonly used in Polish cuisine—apple, cherry, and blackcurrant—were tested as natural and bioactive solvents for dissolving chitosan in the production of chitosan-based films. Notably, this is the first study to explore the use of blackcurrant and cherry vinegars as solvents for chitosan. The study focused on comparing the antimicrobial, structural, and mechanical properties of chitosan films made with these three types of vinegar.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Chitosan Solutions and Chitosan Films

Chitosan from crab shells (viscosity > 400 mPa·s, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was used to prepare chitosan solutions and films. Chitosan (5 g) was dissolved in 500 mL of solvents—fruit vinegars. Three types of vinegar were used: apple, blackcurrant, and cherry, which were purchased from Olini (Dzieńmorowice, Poland). The solutions were mixed for 2 h using a mechanical stirrer (Heidolph Instruments GmbH & KG, Schwabach, Germany). The chitosan solutions for further tests were stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Chitosan films were prepared by pouring the chitosan solutions onto Petri dishes with Teflon inserts and dried at room temperature for 24 h. As a result of the experiment, three

chitosan solutions and three chitosan films were obtained, for which the symbols and compositions are presented in Table 1.

Table 1. Sample composition and abbreviations.

Solvent	Abbreviation	
	Chitosan Solution	Chitosan Film
Apple vinegar (AV)	AV + Ch	AV + ChF
Blackcurrant vinegar (BV)	BV + Ch	BV + ChF
Cherry vinegar (CV)	CV + Ch	CV + ChF

2.2. Characteristics of Fruit Vinegars

The pH value of acetic acid and fruit vinegars was measured using a Hanna Edge HI2002-02 pH meter (Hanna Instruments, Olsztyn, Poland).

In fruit vinegars, the concentration of lactic and acetic acid was determined chromatographically. Fruit vinegars were filtered through a 0.45 µm syringe filter (Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Germany) and analyzed by a chromatography system comprising the Aquity UPLC chromatograph equipped with a photodiode detector (PDA eλ Detector) (UPLC-PDA, Waters, Milford, MA, USA). The parameters of the chromatographic analysis were as follows: chromatographic column—Waters Symmetry C18 column (150 × 4.6 mm id, 5 µm); mobile phase—0.010 M sodium dihydrogen phosphate buffer adjusted with H₃PO₄ to pH 2.80; photodiode detection—210 nm; injection volume—3 µL; and flow rate—0.35 mL/min. For the analysts, the calibration curves showed excellent linearity with $r > 0.996$. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for both acids were 0.15 and 0.45 mL/L, respectively. All reagents used for analysis were of chromatographic grade and purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

The total phenolic content (TPC) in fruit vinegar solutions was determined using the Folin–Ciocalteu procedure. The vinegar solution (0.1 mL) was mixed with the Folin–Ciocalteu reagent (0.25 mL) after 3 min with a Na₂CO₃ (Avantor, Gliwice, Poland) solution (3 mL, 10%). The absorbance at 765 nm in all solutions was measured by a Cary 300 Bio UV-Visible scanning spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) after incubation for 40 min in the dark and at ambient temperature. Results were expressed as the gallic acid (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) equivalent in mL of vinegar solution (µg GAeq/mL). All measurements were made in triplicate.

The total flavonoid content (TFC) in fruit vinegar solutions was performed based on the aluminum chloride colorimetric method. The vinegar solutions (0.1 mL) were mixed with methanol (0.9 mL) and AlCl₃ (Avantor, Gliwice, Poland) solution (2 mL, 2%). The absorbance at 430 nm was read by the Cary 300 Bio UV-Visible scanning spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) after incubation for 45 min in the dark and at ambient temperature. All results were expressed as µg of quercetin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), equivalent to the vinegar solution in mL (µg Qeq/mL). All measurements were made in triplicate.

2.3. Antioxidant Activity of Chitosan-Based Solutions

To assess the antiradical activity of fruit vinegars and chitosan solutions, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) radical scavenging assay was employed. Briefly, each solution of fruit vinegar and chitosan solution (3 µL) was added to 297 µL of deionized water. Trolox solution (10 mg/mL in DMSO) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as a reference antioxidant (positive control) and was added in an equivalent amount. A sample without solutions tested, as well as Trolox, served as a negative control (300 µL deionized water). Each sample was prepared in at

least three repetitions, and the experiments were conducted twice. After vortexing (vortex IKA Works, Staufen im Breisgau, Germany), 300 μL of 0.1 mM DPPH ethanol solution was added to each sample. Following vortexing, all samples were incubated in the dark at room temperature ($\sim 24\text{ }^\circ\text{C}$) for 30 min. Subsequently, the samples were vortexed again, and the absorbance (A) of the solutions was measured at a wavelength of $\lambda = 517\text{ nm}$ using a BioMateTM 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The ability of all tested solutions to scavenge free radicals was calculated using the following equation:

$$\text{AP (\%)} = [(A_{\text{nc}} - A_{\text{s}}) / A_{\text{nc}}] \times 100\%$$

where A_{nc} represents the absorbance value of the negative control (deionized water), and A_{s} denotes the absorbance value of the samples containing the tested solutions. The results ($n = 10$) are presented as mean values \pm standard deviations (SDs).

To assess the ferrous ions (Fe^{2+}) chelating activity of fruit vinegars and chitosan solutions, the ferrozine-based assay was employed. Briefly, 20 μL of 2 mM FeCl_2 was added to a tested solution (740 μL). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (10 mg/mL in deionized water) was used as a reference ferrous chelator (positive control) and was added in an equivalent amount. A sample without the tested solutions, as well as EDTA, served as a negative control. The incubation of samples (10 min) was conducted at room temperature ($\sim 24\text{ }^\circ\text{C}$). Each sample was prepared in at least three repetitions, and the experiments were conducted twice. After vortexing (vortex IKA Works, Staufen im Breisgau, Germany), 40 μL of 5 mM ferrozine in ethyl alcohol was added. Following vortexing, all samples were incubated at room temperature ($\sim 24\text{ }^\circ\text{C}$) for 10 min. Subsequently, the samples were vortexed again, and the absorbance (A) was measured at a wavelength of $\lambda = 562\text{ nm}$ using a BioMateTM 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The ferrous ions' chelating activity from all tested solutions was calculated using the following formula:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ chelating activity (\%)} = [1 - (A_{\text{s}} / A_{\text{nc}})] \times 100\%$$

where A_{s} represents the absorbance value of the samples containing the tested solutions, and A_{nc} is the absorbance value of the negative control. The results ($n = 10$) are presented as mean values \pm standard deviations (SDs). All reagents used in this analysis were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

2.4. Antimicrobial Properties

The antimicrobial effect of fruit vinegars, chitosan solutions, and chitosan films was determined using the agar diffusion method against the following bacteria strains: *Bacillus subtilis* (food isolate), *Enterococcus faecalis* (food isolate), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Listeria innocua* (ATCC 19119), *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactiplantibacillus plantarum* 299 v (isolate from Sanprobi IBS, Poland), *Salmonella* Enteritidis (clinical isolate), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15443), and the fungal strain *Candida albicans* (stool isolate). All indicator strains were stored in a Cryobank (Bacteria storage system, MAST Diagnostica, Reinfeld, Germany) at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Prior to the tests, the strains were defrosted and passed twice through nutrient broth (OXOID CM 0001, Basingstoke, UK) with the addition of 2% (w/v) glucose. Incubations were carried out at $35 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. Muller–Hinton agar medium (OXOID CM 0337, Basingstoke, UK) was used to determine antimicrobial activity.

2.4.1. Antimicrobial Activity of Fruit Vinegars and Chitosan Solutions

In the case of examining the activity of fruit vinegars and chitosan solutions on plates inoculated with standardized bacterial and yeast suspensions (10^6 CFU/mL), wells with a diameter of 10 mm were punched. Test samples of 100 μ L in volume were introduced into the wells. Plates with applied samples were then incubated at a temperature of $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h. After incubation, the antimicrobial activity was assessed by measuring the zones of inhibition around the wells using the Computer Scanning System (MultiScanBase v14.02).

2.4.2. Antimicrobial Activity of Chitosan Films

Samples of the tested films, measuring 10 mm \times 10 mm, were applied to the surfaces of plates inoculated with bacterial and yeast suspensions containing 10^6 CFU/mL. The plates with the applied samples were then incubated at a temperature of $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h. After incubation, their antimicrobial activity was assessed by measuring the zones of inhibition around the applied samples. The zones of inhibition were measured using the Computer Scanning System (MultiScanBase v14.02).

2.5. Mechanical Properties of Chitosan Films

The strength properties of chitosan films were tested using a testing machine (Model 5965, Intron, Boston, MA, USA) following ASTM D882-12 [16] at a 100 mm/min testing speed. The average of the measurements from the ten samples is given for mechanical properties, including tensile strength (TS) and elongation at break (EB).

2.6. Infrared Spectroscopy

The spectra of the films were obtained using a Nicolet iS5 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), recording 32 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} in the range of $4000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$.

2.7. SEM Analysis

The structure of the prepared chitosan films was assessed using an Evo 40 scanning electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating in beam mode at 20 kV with a secondary electron detector.

2.8. Statistical Analysis

For statistical analyses, Tukey's honest significant difference (HSD) test at $\alpha = 0.05$ was performed using the TIBCO Software Inc. Statistica version 13.3 (Palo Alto, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Characteristics of Fruit Vinegars and Chitosan Solutions

3.1.1. pH and Organic Acid Content in the Fruit Vinegars

Chitosan is a polymer easily soluble in acidic solutions below pH 6.0 [17]. The pH and the type of solvent used affect chitosan-based solutions' bioactive properties [18] and the properties of chitosan-based films [19]. The vinegars used in the research were characterized by the following pH values: 3.6 for apple vinegar, 3.5 for blackcurrant vinegar, and 3.6 for cherry vinegar. In turn, the pH value of 3% acetic acid was 5.5, which indicates that the vinegars tested were more acidic. As shown in the literature, the pH for apple vinegar ranged from a value of 3.1 to 4.7, depending on the apple variety used in the fermentation process as well as the production method [20,21]. For cherry vinegar, the pH value oscillates between 2.7 and 3.2 [22]; these differences may also be due to the raw material used and the method of production. The obtained results, as well as data from the

literature, indicate that the pH values of vinegars exceed those of 3% acetic acid, which are the most commonly used chitosan solvents in the production of chitosan films.

Fruit vinegars were characterized by a different acid content [20,21]; therefore, the concentration of acetic and lactic acid was determined in the tested vinegars, and the results are presented in Figure 1.

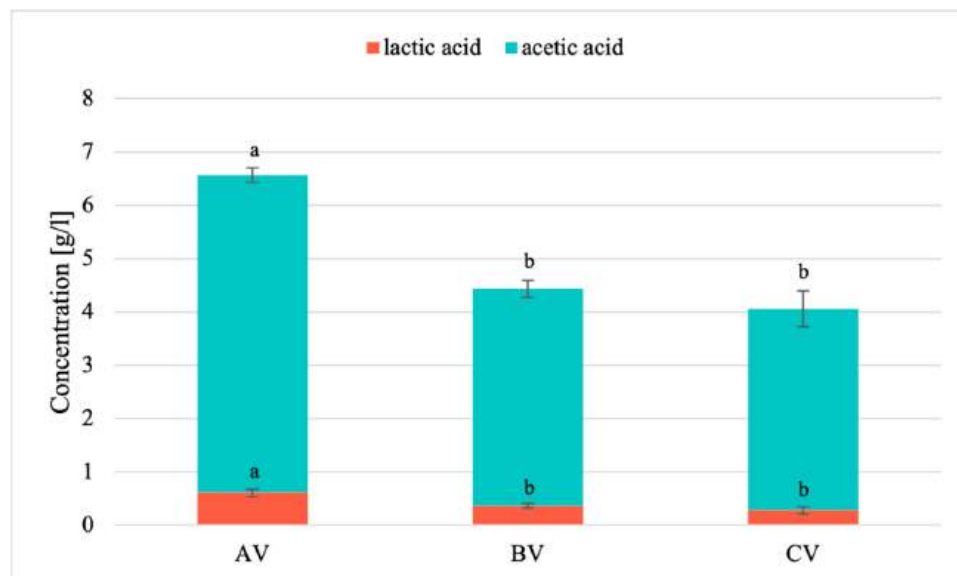


Figure 1. The concentration of acetic and lactic acid in vinegars: AV (apple vinegar), BV (blackcurrant vinegar), and CV (cherry vinegar). Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

In all the surveyed fruit vinegars, acetic acid was dominant, and the highest content, 5.96 g/L, was determined in apple vinegar, which was statistically confirmed. However, the concentration of acetic acid determined in apple vinegar was lower than in the apple vinegars presented by Adımcılar et al. [6] and Yildiz [23]. In turn, the lactic acid content varied from 0.61 g/L (AV) to 0.28 g/L (CV). The content of lactic acid in apple vinegar determined in this study was lower than that in the study by Adımcılar et al. [6] (5.8–7.9 g/L) and higher than in the work of Yildiz [23] (0.04 g/L).

As indicated in data from the literature, the predominant acid among the acids (succinic, malic, citric, tartaric, lactic, and acetic acids) determined in fruit vinegars (apple, grape, pomegranate, and hawthorn vinegars) was acetic acid [6]. This was also confirmed in a study conducted by Yildiz [23], where of the 21 acids determined in fruit vinegars (apple, grape, rosehip, pomegranate, fig, guelder-rose, blackberry, raspberry, and blueberry), acetic acid was the dominant acid, and its content varied from 30.0 g/L in grape vinegar to 60.5 g/L in raspberry vinegar. In tests conducted on seven different vinegars from kiwi fruit apple or persimmon, among others, the most abundant organic acids were acetic acid and lactic acid, which together accounted for more than 70% of all determined acids [24]. The concentration of lactic acid and other acids present in fruit vinegars in smaller amounts, such as citric acid and malic acid, varies depending on the fermentation process [7].

One of the factors affecting the biological activity of chitosan solutions and chitosan-based films is the presence of acids such as acetic or lactic acid, among others. It is known that the type of acid used to prepare film-forming solutions is important for the properties of the obtained chitosan films [19].

3.1.2. Total Phenolic and Flavonoid Content in Fruit Vinegars

Phenolic compounds are the source of bioactive substances present in fruit vinegars, and their presence affects the antioxidant and antimicrobial properties of vinegars, among other factors. Therefore, the TPC and TFC in fruit vinegars were tested, and the results are presented in Table 2.

Table 2. Total phenolic compounds and flavonoid content.

Symbol	TPC ($\mu\text{g GAeq/mL}$)	TFC ($\mu\text{g Qeq/mL}$)
AV	360 ^a \pm 28	6.31 ^c \pm 0.14
BV	260 ^b \pm 18	11.03 ^b \pm 0.11
CV	210 ^c \pm 13	14.38 ^a \pm 0.08

Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

The tested fruit vinegars differed in total phenols and flavonoid content, depending on the type, which was confirmed by statistical analysis. The obtained results showed that the highest total phenolic compound content was found in apple vinegar, which was 360 $\mu\text{g GAeq/mL}$, followed by blackcurrant vinegar (260 $\mu\text{g GAeq/mL}$) and cherry vinegar (210 $\mu\text{g GAeq/mL}$), which was statistically confirmed. The data from the literature showed that TPC varied depending on the type of vinegar, with cereal vinegars exhibiting higher contents than fruit vinegar [24]. The TPC of apple vinegar determined by Ren et al. [24] was 274.08 μg of gallic acid equivalent to vinegar per mL. In terms of the total flavonoid content, cherry vinegar (14.38 $\mu\text{g Qeq/mL}$) showed the highest content, followed by blackcurrant vinegar (11.03 $\mu\text{g Qeq/mL}$) and apple vinegar (6.31 $\mu\text{g Qeq/mL}$). In the case of total flavonoid content, the value obtained for apple cider vinegar was lower than the values obtained by Sidi et al. [25], who examined the flavonoid content of apple cider vinegars made from different varieties and indicated that the raw material and the production method are important factors affecting the flavonoid content of the sample.

According to the literature, the content of phenolic and flavonoid compounds may be influenced by various factors, such as the course of alcoholic or vinegar fermentation, the fermentation method and its length, as well as the type and variety of the raw material used [25]. The study showed that the total content of flavonoids and polyphenols changes over time; it was found that for the blackberry vinegar in the study for a period of 60 days, the content of flavonoids and polyphenols increased until the 15th day, and then rapidly decreased [26]. These changes were related to the depolymerization of macromolecular polyphenol or the conversion of individual polyphenol compounds by strains of lactic acid bacteria taking place during the fermentation process [26].

3.1.3. Antioxidant Properties

The antioxidant properties of vinegar and chitosan solutions were assessed based on their DPPH free radical scavenging activity and ferrous ion-chelating ability.

The antiradical activity outcomes obtained for natural solvents and chitosan-based solutions are presented in Figure 2. The antioxidant activity values depend on the fruits from which the vinegar was produced, which was confirmed by statistical analysis. The highest antiradical activity (93.54%) was demonstrated by cherry vinegar. This is an expected result due to the high total flavonoid content of cherry vinegar. The value obtained for samples using cherry vinegar (both the solvent itself and the solution with chitosan) was not statistically different from the commonly used standard antioxidant of Trolox. The studies on antioxidant activity revealed that chitosan film-forming solutions (AV + Ch and BV + Ch) exhibited increased antiradical activity compared to the vinegar solvents alone, which was confirmed by statistical analysis. In terms of antiradical activity, chitosan solutions produced with cherry vinegar as the solvent also demonstrated the highest

efficacy (93.97%). Moreover, when compared with data from the literature, all samples showed greater antiradical activity than the film-forming chitosan solution prepared with the traditionally used solvent—acetic acid—for which antiradical activity was not noted [15]. The lower antiradical activity of chitosan solutions prepared using acetic acid compared to those using fruit vinegars was also demonstrated by Adimiclar et al. [6].

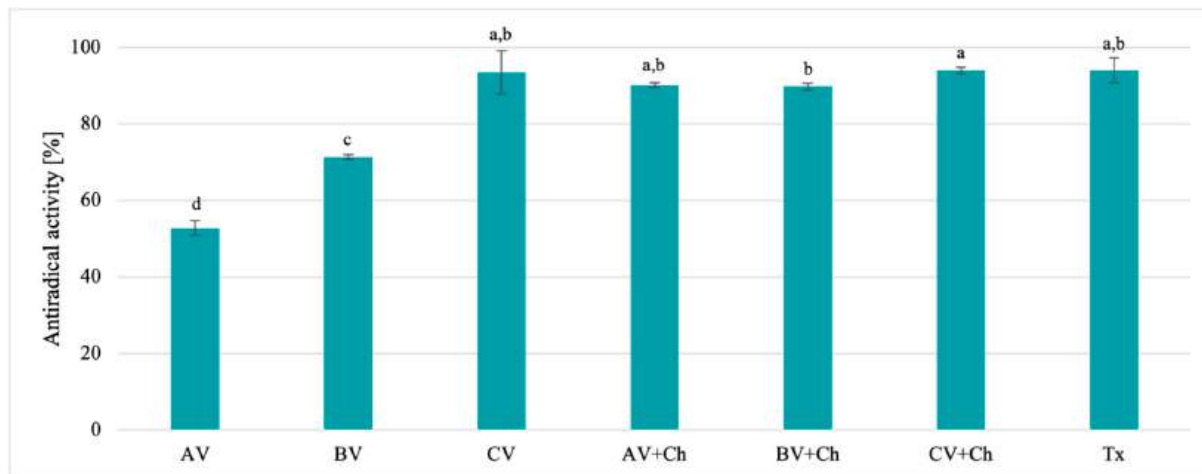


Figure 2. Antiradical activity of vinegar solvents of AV (apple vinegar), BV (blackcurrant vinegar), and CV (cherry vinegar), and chitosan-based solutions AV + Ch (chitosan, apple vinegar), BV + Ch (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + Ch (chitosan, cherry vinegar). Tx—Trolox, standard antioxidant. Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

The results of the examination of ferrous ions' chelating activity obtained for natural solvents and chitosan-based solutions are presented in Figure 3.

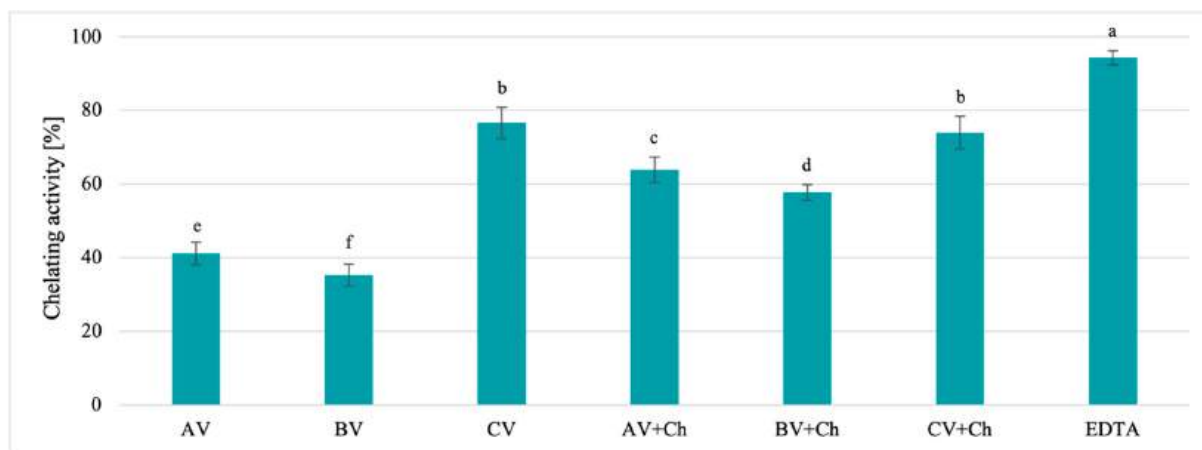


Figure 3. The chelating activity of vinegar solvents of AV (apple vinegar), BV (blackcurrant vinegar), and CV (cherry vinegar), and chitosan-based solutions AV + Ch (chitosan, apple vinegar), BV + Ch (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + Ch (chitosan, cherry vinegar). EDTA—standard chelator. Different letters indicate samples that the results were significantly different ($p < 0.05$).

Based on the obtained results, it can be observed that natural solvents exhibit ferrous ion-chelating activity, though this is lower than EDTA, which was confirmed by statistical analysis. The highest chelating activity was noted for a standard, which was EDTA, followed by the CV (76.64%) and CV + Ch solution (74.00%), and was statistically confirmed. The investigation of chelating activity showed that the presence of chitosan in the solution enhanced the activity of film-forming solutions based on apple vinegar from 41.13 to 63.90% and blackcurrant vinegar from 35.26 to 57.73%; no increase in activity was observed in the

case of samples using cherry vinegar. Based on the obtained results, it can be observed that natural solvents exhibit antioxidant properties, which have also been confirmed in numerous studies [11,27–29]. Overall, it can be stated that the addition of chitosan to these solutions enhances their antioxidant properties.

The oxidation process is the main cause of food spoilage and nutrient degradation during storage. The components of packaging materials with antioxidant properties can extend shelf life and maintain food quality without the direct addition of synthetic antioxidants to food [30]. The antiradical and chelating activity of vinegar solvents, confirmed in this study, indicate their suitability for food packing materials, as they improve food safety and extend their usability for consumption over time.

3.1.4. Antimicrobial Properties

Vinegar is a natural product containing many phenolic substances and organic acids, which makes it an excellent antimicrobial compound, and, as data from the literature have shown, the use of fruit vinegars as a solvent for chitosan can lead to increased antimicrobial activity [6,31].

To assess the potential use of natural vinegars as solvents for the production of chitosan-based solutions and, subsequently, for the production of films, the antimicrobial properties of the solvents and chitosan-based solutions were evaluated. The results are presented in Table 3. In addition, the statistical analysis of the results is presented in Table S1 (Supplementary Material).

Table 3. Antimicrobial properties of vinegar of AV (apple vinegar), BV (blackcurrant vinegar), and CV (cherry vinegar), and chitosan-based solutions AV + Ch (chitosan, apple vinegar), BV + Ch (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + Ch (chitosan, cherry vinegar).

Sample	Indicator Strain									
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>C. albicans</i>
AV	20	22	14	15	24	>28	>28	0	0	13
BV	18	23	15	18	24	>28	28	0	0	11
CV	18	18	15	16	20	>28	18	0	0	11
AV + Ch	14	0	16	18	14	>28	23	0	0	11
BV + Ch	14	0	16	16	14	>28	18	0	0	12
CV + Ch	14	0	16	16	14	>28	22	0	0	12

Diameter of the resulting zones of translucence: 5–10 mm—weak activity; 11–14 mm—moderate activity; and >14 mm—strong activity.

The research showed that all vinegar solvents exhibited antimicrobial activity against all tested strains of pathogenic microorganisms. The tested vinegars had a stronger effect on Gram-negative bacteria than on Gram-positive bacteria. The highest activity was observed against *P. aeruginosa*, with inhibition zones exceeding 28 mm for all tested vinegars. Another strain against which high antimicrobial activity was recorded was *S. Enteritidis*, with the highest activity noted for apple vinegar, exceeding a 28 mm inhibition zone, followed by blackcurrant vinegar with a 28 mm inhibition zone, and cherry vinegar with an 18 mm inhibition zone. They also showed very high activity against *E. coli*, resulting in the appearance of inhibition zones with diameters ranging from 20 to 24 mm. Data from the literature also indicated the effectiveness of inhibiting the growth of pathogenic strains

by apple vinegar, such as *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus*, or *E. coli* [11]. Also, research conducted by Ousaaid et al. [13] indicated the effective antimicrobial activity of apple vinegars extracted from different apple varieties against the following strains: *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *C. albicans*, and *Candida tropicalis*. Against *C. albicans* yeast, the vinegars tested in this study showed moderate activity. Moreover, this activity was lower than most of the other bacteria strains.

As the obtained data show, in the case of the *P. aeruginosa* strain, all chitosan-based solutions produced using fruit vinegars retained their activity, and an inhibition zone exceeding 28 mm was noted. In the case of the *L. monocytogenes* strain, the inhibition zone increased to 16 mm for all chitosan-based solution samples compared to the results obtained for fruit vinegars alone. An increase in the activity of chitosan-based solutions was also observed compared to vinegars against the *C. albicans* strain for the BV + Ch and CV + Ch samples, as well as for the CV + Ch sample against the *S. Enteritidis* strain. As the data obtained showed, the presence of chitosan increased the activity against the selected strains.

Both fruit vinegars and the chitosan solutions made from them showed no antimicrobial activity against probiotic bacterial strains, which is favorable. This is in agreement with the expected results, as data from the literature indicate that fruit vinegars are a rich source of probiotic bacteria such as *L. plantarum* [32].

3.2. Characteristics of Film Samples

3.2.1. Antimicrobial Properties

To assess the suitability of chitosan films produced using natural acetic solvents as potential materials for various applications, including the packaging industry, it is crucial to determine their antimicrobial activity. The results of the studies conducted are presented in Table 4. In addition, the statistical analysis of the results is presented in Table S2 (Supplementary Material).

Table 4. Antimicrobial properties of films AV + ChF (chitosan, apple vinegar), BV + ChF (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + ChF (chitosan, cherry vinegar).

Sample	Indicator Strain									
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>
	Inhibition zone [mm]									
AV + ChF	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0
BV + ChF	0	0	0	0	11.5	19	11	0	0	0
CV + ChF	20	0	19	20	24	28	11	0	0	0

Diameter of the resulting zones of translucence: 5–10 mm—weak activity; 11–14 mm—moderate activity; and >14 mm—strong activity.

The research demonstrated that, like the solutions (Table 3), the produced films exhibited the highest antimicrobial activity against the *P. aeruginosa* strain. The largest inhibition zone of 28 mm was recorded for the CV + ChF sample. As observed, film samples produced using cherry vinegar showed the broadest spectrum of activity against the tested pathogenic strains. None of the films tested showed activity against *E. faecalis* and *C. albicans*, despite the fact that the fruit vinegars alone had such activity. Films obtained using commonly used solvents like acetic acid did not exhibit antimicrobial activity or

exhibited very poor activity; therefore, it is necessary to use additives to ensure activity [2,33], unlike films made with natural solvents such as kombucha or vinegars [3,6]. In a study conducted by Adımcılar et al. [6], antimicrobial activity was expressed as a logarithmic reduction in the number of live microorganisms; the study showed that against the *S. aureus* strain, acetic acid-based films yielded a result of about two log reductions, while for films made with pomegranate vinegar, the value increased to about three log reductions, and a similar increase in activity was observed against the *E. coli* strain. For strains such as *P. aeruginosa*, *S. Enterica*, or *E. coli*, other studies have shown that chitosan-based films made with acetic acid present no antimicrobial activity [15], while films made with bioactive solvents such as kombucha show zones of inhibition against *P. aeruginosa* in the range of 15–22 mm depending on the origin of the kombucha, which is 14–16 mm for the *S. Enterica* strain and 17 mm for the *E. coli* strain in the case of kombucha made from black tea [3]. Data from the literature confirmed the efficacy of organic acids as antimicrobial agents and indicated that individual acids differed in their antimicrobial activity against different strains. It also showed that the antimicrobial activity of films prepared with vinegar was greater than that of those with acetic acid alone. This was most likely due to the presence of organic acids as well as other bioactive compounds in their composition [34].

It is worth noting that none of the tested samples showed antimicrobial activity against the probiotic bacteria strains *L. rhamnosus* and *L. plantarum*, and similar results were noted for chitosan films where kombucha was the solvent [3]. This is a favorable result, indicating the potential use of the films for encapsulating probiotics or packaging functional food.

3.2.2. Mechanical Properties

The outcomes of the mechanical tests conducted on the prepared films, evaluated in terms of tensile strength and elongation at break, are presented in Table 5.

Table 5. Tensile strength (TS) and elongation at break (EB) for the prepared films.

Symbol	TS (MPa)	EB (%)
AV + ChF	3.97 ^b ± 0.18	48.48 ^c ± 1.06
BV + ChF	3.82 ^b ± 0.33	70.58 ^a ± 1.19
CV + ChF	4.93 ^a ± 0.63	51.07 ^b ± 0.54

Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$).

In the case of tensile strength, values ranging from 3.97 MPa for AV + ChF to 4.93 MPa for CV + ChF were noted. The tensile strength of the chitosan film obtained by dissolving chitosan in 3% acetic acid was 38.80 MPa [15]. The obtained results showed that the use of natural solvents in film preparation led to a decrease in tensile strength for all films in comparison to films prepared with acetic acid as the solvent. The elevated tensile strength signified a high degree of ductility in films, making them easily deformable, which is a crucial characteristic of food films.

As statistical analysis indicated, the elongation at the break of chitosan films varied depending on the type of vinegar used. The chitosan films where fruit vinegars were used as the solvent were characterized by higher values of elongation at break from 48.48 to 70.58% depending on the type of vinegar used compared to chitosan film with acetic acid for which the obtained elongation at break value was 35.5% [15].

The increase in the elongation at break values observed for chitosan films obtained with fruit vinegars compared to the film with acetic acid can be attributed to the interaction of the chitosan chain with high-molecular-weight phenols present in vinegars. In addition to phenols, organic acids present in vinegars can also contribute to improving the elasticity of the film. Chitosan films based on malic, lactic, or citric acid exhibited greater elasticity

than chitosan films with acetic acid [35]. The reaction between the solvent and chitosan, resulting from electrostatic interactions, hydrogen bonding, or hydrophobic interactions, influenced the structure and properties of chitosan films [36]. Numerous studies emphasized the substantial impact of acids on chitosan through electrostatic interactions [19], reaffirming that many applications of chitosan are based on its cationic nature. The volume of acids as counter ions was expected to influence the ionic interactions between amino and carboxyl groups, thus affecting the properties of chitosan. Additionally, hydrophobic interactions between chitosan and carboxylic acids could occur, influencing the sorption of carboxylic acids on chitosan [37]. This was confirmed by the conducted test results, which demonstrated the presence of acetic and lactic acids in the tested vinegars (Figure 1).

3.2.3. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

The chitosan-based film structures were analyzed using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Figure 4 displays the spectra of all the examined chitosan-based films.

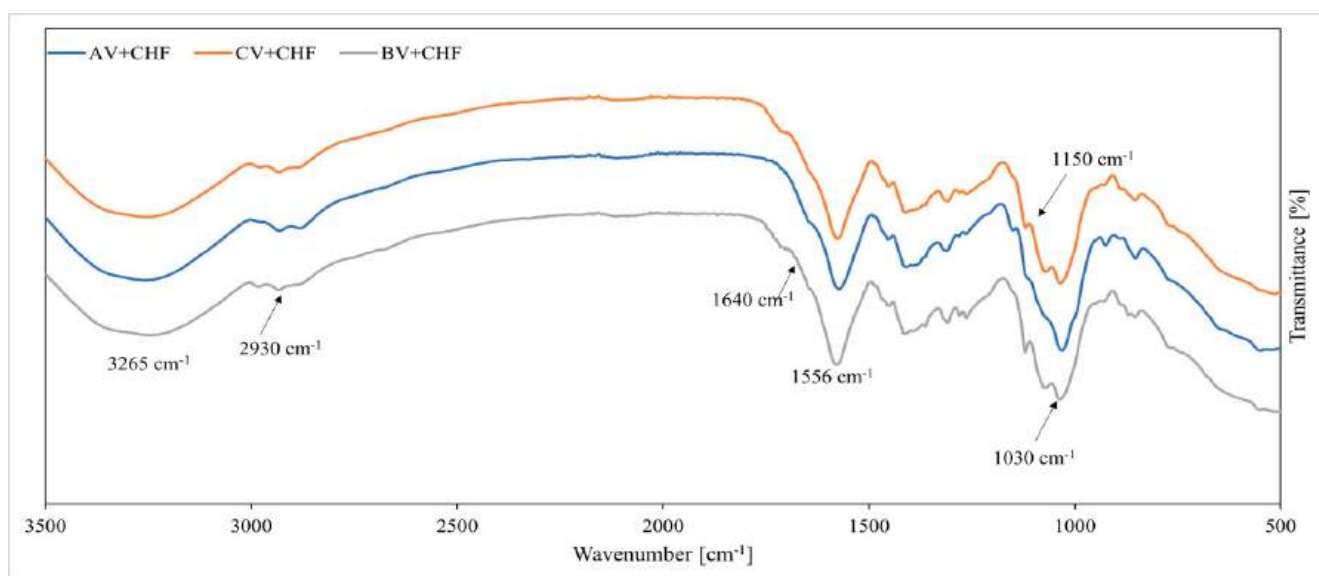


Figure 4. FTIR spectra of the prepared chitosan-based films: AV + Ch (chitosan, apple vinegar), BV + Ch (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + Ch (chitosan, cherry vinegar).

The prepared materials exhibited the characteristic peaks of chitosan within their structures. The bands observed at 3265 cm^{-1} correspond to N-H stretching vibrations overlapping with O-H stretching, and the absorption band at 2930 cm^{-1} can be attributed to C-H asymmetric stretching vibrations [6,38]. The bands at 1640 and 1556 cm^{-1} can be assigned to amide I (C=O stretching), amide II (N-H bending), and amide III (C-N stretching), respectively [6,39,40]. The bands at 1150 and 1030 cm^{-1} can be associated with the symmetric stretching of the C-O-C bond and C-O stretching vibrations, respectively [38,40]. The obtained data are consistent with data from the literature, which showed that the use of fruit vinegars does not indicate the presence of significant changes in FTIR spectra [6].

3.2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

In this study, scanning electron microscopy (SEM) was employed to observe the surface morphology of the tested samples, and the results in form of micrographs are presented in Figure 5.

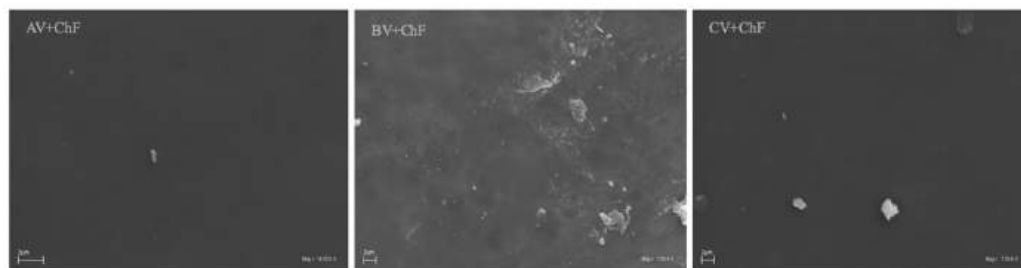


Figure 5. SEM micrographs for prepared films: AV + ChF (chitosan, apple vinegar), BV + ChF (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + ChF (chitosan, cherry vinegar). The scale bar is 2 μ m.

The SEM analysis of the structure and morphology of the resulting films revealed smooth surfaces in all the chitosan films. This observation indicated well-dispersed chitosan in the natural vinegars used, which is a highly desirable quality for the formation of films intended for various applications.

4. Conclusions

In this study, three types of fruit vinegars were used both as chitosan solvents and as a source of biologically active compounds for the production of chitosan-based films. Fruit vinegars showed antioxidant and antimicrobial activity, which is associated with the presence of organic acids and phenolic compounds. Both fruit vinegars and film-forming chitosan solutions demonstrated antimicrobial properties against the tested microbial strains. The antimicrobial effectiveness was maintained in chitosan-based films produced with cherry vinegar, which exhibited the broadest spectrum of bacterial activity. None of the tested samples showed antimicrobial activity against the probiotic bacteria strains *L. rhamnosus* and *L. plantarum*, which is a favorable result. The tests also revealed that the vinegar type influenced the mechanical properties of the films, such as elongation at break. SEM studies showed that the obtained films have a smooth surface, which indicates the good dispersion of chitosan in the natural vinegar solvent. The research results obtained showed that depending on the solvent used, films with different mechanical properties and different biological activity can be obtained, which allows for the appropriate selection of the solvent for a given application and may be an important aspect, among others, in the selection of the best packaging for a given type of food. Thus, natural fruit vinegars offer a promising environmentally friendly alternative to conventional solvents for the production of chitosan-based films with improved functional properties.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym17010011/s1>. Table S1: Antimicrobial properties of vinegar: AV (apple vinegar), BV (blackcurrant vinegar), CV (cherry vinegar), and chitosan-based solutions AV + Ch (chitosan, apple vinegar), BV + Ch (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + Ch (chitosan, cherry vinegar); Table S2: Antimicrobial properties of films AV + ChF (chitosan, apple vinegar), BV + ChF (chitosan, blackcurrant vinegar), and CV + ChF (chitosan, cherry vinegar).

Author Contributions: Conceptualization, K.S.; methodology, K.S., M.W., R.D., A.S., L.M., A.W. and I.R.; formal analysis, K.S. and M.W.; investigation, K.S., M.W., R.D., A.S., L.M. and A.W.; data curation, K.S.; writing—original draft preparation, K.S.; writing—review and editing, M.W.; visualization, K.S.; supervision, R.D. and I.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

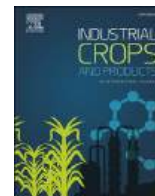
Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Srinivasa, P.; Baskaran, R.; Ramesh, M.; Harish Prashanth, K.; Tharanathan, R. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 504–508. [CrossRef]
2. Kahya, N.; Kestir, S.M.; Öztürk, S.; Yolaç, A.; Torlak, E.; Kalaycıoğlu, Z.; Akin-Evingür, G.; Erim, F.B. Antioxidant and antimicrobial chitosan films enriched with aqueous sage and rosemary extracts as food coating materials: Characterization of the films and detection of rosmarinic acid release. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *217*, 470–480. [CrossRef] [PubMed]
3. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. A new approach to obtain chitosan films—Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *197*, 116634. [CrossRef]
4. Zhang, X.; Ismail, B.B.; Cheng, H.; Jin, T.Z.; Qian, M.; Arabi, S.A.; Liu, D.; Guo, M. Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation—A review of advances and applications. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *273*, 118616. [CrossRef] [PubMed]
5. Bajić, M.; Ročnik, T.; Oberlintner, A.; Scognamiglio, F.; Novak, U.; Likozar, B. Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, *21*, 100365. [CrossRef]
6. Adımcılar, V.; Kalaycıoğlu, Z.; Akin-Evingür, G.; Torlak, E.; Erim, F.B. Comparative physical, antioxidant, and antimicrobial properties of films prepared by dissolving chitosan in bioactive vinegar varieties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *242*, 124735. [CrossRef]
7. Luzón-Quintana, L.M.; Castro, R.; Durán-Guerrero, E. Biotechnological processes in fruit vinegar production. *Foods* **2021**, *10*, 945. [CrossRef] [PubMed]
8. Chen, H.; Chen, T.; Giudici, P.; Chen, F. Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 1124–1138. [CrossRef]
9. Perumpuli, B.; Dilrukshi, N. Vinegar: A functional ingredient for human health. *Int. Food Res. J.* **2022**, *29*, 959–974. [CrossRef]
10. Wan, Y.; Li, J.; Liu, Q. Vinegar production and cancer risk. *Europ. J. Cancer Prev.* **2019**, *28*, 382. [CrossRef]
11. Bakir, S.; Devecioglu, D.; Kayacan, S.; Toydemir, G.; Karbancioglu-Guler, F.; Capanoglu, E. Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. *Europ. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 2083–2094. [CrossRef]
12. Sengun, I.Y.; Kilic, G.; Ozturk, B. Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials. *Food Sci. Biotechnol.* **2020**, *29*, 401–408. [CrossRef]
13. Ousaaaid, D.; Laaroussi, H.; Bakour, M.; Ennaji, H.; Lyoussi, B.; El Arabi, I. Antifungal and antibacterial activities of apple vinegar of different cultivars. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 6087671. [CrossRef] [PubMed]
14. Zinn, M.K.; Bockmühl, D. Did granny know best? Evaluating the antibacterial, antifungal and antiviral efficacy of acetic acid for home care procedures. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 265. [CrossRef]
15. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Chitosan films with caffeine and propolis as promising and ecofriendly packaging materials. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 12351. [CrossRef]
16. D882 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Available online: <https://www.astm.org/d0882-12.html> (accessed on 7 October 2024).
17. Pillai, C.K.S.; Paul, W.; Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 641–678. [CrossRef]
18. Ardean, C.; Davidescu, C.M.; Nemeş, N.S.; Negrea, A.; Ciopec, M.; Duteanu, N.; Negrea, P.; Duda-seiman, D.; Musta, V. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7449. [CrossRef] [PubMed]
19. Qiao, C.; Ma, X.; Wang, X.; Liu, L. Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. *LWT* **2021**, *135*, 109984. [CrossRef]
20. Kara, M.; Assouguem, A.; Kamaly, O.M.A.; Benmessaoud, S.; Imtara, H.; Mechchate, H.; Hano, C.; Zerhouni, A.R.; Bahhou, J. The impact of apple variety and the production methods on the antibacterial activity of vinegar samples. *Molecules* **2021**, *26*, 5437. [CrossRef]
21. Hasan, A.N.; Antony, U.; Bala, G.V.; Prabha, D.T.; Kavya, C.; Malik, A.F. Study on production vinegar from apple. *Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *761*, 012125. [CrossRef]
22. Özen, M.; Özdemir, N.; Ertekin Filiz, B.; Budak, N.H.; Kök-Taş, T. Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) Vinegars produced from fresh fruit or juice concentrate: Bioactive compounds, volatile aroma compounds and antioxidant capacities. *Food Chem.* **2020**, *309*, 125664. [CrossRef]

23. Yildiz, E. Characterization of fruit vinegars via bioactive and organic acid profile using chemometrics. *Foods* **2023**, *12*, 3769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ren, M.; Wang, X.; Tian, C.; Li, X.; Zhang, B.; Song, X.; Zhang, J. Characterization of organic acids and phenolic compounds of cereal vinegars and fruit vinegars in China. *J. Food Process. Preserv.* **2017**, *41*, e12937. [[CrossRef](#)]
25. Sidi, M.K.; Ben, M.; Assouguem, A.; Sidi, R.Z.; Sidi, J.B.; Kara, M.; Zerhouni, A.R.; Bahhou, J. Phytochemical content and antioxidant activity of vinegar prepared from four apple varieties by different methods. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* **2021**, *5*, 1578–1585. [[CrossRef](#)]
26. Gao, Q.; Song, Y.; Liang, Y.; Li, Y.; Chang, Y.; Ma, R.; Cao, X.; Wang, S. Dynamics of physicochemical properties, functional compounds and antioxidant capacity during spontaneous fermentation of *Lycium ruthenicum murr.* (qinghai–tibet plateau) natural vinegar. *Foods* **2022**, *11*, 1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Boonsupa, W. Chemical Properties, antioxidant activities and sensory evaluation of berry vinegar. *WJST* **2018**, *16*, 887–896. [[CrossRef](#)]
28. Kara, M.; Assouguem, A.; El Fadili, M.; Benmessaoud, S.; Alshawwa, S.Z.; Al Kamaly, O.; Saghrouchni, H.; Zerhouni, A.R.; Bahhou, J. Contribution to the evaluation of physicochemical properties, total phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activity of vinegar commercialized in Morocco. *Molecules* **2022**, *27*, 770. [[CrossRef](#)]
29. Liu, Q.; Tang, G.Y.; Zhao, C.N.; Gan, R.Y.; Li, H. Bin. Antioxidant activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars. *Antioxidants* **2019**, *8*, 78. [[CrossRef](#)]
30. Kumar, H.; Deshmukh, R.K.; Gaikwad, K.K.; Negi, Y.S. Physicochemical characterization of antioxidant film based on ternary blend of chitosan and tulsi-ajwain essential oil for preserving walnut. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *278*, 134880. [[CrossRef](#)]
31. Xia, T.; Zhang, B.; Duan, W.; Zhang, J.; Wang, M. Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food. *J. Funct. Foods* **2020**, *64*, 103681. [[CrossRef](#)]
32. Sengun, I.Y.; Kilic, G.; Charoenyingcharoen, P.; Yukphan, P.; Yamada, Y. Investigation of the microbiota associated with traditionally produced fruit vinegars with focus on acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. *Food Biosci.* **2022**, *47*, 101636. [[CrossRef](#)]
33. Di Filippo, M.F.; Panzavolta, S.; Albertini, B.; Bonvicini, F.; Gentilomi, G.A.; Orlacchio, R.; Passerini, N.; Bigi, A.; Dolci, L.S. functional properties of chitosan films modified by snail mucus extract. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 126–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Punia Bangar, S.; Suri, S.; Trif, M.; Ozogul, F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci.* **2022**, *46*, 101615. [[CrossRef](#)]
35. Park, S.Y.; Marsh, K.S.; Rhim, J.W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 194–197. [[CrossRef](#)]
36. Lakehal, I.; Montembault, A.; David, L.; Perrier, A.; Vibert, R.; Duclaux, L.; Reinert, L. Prilling and characterization of hydrogels and derived porous spheres from chitosan solutions with various organic acids. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 68–77. [[CrossRef](#)]
37. Shamov, M.V.; Bratskaya, S.Y.; Avramenko, V.A. Interaction of carboxylic acids with chitosan: Effect of pk and hydrocarbon chain length. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *249*, 316–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Costa, S.M.; Ferreira, D.P.; Teixeira, P.; Ballesteros, L.F.; Teixeira, J.A.; Fangueiro, R. Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *177*, 241–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Annu; Ali, A.; Ahmed, S. Eco-friendly natural extract loaded antioxidative chitosan/polyvinyl alcohol based active films for food packaging. *Heliyon* **2021**, *7*, e06550. [[CrossRef](#)]
40. Koc, B.; Akyuz, L.; Cakmak, Y.S.; Sargin, I.; Salaberria, A.M.; Labidi, J.; Ilk, S.; Cekic, F.O.; Akata, I.; Kaya, M. Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Biosci.* **2020**, *35*, 100545. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents

Karolina Stefanowska^{a,*}, Magdalena Woźniak^a, Jerzy Majka^b, Anna Sip^c,
Lucyna Mrówczyńska^d, Agnieszka Waśkiewicz^a, Wojciech Kozak^e, Renata Dobrucka^e,
Izabela Ratajczak^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60625 Poznań, Poland

^b Department of Wood Science and Thermal Techniques, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 38/42, 60637 Poznań, Poland

^c Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60627 Poznań, Poland

^d Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61614 Poznań, Poland

^e Department of Industrial Products and Packaging Quality, Institute of Quality Science, Poznań University of Economics and Business, Al. Niepodległości 10, 61875 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Chitosan
Edible films
Antioxidant properties
Mechanical properties
Dynamic vapor sorption
GDW model
Kombucha

ABSTRACT

The environmental degradation that is currently taking place makes it important to develop new natural and biodegradable packaging for various branches of industry. Therefore, the aim of the research was to characterize films prepared from chitosan and kombucha solutions obtained from coffee and three types of tea (black, green, and white). Kombucha solutions were used as a natural solvent for the preparation of chitosan films which is a new approach in the production of chitosan films and has not been used so far. Both the kombucha and chitosan-kombucha solutions were characterized by high antioxidant activity in the DPPH test. This could be connected with the presence of phenolic compounds in kombucha solutions, which were determined by ultra-high performance liquid chromatography. In turn, chitosan-kombucha films had different physical, mechanical and biological properties depending on the type of kombucha solutions used. The highest oxygen barrier was determined for the film obtained from chitosan and green tea kombucha solution. The film consisting of chitosan and white tea kombucha solution was characterized by the highest tensile strength. In turn, microbiological studies showed that films based on chitosan and tea kombucha solutions showed higher activity against *Salmonella enterica* than kombucha solutions, while film that consisted of a chitosan and black tea kombucha solution additionally exhibited greater activity against *Escherichia coli*. Moreover, the analysis of sorption showed that kombucha solutions limited the accessibility of primary sorption sites. The results indicated that the type of kombucha used to prepare chitosan-kombucha films affects the properties of the obtained films. In addition, kombucha solutions can be used as a natural chitosan solvent instead of inorganic acids. The results of the study confirmed that chitosan films produced using kombucha as a solvent are better than the chitosan films commonly produced with acetic acid, so they can be a viable alternative material for food packaging.

1. Introduction

Improving living standards, excessive consumption, and easy access to plastics result in a continuous increase in their production. About 6 % of annual oil production is used for these purposes, and this value is estimated to increase by another 14 % by 2050 (Atiwesh et al., 2021; Petrosyan K, 2019). In 2018, the annual consumption of plastics

exceeded 360 million tons (Antonowicz et al., 2021). Nowadays, plastics are a serious threat to natural environment due to their very slow decomposition and improper disposal. Literature data show that more than 10 million tons of plastic are released into the oceans annually, and the weight of the released plastic exceeds the weight of plankton by six times (Atiwesh et al., 2021; Petrosyan K, 2019). This limits the access of light and oxygen to the waters, which may contribute to the degradation

* Corresponding author.

E-mail address: karolina.stanicka@up.poznan.pl (K. Stefanowska).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116634>

Received 3 January 2023; Received in revised form 16 March 2023; Accepted 23 March 2023

Available online 3 April 2023

0926-6690/© 2023 Published by Elsevier B.V.

of coral reefs and reduction of phytoplankton, which is an essential part of the marine animal food chain (Atiweh et al., 2021).

The observed environmental degradation, increased consumer awareness, and resulting legal regulations (Directive 2019/904 of the European Parliament and of the Council) contribute to the search for new, renewable green materials with various applications, including packaging materials. The main purpose of food packaging is to perform a protective function, i.e., protect against the harmful effects of external factors, extend shelf life, and enable transport. An alternative to plastic packaging can be natural polymers. The most commonly used materials for production include starch, agar, gelatin or chitosan (Abreal et al., 2021; Fu et al., 2021; Zhao et al., 2022).

Chitosan is obtained from the alkaline N-deacetylation of chitin. The chitosan available on the market is mainly obtained from the shells of crustaceans, which are waste products of the shellfish processing industry (Kim et al., 2006). Due to its biocompatibility, biodegradability and other properties, chitosan is a good polymer to produce film-forming solutions (Martínez-Camacho et al., 2013; Qiao et al., 2021). Literature data showed that chitosan caused inhibition of various strains of pathogenic microorganisms, as well as those responsible for the rapid spoilage of food (Dobrucka, 2016; Miteluț et al., 2015; Tripathi et al., 2008). Antifungal and antibacterial properties of applied materials are highly desirable in food packaging materials; therefore, chitosan is used as a component of these materials (Amor et al., 2021; Wang et al., 2018). Chitosan is insoluble in water and organic solvents; a good solvent for chitosan are substances with an acid reaction – organic or mineral acids (Kim et al., 2006). Literature reports showed that the following acids are the most common solvents for chitosan: acetic, citric, malic, lactic, formic and propionic (Kim et al., 2006; Chen et al., 2007). The research shows that the solvent used do dissolve chitosan impacts the properties of the films obtained from chitosan (Khouri et al., 2020; Chen et al., 2007). The use of a polyacid (malic and lactic acids) as a solvent may increase the mechanical strength of the obtained chitosan films in comparison with films where the monoacid is the solvent (Khouri et al., 2020; Chen et al., 2007). Films using acetic acid as a solvent behave like typical brittle materials, while films using citric acid as a solvent exhibit the characteristics of rubber-like materials (Qiao et al., 2021).

Literature data show that despite the fact that chitosan solutions show antimicrobial properties against many strains of bacteria, unfortunately, chitosan films do not show such properties. The reason may be the binding of chitosan in films and the impossibility of direct interaction of its chains with microbial cells (Foster and Butt, 2011). Since the films obtained from natural biopolymers are not always characterized by good enough mechanical, barrier, microbiological or optical properties to be used in, among others, the packaging industry, many additives are used to improve these properties. Many works focus on the use of, for example, nanoparticles of silver, titanium or other metals as additives that improve the properties of the obtained films (Heydari Foroushani et al., 2022; Norouzi et al., 2022; Shakeel et al., 2023). The latest data show, however, that synthetic compounds such as nanoparticles are not neutral and may pose a health risk (Yadav et al., 2021). Therefore, more and more attention is paid to natural additives such as e.g. essential oils, plant extracts that are non-toxic, biodegradable and safe for the environment (Ong et al., 2021; Wang et al., 2022).

Kombucha is a traditional non-alcohol or low-alcohol drink obtained in the fermentation process. It uses many varieties of tea and carbon sources and is fermented using a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), which includes acetic acid bacteria (AAB), lactic acid bacteria (LAB), and yeasts (Antolak et al., 2021; Soares et al., 2021; Tanticharakunsiri et al., 2021). Kombucha is a valuable source of bioactive compounds such as phenolic compounds, organic acids, vitamins, enzymes that come from both tea, which undergoes the fermentation process, and from the microorganisms contained in it (Antolak et al., 2021). Literature data show that due to the high content of phenols, kombucha is a very good antioxidant (Vina et al., 2014; Vohra et al.,

2018; Yang et al., 2009). Kombucha also exhibits antimicrobial properties, inhibiting the growth of various microbial strains such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, and *E. coli* (Vohra et al., 2018). According to research by Bhattacharya et al. (2016), the antimicrobial activity of kombucha is related to catechin and isorhamnetin. In addition, antimicrobial property of kombucha solution depends on the time of fermentation, the carbon source, and the tea used for this purpose (Antolak et al., 2021; Vohra et al., 2018).

Due to its characteristics, the SCOBY consortium has so far been used for a variety of purposes. Thanks to a richness of nutrients and high energy value, it is used as a feed additive (Murugesan et al., 2005). Literature data show that SCOBY, due to the presence of metal-binding groups, can biosorb heavy metals such as cadmium, zinc, arsenic or lead from aqueous solutions and wastewater (Mousavi et al., 2018; Rzymowski and Ściban, 2008). Another interesting application is the production of cellulose from kombucha-derived bacteria (KBC). Kombucha-derived cellulose sheets are widely used by designers in the textile industry to produce eco-friendly clothing (Kamiński et al., 2020). Due to a biodegradable nature, as well as antioxidant and antimicrobial properties, attempts are made to use SCOBY kombucha to produce ecological packaging. Research conducted by Sharma et al. (2021) showed that the composite made from KBC and chitosan was more effective than polyethylene or a sheet made from SCOBY in maintaining the freshness of a tomato as a test object within 28 days. In turn, Ashrafi et al. (2018) found that the functional properties (water vapor permeability, antioxidant activity, resistance against ultraviolet) of chitosan films improve when combined with a kombucha solution prepared from tea.

The purpose of this research was to characterize films prepared from chitosan and kombucha solutions obtained from coffee and various types of tea. Literature data show that kombucha was previously used only as an additive to chitosan films in order to improve their properties (Ashrafi et al., 2018). In this work, a new approach to the application of kombucha as a chitosan solvent was presented. In this study, kombucha solutions were used as a natural solvent for the preparation of chitosan films. The concentrations of phenolic compounds, antioxidant activity (radical scavenging capacity of DPPH) and biological activity of various kombucha solutions were determined. In turn, for the chitosan-kombucha films, the mechanical, sorption and barrier properties, as well as their morphology and biological activity were determined.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of kombucha solution

Tea-based kombucha solutions were prepared by dissolving 70 g of sucrose in 1000 ml of distilled water. Next, 4 g of various types of tea (black, green, and white) was added to boiled water. To prepare coffee-based kombucha, 140 g of sucrose was dissolved in 1000 ml of distilled water, and 120 g of ground coffee was added to boiled water. The teas and coffee were brewed and the grounds were removed by filtration after 10 min. After cooling to room temperature, the tea was seeded with a 100 ml fermentation broth from a previous black tea fermentation prepared under the same conditions. Fermentation was carried out at room temperature for 21 days. Sucrose was purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), while tea and coffee samples were purchased from a local store. The samples of cell-free kombucha were investigated. Cells of microorganisms involved in fermentation were removed by centrifugation (5000 g, 10 min). Supernatants were then microfiltered by membrane filtration using filters Millex GV (Millipore, MA, USA).

2.2. Preparation of film-forming solutions and chitosan-kombucha films

Chitosan purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany),

derived from crab shells, was used to prepare the films. Four solutions forming chitosan films were prepared by dissolving 4 g of chitosan in 400 ml of cell-free kombucha solutions made from black, green and white teas and coffee. Additionally, 4 ml of glycerin (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) was added to each solution. The final solutions were mixed using a mechanical stirrer. The chitosan-kombucha solutions for antioxidant activity test were stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. In order to prepare the chitosan-kombucha films, the film-forming solutions were poured into Petri dishes with Teflon inserts and dried at room temperature. As a result of the experiment, four kombucha solutions, four chitosan-kombucha solutions and four chitosan-kombucha films were obtained, as presented in Table 1.

2.3. Antioxidant properties

The antioxidant activity of cell-free kombucha and chitosan-kombucha solutions was determined by their DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) radical scavenging activity. Kombucha or chitosan-kombucha solutions (3 μl) was added to distilled water (297 μl) and vortexed. An ethanol solution of 0.1 mM DPPH (300 μl) was added, and samples were mixed and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Following incubation, BioMate™ 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA) was used to measure the absorbance (A) of solutions at a wavelength of $\lambda = 517\text{ nm}$. Trolox (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as a reference antioxidant. On the basis of the obtained absorbance values, the antiradical activity (AP) of the tested products was calculated using the following Eq. 1:

$$\text{AP}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

where: A_0 – absorbance of the control sample, A_1 – absorbance of the tested samples.

Every sample tube was prepared in triplicate, and each experiment variant was repeated three times. The results ($n = 9$) are presented as the mean value \pm standard deviation (\pm SD).

2.4. Phenolic compounds concentration

The concentration of phenolic compounds, including flavonoids (catechin, epicatechin, rutin, myricetin, pinostrobin, pinobanksin, pinocembrin, apigenin, kaempferol, galangin, naringenin and quercetin), aromatic acids (caffeic, ferulic, vanillic, syringic, sinapic, coumaric, hydroxycinnamic and cinnamic) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in cell-free kombucha solutions was determined using the Aquity UPLC chromatograph (Waters, Manchester, MA, USA) equipped with a photodiode detector (PDA e λ Detector) (Waters, Manchester, MA, USA) and an electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometer (TQD) (Waters, Manchester, MA, USA). The solutions were filtered

Table 1
Symbols of samples.

Symbols	Kombucha solution	Symbols	Chitosan-kombucha solutions	Symbols	Chitosan-kombucha films
W	White tea	CWS	Chitosan – white tea kombucha	CWF	Chitosan – white tea kombucha
G	Green tea	CGS	Chitosan – green tea kombucha	CGF	Chitosan – green tea kombucha
B	Black tea	CBS	Chitosan – black tea kombucha	CBF	Chitosan – black tea kombucha
C	Coffee	CCS	Chitosan – coffee kombucha	CCF	Chitosan – coffee kombucha

through a 0.20 μm syringe filter (Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Germany) before analyses. The analyzed compounds were separated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (150 \times 2.1 mm/ID, with 1.8 μm particle size) (Waters, Manchester, MA, USA). Gradient elution was applied using water containing 0.1 % HCOOH (A) and acetonitrile containing 0.1 % HCOOH (B) with a flow rate of 0.3 ml/min. The solvent gradient was modified as follows: 0–5 min 25 % B, 5–20 min 40 % B, 20–30 min 60 % B, 30–35 min 90 % B, and 35 to – 0 min 100 % B, followed by a return to the initial conditions. All solvents and standards of phenolic compounds were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). All samples were injected in triplicate.

2.5. Sorption experiments

All chitosan-kombucha film samples were stored in a desiccator over phosphorus pentoxide (P_2O_5) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) before use. Equilibrium moisture content (EMC) measurements were carried out using the dynamic vapor sorption apparatus (DVS Advantage 2, Surface Measurement Systems, London, UK) at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Additionally, the sorption experiments started with sample equilibration in dry nitrogen at a flow rate of 150 cm^3/s in order to obtain a dry state. The initial mass of each sample was $8 \pm 0.5\text{ mg}$. The EMC values were established in the adsorption mode for 0, 0.05, 0.20, 0.35, 0.50, 0.65 and 0.80 of relative humidity (RH). It was assumed that a sample reached equilibrium at a given RH when the mass change was less than 0.0005 %/min over a 10-minute window. The collected EMC data were used to obtain adsorption isotherms. In order to confirm the influence of kombucha solutions on sorption phenomena, the analysis also included the previously published own EMC data for a chitosan film produced with the use of acetic acid (Stanicka et al., 2021).

2.6. Sorption modelling

Measured EMC data were approximated with the four-parameter generalized D'Arcy and Watt (GDW) sorption model (Furmaniak et al., 2009, 2007a, 2007b). The GDW model is given by the following equation:

$$\text{EMC}(\text{kg}/\text{kg}) = \frac{m \cdot K \cdot \text{RH}}{(1 + K \cdot \text{RH})} \cdot \frac{1 - k \cdot (1 - w) \cdot \text{RH}}{(1 - k \cdot \text{RH})} \quad (2)$$

where: m – maximum monolayer water content (kg/kg), K – kinetic constant related to sorption on primary sites, k – kinetic constant related to sorption on secondary sorption sites, w – the ratio of water molecules bound to primary sites and converted into secondary sites, RH – relative humidity (-). The Levenberg-Marquardt iterative algorithm implemented in STATISTICA 13.3 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was used to estimate the coefficients of Eq. (2). The parameters of the sorption model were also estimated for the previously published own EMC data for the chitosan film produced using acetic acid.

2.7. Oxygen transmission rate (OTR)

The analyses of oxygen transmission rate (OTR) were performed for the prepared chitosan-kombucha films. Oxygen transmission rate was determined using the OxyPerm system consisting of an OxySense 325 analyzer and a special permeation chamber with an in-built OxyDot oxygen sensor (OxySense, Dallas, Texas, USA). During measurement, the system records fluorescence quenching time and calculates oxygen concentration changes within the test chamber in accordance with ASTM F2714-08 (ASTM F2714-08, 2013.). The tested film samples were cut into squares with 6.5 cm sides. OTR test conditions were as follows: temperature was $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ and RH was 65 %. The measurements were continued until the determination coefficient between partial measurements exceeded 0.95.

2.8. Water vapor transmission rate (WVTR)

The water vapor transmission rate (WVTR) of the prepared chitosan-kombucha films was determined on the basis of ISO 2528:2017 (ISO 2528:2017, 2017). The measuring vessels containing 10 g of anhydrous calcium chloride (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) were covered with a film sample, tightly sealed and placed in a desiccator containing a saturated sodium chloride solution (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) (RH = 65 %, t = 23 °C). The vessels were weighed with an accuracy to 0.001 g. The calculations of water vapor transmission rate (WVTR) were based on the Eq. 3:

$$WVTR(\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24\text{h}) = \frac{m \cdot 24}{A} \quad (3)$$

where: WVTR – water vapor transmission rate ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h}$), m – mass increase (g), A – water vapor transmission area (m^2).

2.9. Mechanical properties

The mechanical properties of the films were measured using an Instron Universal testing machine (Model 5965, Instron, USA) following ASTM D 882–12. The samples were cut into 1.5 cm × 10 cm strips and conditioned at 25 °C and 0.5 RH for at least 48 h. The test speed rate was 100 mm/min. The average measurements from 10 samples were reported for mechanical properties including tensile strength and elongation at break. Tensile strength (TS) as determined on the basis of Eq. 4:

$$TS(\text{MPa}) = \frac{F_{\max}}{A} \quad (4)$$

where: Fmax – maximum load (N), A – cross-sectional area of the initial film strip sample (mm^2).

Elongation at break (EB) was determined on the basis of Eq. 5:

$$EB(\%) = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \cdot 100 \quad (5)$$

where: L₀ – initial length of the film strip sample (mm), L₁ – final length of the film strip sample at breakage (mm).

2.10. Scanning electron microscopy (SEM)

Microscopic examinations were performed using a scanning electron microscope Evo 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating in beam mode at 20 kV with a secondary electron detector.

2.11. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

The ATR-FTIR spectra of chitosan-kombucha films were recorded by a Nicolet iS5 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a Fourier transform and deuterated triglycine sulfate detector. The spectra were recorded at 4000–600 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} recording 32 scans.

2.12. Antibacterial activity

The antibacterial activity of cell-free kombucha solutions and chitosan-kombucha films was determined using the agar diffusion method against pathogenic bacteria strains: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15443), *Salmonella enterica* (clinical isolate), and probiotic bacteria strains: *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactiplantibacillus plantarum* 299 v (isolate from Sanprobi IBS, Poland) and *Lactocaseibacillus paracasei* (CNCM I-1572). All indicator strains were stored in a Cryobank (Bacteria storage system, MAST Diagnostica) at – 20 °C. Prior to the tests, the strains were defrosted and passed twice

in nutrient broth (OXOID CM 0001, Hampshire, UK) with the addition of 2 % (w/v) glucose. The cultures of bacteria were grown at 35 ± 2 °C for 24 h. Muller–Hinton agar medium (OXOID CM 0337, Hampshire, UK) was used to determine antibacterial activity. The plates with this medium were inoculated using indicator strains in the range of 10⁷ CFU/cm³ (100 μl) and remained there for 15 min to adsorb the microorganisms to the surface. Next, in the case of testing the activity of kombucha solutions, the wells (10 mm diameter) were cut into agar plates, and 100 μl of the analyzed kombucha samples were placed inside, whereas the discs of the tested films with a diameter of 10 mm were placed to the surfaces of the inoculated plates. Next, the plates were incubated at 35 °C ± 2 °C for 24 h. After this time, the diameter of the inhibitory zone surrounding respectively the wells and discs was measured using a Computer Scanning System (MultiScanBase v14.02). The results are expressed in millimeters.

2.13. Statistical analysis

Statistical analyses included factorial one-way ANOVA, followed by Tukey's honest significant difference (HSD) test at α = 0.05. All statistical analyses were performed using the TIBCO Software Inc. Statistica version 13.3 (Palo Alto, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Antioxidant activity and phenolic compounds concentration in kombucha solutions

In the first step, antioxidant activity and the content of individual phenolic compounds in the cell-free kombucha solutions was determined. The tested kombucha solutions obtained from white, green and black tea and coffee showed high anti-radical activity, as presented in Fig. 1. All solutions showed more than two times higher antiradical activity than Trolox (16 %) used as a standard antioxidant. According to statistical analysis, kombucha solutions are characterized by various antiradical activity, depending on the types of tea. The antiradical activity of the solutions ranged from 39 % for kombucha obtained from white tea (W) to 91 % for coffee-based kombucha (C).

Literature data show that kombucha solutions obtained from the fermentation of various types of tea were characterized by high antiradical activity in the DPPH test, and the differences in activity result from the type of tea used in the fermentation process and its duration (Tanticharakunsiri et al., 2021). The research carried out by Vohra et al. (2018) showed that the fermentation time and carbon source affect the

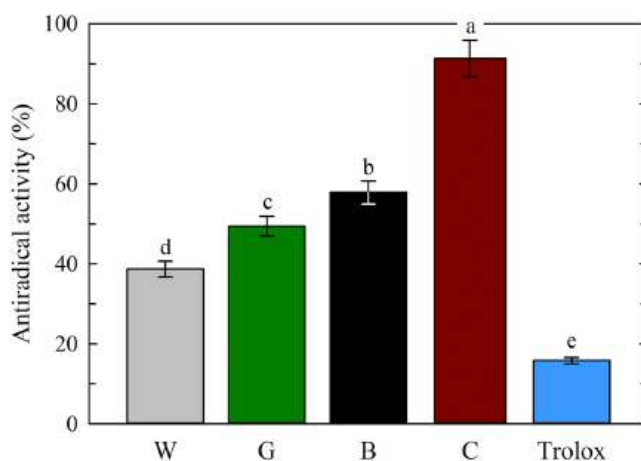


Fig. 1. Antiradical activity of kombucha solutions (W, G, B – white, green and black tea, respectively, C – coffee). Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

antiradical activity of kombucha solutions.

In cell-free kombucha solutions, the concentration of individual phenolic compounds was determined by chromatographic analysis and the results are presented in Table 2. All tea kombucha solutions were found with flavonoids (catechin, epicatechin, quercetin and kaempferol) in contrast to coffee kombucha solution which did not contain flavonoids, but only aromatic acids: caffeic, sinapic, coumaric, ferulic, and hydroxycinnamic. In addition, kombucha from green tea contained coumaric and hydroxycinnamic acids. The concentration of flavonoids, such as rutin, myricetin, pinobanksin, naringenin, pinostrobin, apigenin, chrysin and pinocembrin, aromatic acids, including vanillin, syringic and cinnamic, and CAPE was below the detection threshold of UPLC in all tested kombucha solutions.

UPLC analysis showed the highest content of phenolic compounds (125.85 µg/ml) for kombucha solution produced as a result of green tea fermentation. Moreover, the green tea kombucha solution had the highest number of phenolic compounds identified – 6 out of 21 tested compounds. In turn, kombucha from white tea contained the lowest content of tested phenolic compounds (24.51 mg/ml). The highest content among all tested phenols was recorded for epicatechin (61.81 µg/ml), catechin (28.64 µg/ml) and kaempferol (23.83 µg/ml) in the green tea kombucha solution. In addition, the coffee kombucha solution was found with a high content of caffeic acid (73.79 mg/ml). Literature data show that the main flavonoids present in green tea are the glycosidic structures (glucose, galactose, rhamnose) of kaempferol and quercetin (Lorenzo and Munekata, 2016). Studies by Antolak et al. (2021) show that the total concentration of catechin is the highest in green tea, which is consistent with the presented results. A higher quercetin concentration was noted for the kombucha sample based on green tea – 5.74 µg/ml than in the sample based on black tea – 4.13 µg/ml or white tea – 5.21 µg/ml. The literature reports also confirmed a varied content of phenolic compounds in black and green tea. These differences result from the type of tea and the place where it was grown (Chan et al., 2011; Khokhar and Magnusdottir, 2002). The phenolic content of kombucha based on black tea fermented for 21 days was investigated by Bhattacharya et al. (2016) who found that phenolic compounds concentration increased with increasing incubation time, which may be a result of the degradation of complex compounds into smaller ones and increased detection of phenolic compounds. Differences in the content of phenolic compounds may result from alteration

Table 2
Concentration of phenolic compounds in kombucha solutions.

Concentration (µg/ml kombucha solution)	W	G	B	C
Catechin	5.21 ^c ± 0.13	28.64 ^a ± 0.57	6.31 ^b ± 0.32	nd
Epicatechin	8.39 ^c ± 0.24	61.81 ^a ± 0.29	10.06 ^b ± 0.19	nd
Quercetin	5.21 ^c ± 0.13	5.74 ^a ± 0.17	4.13 ^b ± 0.13	nd
Kaempferol	5.70 ^c ± 0.49	23.83 ^a ± 1.19	11.08 ^b ± 0.20	nd
Caffeic acid	nd	nd	nd	73.79 ± 2.42
Sinapic acid	nd	nd	nd	4.15 ± 0.07
Coumaric acid	nd	3.40 ^b ± 0.15	nd	4.67 ^a ± 0.07
Hydroxycinnamic acid	nd	2.43 ^b ± 0.13	nd	3.24 ^a ± 0.14
Ferulic acid	nd	nd	nd	1.48 ± 0.33
Sum of phenolic compounds	24.51	125.85	31.58	87.33

Expressed as average ± standard deviations. Values denoted with identical letters do not differ significantly; nd – content below the detection limit of UPLC.

in the fermentation process parameters, such as temperature or duration (Bhattacharya et al., 2016). Moreover, some strains of bacteria, including lactic acid bacteria present in the solutions, may have the ability to degrade phenolic compounds, e.g., epicatechin to vanillic acid (Jayabalan et al., 2007). Therefore, the parameters of the kombucha fermentation process can influence the qualitative and quantitative phenolic profile (Jayabalan et al., 2007). The second largest number of phenolic compounds and total content of detected phenols was determined for the coffee kombucha solution. Coffee kombucha was found with aromatic acids, which are commonly determined in coffee and coffee by-products (Açikalin and Sanlier, 2021; Bondam et al., 2022).

3.2. Antioxidant activity of chitosan-kombucha solutions

The tested film-forming solutions, whose production involved the use of kombucha and chitosan, showed very high antiradical activity; the details are presented in Fig. 2. This activity is higher than for kombucha solutions without the addition of chitosan (Fig. 1). The activity of all tested solutions was at least four times higher than the antiradical activity of standard Trolox.

In our study the different kombucha solutions based on different tea (white, green, black) and coffee, were used to obtain different chitosan/kombucha films. As can be seen in Fig. 1 and Fig. 2, the antiradical activity of different kombucha solutions is different, because different tea and coffee are confirmed sources of many specific bioactive compounds with antioxidant activity. The concentration of phenolic compounds in kombucha solutions is different and depend on the type of tea and coffee used. Flavonoids (catechin, epicatechin, quercetin and kaempferol) were found in all tea-based kombucha solutions but not in coffee-based kombucha solutions, which was a source of aromatic acids (caffeic, sinapic, coumaric, ferulic, and hydroxycinnamic) (see Table 2). Therefore, the mechanism of antioxidant activity of chitosan-kombucha solutions is dependent on the phenolic compounds with different antiradical activity. Moreover, chitosan also exhibits antioxidant properties (Kim and Thomas, 2007; Savin et al., 2020). Based on results obtained in DPPH assay in this study and on the literature data (Vina et al., 2014; Vohra et al., 2018; Yang et al., 2009), the mechanism of antioxidant activity of different chitosan-kombucha solutions can be explained by the presence of different natural compounds with antiradical activity. On the other hand, the synergistic effects of phenolic compounds in kombucha solution and chitosan, cannot be excluded.

The results suggest that chitosan increases the antiradical activity of

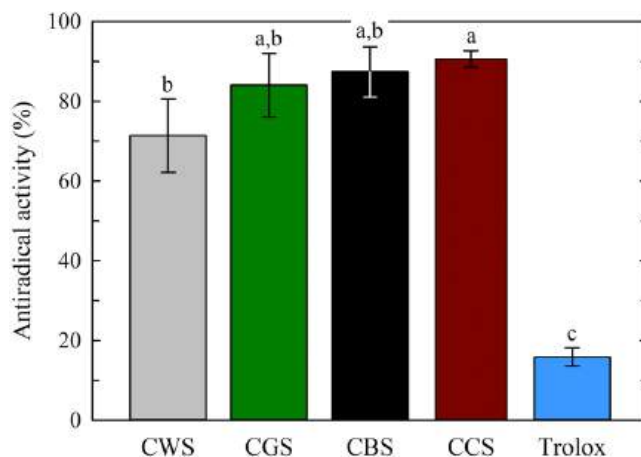


Fig. 2. Antiradical activity of chitosan-kombucha solutions (CWS, CGS, CBS – solutions obtained from white, green and black tea kombucha and chitosan, respectively, CCS – solution obtained from coffee kombucha and chitosan). Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

chitosan-kombucha solutions. According to literature data, chitosan solutions exhibit antioxidant properties. The antioxidant activity depends on the type of chitosan used, its molecular weight, and degree of deacetylation (Kim and Thomas, 2007; Savin et al., 2020). The anti-radical activity of chitosan films with potential use as food packaging is important due to the increased protection of stored food. Moreover, the use of substrates which shows antiradical activity eliminates the need to add synthetic antioxidants to food products.

3.3. Characterization of chitosan-kombucha films

The results of kombucha and chitosan-kombucha solutions indicated that these solutions have antioxidant activity and contain phenolic compounds exhibiting biological activity. Therefore, preliminary results suggest that chitosan-kombucha solutions can be applied in the production of films for food packaging. The physical, mechanical, biological and chemical properties for the obtained films were determined.

3.3.1. Sorption experiments

The equilibrium moisture content (EMC) was generally similar to that reported for pure chitosan and chitosan-methylcellulose composite films (Vargas et al., 2011). The adsorption isotherm for the examined chitosan films showed a slight increase in EMC below RH 0.50. The dominant increase in EMC occurred in the range of RH above 0.50. This phenomenon has been previously reported for hydrophilic films (Wiles et al., 2000; Cervera F et al., 2004; Srinivasa et al., 2007; Aguirre-Loredo et al., 2016).

The results of sorption experiments are presented in Fig. 3. The adsorption isotherms were plotted by fitting the four-parameter GDW model to the whole set of measured EMC data. For comparative purposes, the graph also shows previously published EMC data for chitosan film produced using an acetic acid solution for dissolving chitosan, obtained under identical conditions (Stanicka et al., 2021). The characteristic features of all tested chitosan films produced with the investigated kombucha solution are (a) generally small differences in the course of the adsorption isotherms and (b) a negligibly low EMC (less than 0.01 kg/kg) in the RH range below 0.35. Among the tested samples, the greatest limitation of hygroscopic properties concerned the films of chitosan produced with the use of black tea kombucha (sample CBF). The comparison of the adsorption isotherms in the tested chitosan-kombucha film samples with the analogous isotherm

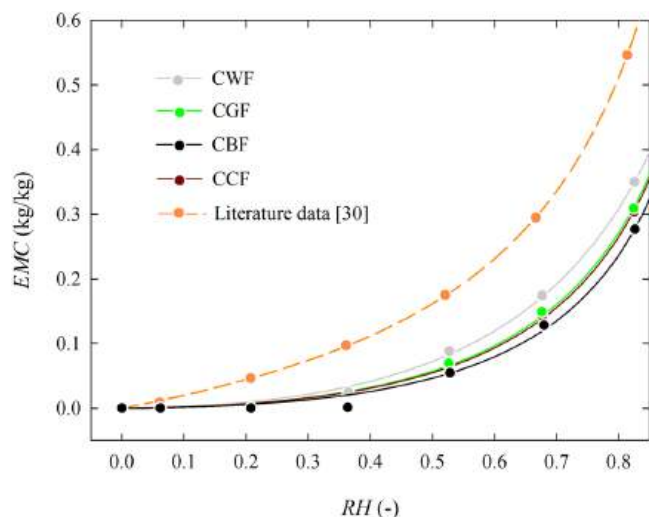


Fig. 3. The adsorption isotherms of chitosan films at 25 °C take into account the kombucha solution used (CWF, CGF, CBF – white, green and black tea, respectively, CCF – coffee, dots – experimental data, lines – isotherms calculated with the GDW model (Eq. 2)). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

calculated on the basis of previously published own data (EMC reference data) shows a positive effect of kombucha solutions on reducing the hygroscopic properties of chitosan films. The EMC of the chitosan produced with acetic acid is clearly higher in the whole RH range.

The estimated coefficients of the GDW model for the investigated chitosan films taking into account the kombucha solution used are presented in Table 3.

The use of kombucha solutions to produce a chitosan film affected monolayer water content (m) estimated using the GDW sorption model (Eq. (2)). The presented parameter is lower for kombucha from coffee than for kombucha from all types of tea included in the research. Since $m < 1$, the water molecules absorbed on primary sites are not completely converted into secondary sorption sites.

Moreover, the value of m for the kombucha from green and black tea, i.e., 0.4852 and 0.4391, represents respectively 86.9 % and 78.7 % of the corresponding value determined for the chitosan film produced with acetic acid (0.5582). An even greater reduction of this parameter (73.0 %) was found for coffee kombucha (0.4075). As a result of the use of kombucha solution, the accessibility of the primary sorption sites is limited. Therefore, the expected effect of using the kombucha solution in the production of chitosan films may be the reduction of hygroscopic properties and their stabilization.

Additionally, the estimated parameters of the GDW model were used to classify sorption isotherms according to Brunauer's classification (Brunauer, 1943). Furmaniak et al. (2007a) found that the simultaneous fulfillment of the conditions, i.e., parameter $m < 1$ and parameter $K > 1$, allows for the classification of isotherms up to type III. According to Brunauer's classification, type III sorption isotherm was observed where sorption phenomena is determined by the solution effects (Sing, 1982). For this isotherm (classified as solution-like), the small initial slope of the EMC to RH plot increases in the whole RH range.

3.3.2. Research of barrier properties

Film permeability depends on the chemical structure and morphology of the film, the nature of the permeant, and the temperature of the environment. Factors affecting (WVTR) chitosan films include the molecular weight and degree of deacetylation of chitosan, the type and amount of plasticizers added, and the preparation conditions, which influence the network structure of chitosan films (Ashrafi et al., 2018). Modifications and additions to chitosan films undoubtedly have significant importance and influence on the barrier properties. Therefore, the barrier properties of the obtained chitosan-kombucha films were assessed. Fig. 4 shows the oxygen transmission rate (OTR) and water vapor transmission rate (WVTR) determined for the prepared chitosan-kombucha films.

An OTR of 5.40 cm³/m²•24 h was determined for the CWF film. In the case of the CGF film, a high oxygen barrier was observed, as the OTR was 1.25 cm³/m²•24 h. CGF film was characterized by the highest oxygen barrier among all the tested films. The films consisting of chitosan-coffee kombucha and chitosan-black tea kombucha were characterized by a similar barrier to oxygen and the OTR was 3.82 and 3.84 cm³/m²•24 h, respectively. Assessment of the water vapor transmission rate showed that the CWF film was characterized by WVTR of 140.8 g/m²•24 h. CWF film showed the highest barrier to water vapor. The

Table 3

Estimated coefficients of the adsorption GDW model at 25 °C for chitosan-based films.

Chitosan-based films	m (kg/kg)	K	k	w	R^2
CWF	0.4804	0.0162	0.8268	25.2774	0.9980
CGF	0.4852	0.0105	0.8866	27.1758	0.9921
CBF	0.4391	0.0119	0.8954	24.8475	0.9921
CCF	0.4075	0.0101	0.9229	25.2628	0.9930
Literature data (Stanicka et al., 2021)	0.5582	0.3356	0.9202	1.1952	0.9999

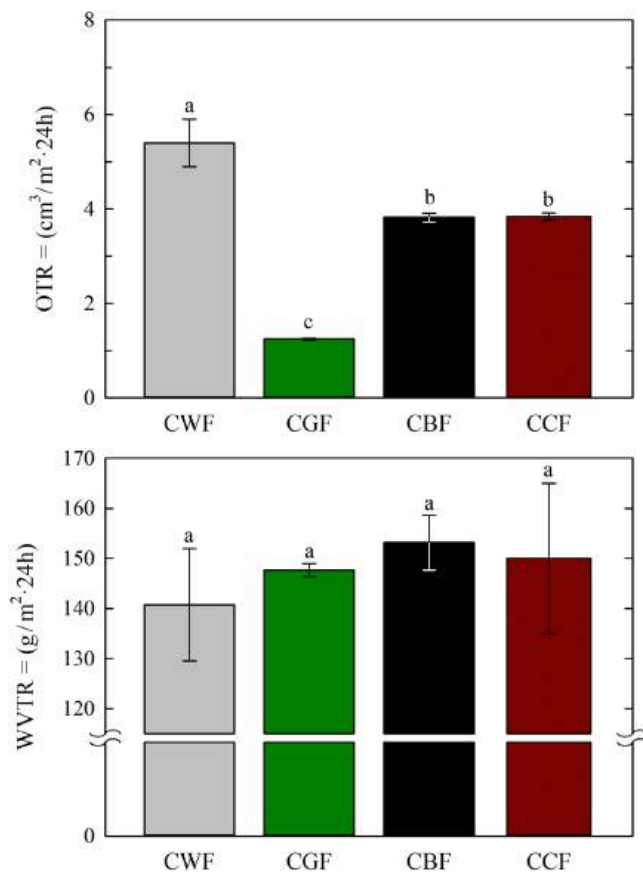


Fig. 4. Oxygen transmission rate (OTR) (above) and water vapor transmission rate (WVTR) (bottom) for chitosan-kombucha films (CWF, CGF, CBF – films obtained from white, green and black tea kombucha and chitosan, respectively, CCF – film obtained from coffee kombucha and chitosan). Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

WVTR for CGF film was $147.6 \text{ g/m}^2 \cdot 24 \text{ h}$. CCF and CBF films were characterized by slightly higher values, for which the determined WVTR was 153.2 and $150 \text{ g/m}^2 \cdot 24 \text{ h}$, respectively. The results indicate that depending on the type of tea used, and therefore on the active ingredients, films with different barrier properties were obtained. Based on the literature, it is known that incorporation of green tea and tea polyphenols into chitosan films improved the water vapor barrier properties of films (Siripatrawan and Harte, 2010). Therefore, it can be observed that the structure and quantity of phenolic acids in individual types of tea also determined the results of the barrier tests.

3.4. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphology of the obtained chitosan-kombucha film samples. Fig. 5 presents SEM images of the prepared films.

It was observed that the structure of all films is non-porous and ordered. Modification of chitosan films did not affect the homogeneity and smoothness of the surface in the obtained samples. The detection of small creases on the surface of CWF and CGF films did not affect the quality of the obtained samples. The results confirmed good integrity of the additives used with chitosan.

3.5. Tensile properties

As part of the strength tests, tensile strength and elongation at break

of the obtained films were determined. These are the commonest mechanical parameters for food packaging applications (Zhang and Jiang, 2020). Fig. 6 presents the tensile strength (TS) and elongation at break (EB) for the prepared chitosan films.

The film produced from chitosan and white tea kombucha (CWF) was characterized by the highest tensile strength, which was 4.89 MPa . However, this film showed the lowest elongation at break, which was 24.46% . The remaining films showed lower tensile strength, but at the same time higher elongation at break values. In the case of CGF film, TS was 3.82 MPa , while the elongation at break was 50.62% . On the other hand, the lowest tensile strength was characteristic for CBF film, where TS was 2.77 MPa . The highest elongation at break of 74.5% was observed in CBF film. The research found that the presence of the additive improved the flexibility of the tested films. The reduction in breaking strength may be due to the presence of polyphenols, which may disturb the crystal order in the polymer structure, weakening the intermolecular bonds and inhibiting the interactions of chitosan chains (Agarwal et al., 2021). This is especially influenced by phenolic acids, which interrupt the formation of an ordered crystal structure, weaken intermolecular hydrogen bonds, and hinder polymer-polymer chain interactions, which reduces the mechanical properties of the resulting films (Sun et al., 2017; Zhang and Xue, 2016). The differences in breaking strength and elongation obtained for the tested films may therefore result from the presence and structure of phenolic acids characteristic for a particular type of tea. The structure and amount of phenolic acids in individual types of tea also determined the obtained results of the barrier tests.

3.6. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

The chemical structure of chitosan-kombucha films was determined by FTIR. The results are shown in Fig. 7.

The infrared spectra of the samples in the 1000 cm^{-1} range indicate variance of the -OH functional group in the samples. These results are consistent with the literature data for kombucha solutions (Kaashyap et al., 2021). The samples showed a differential peak in the range of 1000 cm^{-1} to 1100 cm^{-1} . The peak in this range corresponds to the C-O group. The tested samples differ in the class of compounds of primary and secondary alcohol groups and aromatic ester groups (Kaashyap et al., 2021). The highest transmittance value in the range of 1000 cm^{-1} to 1100 cm^{-1} is observed for the film samples obtained from chitosan and coffee kombucha.

3.7. Antimicrobial activity

In order to assess the potential application of the obtained chitosan-kombucha films as a food packaging, their antibacterial activity was determined. The antimicrobial effect of kombucha solutions was also assessed. The results of kombucha solutions and chitosan-kombucha films activity against strains of probiotic and pathogenic bacteria are presented in Table 4.

All tested kombucha solutions were active against a narrow spectrum of bacteria, mostly gram-negative. Black tea kombucha was characterized by the broadest range of activity, as it inhibited the growth of *E. coli*, *S. enterica*, and *P. aeruginosa*. The greatest selectivity of action was shown by kombucha from coffee, which was active only against *P. aeruginosa*. All kinds of kombucha solutions showed the strongest activity against *P. aeruginosa*, with inhibition zone from 15 (green tea kombucha) to 22 mm (white tea kombucha). Photographic documentation of kombucha samples for which inhibition zones were noted is presented in the supplement (Fig.s1).

Chitosan films obtained with kombucha solutions, similarly to these solutions used to obtain them, were characterized by a high specificity of the antibacterial effect. Their range of activity was the same as kombucha solutions. Photographic documentation of film samples produced

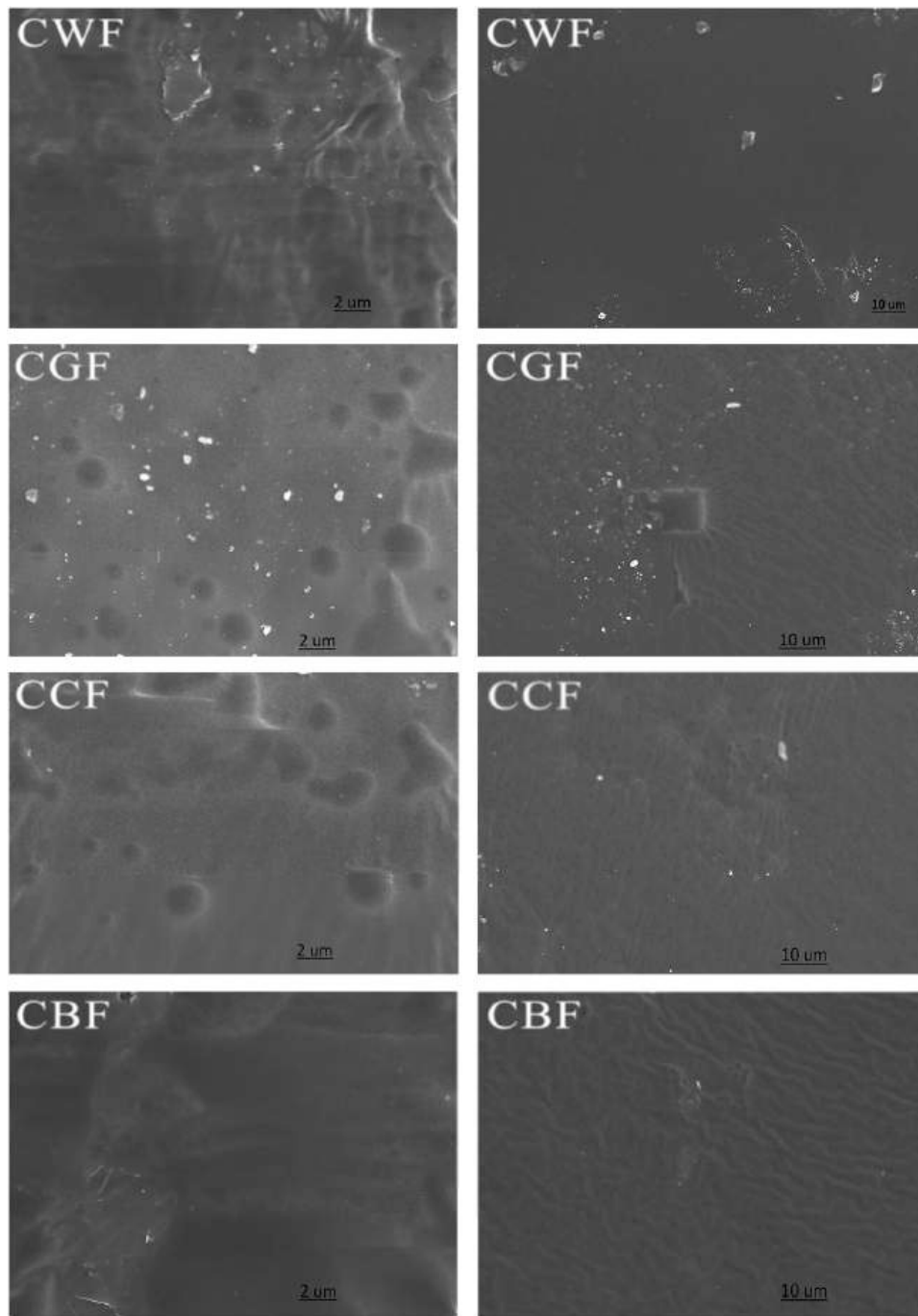


Fig. 5. SEM images of the prepared films: CWF, CGF, CCF and CBF, (CWF, CGF, CBF – films obtained from white, green and black tea kombucha and chitosan, respectively, CCF – film obtained from coffee kombucha and chitosan). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with kombucha, for which zones of inhibition were noted, are presented in the supplement (Fig.s2). CBF films exhibited higher activity against *E. coli* than the kombucha solution, and CBF, CGF, CWF films also had a stronger antagonistic effect on *S. enterica*. Comparing the literature results (Deghrigue et al., 2013; Vohra et al., 2018) obtained for black tea kombucha with the results obtained for the film consisting of chitosan and kombucha, it can be concluded that the presence of chitosan in the samples has a positive effect on the increase of antibacterial activity against *E. coli*. Ashrafi et al. (2018) investigated the activity against *S. aureus* and *E. coli* of films consisted of chitosan and kombucha and claimed that the inhibition properties of these films depend on the kombucha concentration. Many natural polyphenols show not only

antioxidant activity but also antimicrobial activity (Olszewska et al., 2020). Their antagonistic effect depends on their nature, structure and concentration, therefore the spectrum of antimicrobial activity of individual polyphenols differs. Some polyphenols can stimulate the growth of probiotic bacteria and commensal intestinal microbiota. The mechanism of such a complex and at the same time selective action of plant polyphenols on microorganisms has not been explained so far (Olszewska et al., 2020). Other ingredients that could have influenced the reported antibacterial effect may be metabolites produced by acetic bacteria and yeast during fermentation, i.e. acetic acid, ethyl alcohols and carbon dioxide (Wali and Abed, 2019). These compounds could additionally support the antimicrobial activity of polyphenols.

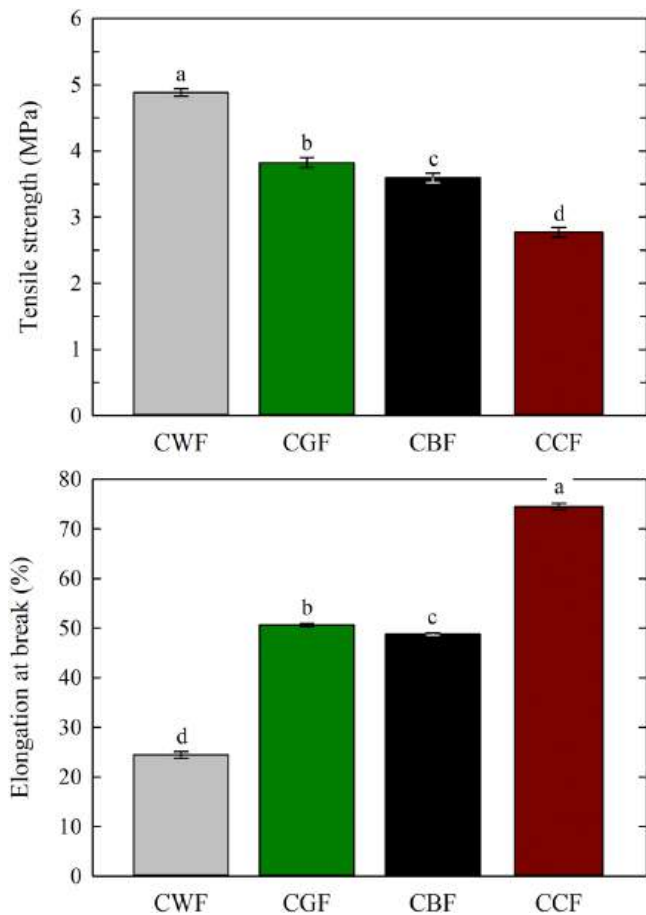


Fig. 6. Tensile strength (TS) (above) and elongation at break (EB) (bottom) for the prepared chitosan films. (CWF, CGF, CBF – films obtained from white, green and black tea kombucha and chitosan, respectively, CCF – film obtained from coffee kombucha and chitosan). Different letters indicate samples that were significantly different ($p < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Kombucha may be a source of other as yet unidentified microbial metabolites. In the study of microbiological activity, none of the tested chitosan-kombucha films showed antimicrobial activity against the three tested strains of probiotic bacteria: *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, and *L. paracasei*. This is beneficial for the potential use of chitosan-kombucha

films for food packaging or drug encapsulation.

4. Conclusions, outlook and future perspectives

The study characterized films produced from chitosan and kombucha solutions obtained from coffee and various types of tea (black, green and white). Kombucha solutions were used as a solvent to dissolve chitosan, instead of commonly applied inorganic acids. The kombucha solutions showed high antiradical activity and presence of phenolic compounds characterized by tea type and coffee. The addition of chitosan to kombucha solutions increased the antioxidant activity of solutions. Compared to chitosan-kombucha forming solutions, it can be concluded that chitosan has a positive effect on the increase of microbiological activity of the tested samples against selected bacterial strains. Films based on chitosan and black tea kombucha solution showed activity against *S. enterica*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. All tested films exhibited an antibacterial effect on *P. aeruginosa*, and additionally films consisting of chitosan and tea kombucha solutions exhibited activity against *S. enterica*. All tested kombucha solutions and chitosan-kombucha films showed no activity against probiotic bacteria strains. In turn, analysis of the results of sorption experiments confirms the significant influence of kombucha solutions on the hygroscopic and sorption phenomena properties of chitosan films. In general, the beneficial effect of kombucha solutions is manifested in clearly lower EMC values over the entire RH range than in the case of chitosan produced with acetic acid. Moreover, comparison of the estimated GDW sorption model shows that kombucha solutions limit the accessibility of primary sorption sites of chitosan-based films. Among chitosan-kombucha films, the greatest limitation of hygroscopic properties was exhibited by the film consisting of chitosan and black tea kombucha. The film obtained from a chitosan and kombucha solution from green tea was characterized by the highest oxygen barrier, and the film based on chitosan and a solution of white kombucha tea was characterized by the highest tensile strength.

The results indicate that the type of kombucha solutions used to prepare chitosan-kombucha films influences the mechanical, physical and microbiological properties of the obtained films. In addition, the findings suggest that kombucha solutions, both from coffee and various types of tea, can be used as a natural chitosan solvent instead of inorganic acids. The obtained results confirm that the new chitosan films for the production of which kombucha was used as a solvent have better properties than films with traditionally used acidic solvent. They can be a viable alternative food packaging material.

An important aspect of packaging materials is knowledge about their biodegradability and disposal. In the longer term, it is necessary to carry out biodegradability tests of the obtained films and tests focused on a

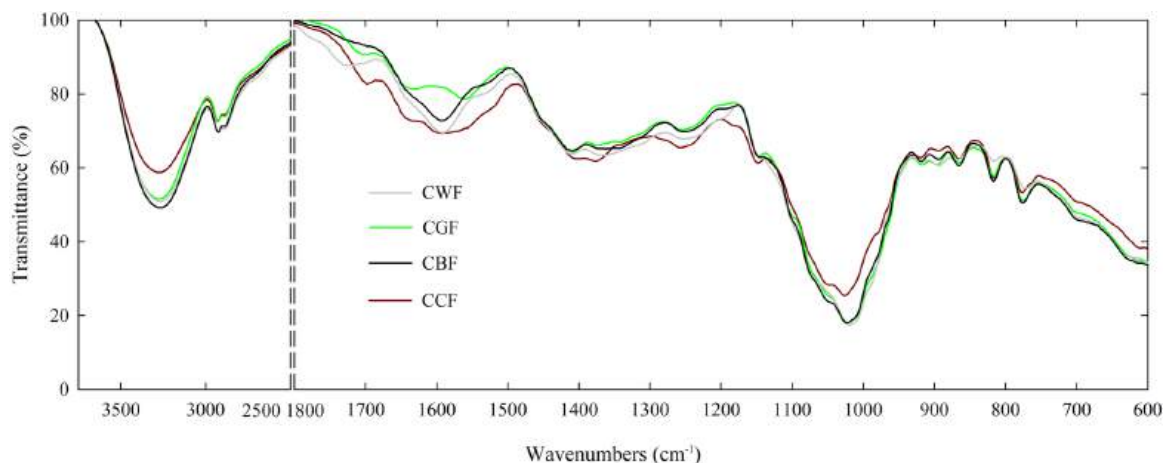


Fig. 7. FTIR spectra of the prepared chitosan films (CWF, CGF, CBF – films obtained from white, green and black tea kombucha and chitosan, respectively, CCF – film obtained from coffee kombucha and chitosan).

Table 4
Antibacterial activity of kombucha solutions and chitosan-kombucha films.

Zone of inhibition (mm)							
Probiotic strains of bacteria				Pathogenic strains of bacteria			
Kombucha solutions							
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>
B	–	–	–	17	14	21	–
G	–	–	–	–	15	15	–
W	–	–	–	–	16	22	–
C	–	–	–	–	–	19	–
Chitosan-kombucha films							
CBF	–	–	–	22	17	21	–
CGF	–	–	–	–	17	19	–
CWF	–	–	–	–	17	20	–
CCF	–	–	–	–	–	18	–

specific application in the packaging industry of chitosan-kombucha films. Further research on chitosan films obtained using kombucha as a solvent is still needed to expand the use of this material in food packaging and bring its use to the industrial level. The problem of the process of obtaining chitosan itself should also be considered. It is still a process that uses significant amounts of concentrated acids, which generates a large amount of wastewater that must be properly treated and neutralized. Obtaining chitosan is also a process that requires a lot of energy. The study presents the possibility of using kombucha, which is a natural product, to prepare chitosan film-forming solutions, which is undoubtedly a more ecological solution than using traditional inorganic acids.

CRediT authorship contribution statement

Karolina Stefanowska: Methodology, Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Magdalena Woźniak:** Methodology, Conceptualization, Writing - review & editing. **Jerzy Majka:** Methodology, Formal analysis. **Anna Síp:** Methodology, Formal analysis. **Lucyna Mrówczyńska:** Methodology, Formal analysis. **Agnieszka Waśkiewicz:** Methodology, Formal analysis. **Wojciech Kozak:** Methodology, Formal analysis. **Renata Dobrucka:** Supervision, Conceptualization. **Izabela Ratajczak:** Supervision, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.indcrop.2023.116634](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116634).

References

- Abrial, H., Pratama, A.B., Handayani, D., Mahardika, M., Aminah, I., Sandrawati, N., Sugiarti, E., Muslimin, A.N., Sapuan, S.M., Ilyas, R.A., 2021. Antimicrobial edible film prepared from bacterial cellulose nanofibers/starch/chitosan for a food packaging alternative. *Int. J. Polym. Sci.* 2021, 6641284 <https://doi.org/10.1155/2021/6641284>.
- Açıkalın, B., Sanlier, N., 2021. Coffee and its effects on the immune system. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.023>.
- Agarwal, C., Kóczán, Z., Böröcsök, Z., Halász, K., Pásztor, Z., 2021. Valorization of *Larix decidua* Mill. bark by functionalizing bioextract onto chitosan films for sustainable

- active food packaging. *Carbohydr. Polym.* 271, 118409 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118409>.
- Aguirre-Loredo, R.Y., Rodríguez-Hernández, A.I., Morales-Sánchez, E., Gómez-Aldapa, C. A., Velazquez, G., 2016. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chem.* 196, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.065>.
- Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., de Feo, V., Porta, R., Fechtali, T., Mauriello, G., 2021. Basil essential oil: composition, antimicrobial properties, and microencapsulation to produce active chitosan films for food packaging. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods10>.
- Antolak, H., Piechota, D., Kucharska, A., 2021. Kombucha tea—a double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>.
- Antonowicz, K., Osmala-Kurpiewska, W., Piekut, A., 2021. Awareness of parents about risk to children's health arising from exposure to selected chemicals passing from plastic food packaging. *Med. Ogól. i Nauk. o Zdrowiu* 27, 297–305. <https://doi.org/10.26444/monz/140158>.
- Ashrafi, A., Jokar, M., Mohammadi Nafchi, A., 2018. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.028>.
- ASTM F2714-0, 2013. Standard Test Method for Oxygen Headspace Analysis of Packages Using Fluorescent Decay. ASTM International, West Conshohocken, PA, USA.
- Atiweh, G., Mikhael, A., Parrish, C.C., Banoub, J., Le, T.A.T., 2021. Environmental impact of bioplastic use: a review. *Heliyon* 7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07918>.
- Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M.M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H., Gachhui, R., 2016. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against enteric bacterial pathogens. *Curr. Microbiol.* 73, 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3>.
- Bondam, A.F., Diolinda da Silveira, D., Pozzada dos Santos, J., Hoffmann, J.F., 2022. Phenolic compounds from coffee by-products: extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.013>.
- Brunauer S., 1943. The Adsorption of Gases and Vapor.
- Cervera F, M., Karjalainen, M., Airakisan, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinämäki, J., Iraizoz Colarte, A., Yliruusi, J., 2004. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 69–76.
- Chan, E.W.C., Soh, E.Y., Tie, P.P., Law, Y.P., 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacogn. Res.* 3, 266–272. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.89748>.
- Chen, Po-Hui, Hwang, Ya-Hsi, Kuo, Ting-Yun, Liu, Fang-Hsuan, Lai, Juin-Yih, Hsieh, Hsyue-Jen, 2007. Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution. *J. Med. Biol. Eng.* 27, 23–28.
- Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Abid, K., Bakhrouf, A., 2013. Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 3466–3470. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1230>.
- Dobrucka, R., 2016. Antimicrobial packaging with natural compounds - a review. *Logforum* 12, 4. <https://doi.org/10.17270/J.L.O.G.2016.4.1>.
- Foster, L.J.R., Butt, J., 2011. Chitosan films are NOT antimicrobial. *Biotechnol. Lett.* 33, 417–421. <https://doi.org/10.1007/S10529-010-0435-1>.
- Fu, B., Mei, S., Su, X., Chen, H., Zhu, J., Zheng, Z., Lin, H., Dai, C., Luque, R., Yang, D.-P., 2021. Integrating waste fish scale-derived gelatin and chitosan into edible nanocomposite film for perishable fruits. *Int. J. Biol. Macromol.* 191, 1164–1174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.171>.
- Furmaniak, S., Terzyk, A.P., Gauden, P.A., 2007a. The general mechanism of water sorption on foodstuffs – Importance of the multitemperature fitting of data and the hierarchy of models. *J. Food Eng.* 82, 528–535. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.012>.
- Furmaniak, S., Terzyk, A.P., Gauden, P.A., Rychlicki, G., 2007b. Applicability of the generalised D'Arcy and Watt model to description of water sorption on pineapple and other foodstuffs. *J. Food Eng.* 79, 718–723. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.036>.

- Furmaniak, S., Terzyk, A.P., Gołembiewski, R., Gauden, P.A., Czepirski, L., 2009. Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Res. Int.* 42, 1203–1214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.004>.
- Heydari Foroushani, P., Rahmani, E., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., Pourmadadi, M., Rahdar, A., Díez-Pascual, A.M., 2022. Curcumin sustained release with a hybrid chitosan-silk fibroin nanofiber containing silver nanoparticles as a novel highly efficient antibacterial wound dressing. *Nanomaterials* 12, 3426. <https://doi.org/10.3390/NANO12193426>.
- ISO 2528:2017—, 2017. *Sheet Materials—Determination of Water Vapour Transmission Rate (WVTR)—Gravimetric (Dish) Method*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K., 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem.* 102, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>.
- Kaashyap, M., Cohen, M., Mantri, N., 2021. Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>.
- Kamiński, K., Jarosz, M., Grudziński, J., Pawlik, J., Zastawnik, F., Pandyr, P., Kotodziejczyk, A.M., 2020. Hydrogel bacterial cellulose: a path to improved materials for new eco-friendly textiles. *Cellulose* 27, 5353–5365. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03128-3>.
- Khokhar, S., Magnusdottir, S.G.M., 2002. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.* 50, 565–570. <https://doi.org/10.1021/jf010153l>.
- Khouri, J., Penlidis, A., Moresoli, C., 2020. Heterogeneous method of chitosan film preparation: effect of multifunctional acid on film properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 137. <https://doi.org/10.1002/app.48648>.
- Kim, K.W., Thomas, R.L., 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chem.* 101, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.038>.
- Kim, Ki. Myong, Son, Jeong Hwa, Kim, Sung-Koo, Weller, Curtis L., Milford, A.Hanna, 2006. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *J. Food Sci.* 71, 119–124.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., 2016. Phenolic compounds of green tea: health benefits and technological application in food. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.010>.
- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., Burgos-Hernández, A., Ezquerro-Brauer, J.M., Plascencia-Jatomea, M., 2013. Extruded films of blended chitosan, low density polyethylene and ethylene acrylic acid. *Carbohydr. Polym.* 91, 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.076>.
- Mitelut, A.C., Tânase, E., Popa, V.I., Popa, M.E., 2015. Sustainable alternative for food packaging: chitosan biopolymer—a review. *AgroLife Sci. J.* 4, 52–62.
- Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Amani, A.M., Esmaili, H., Ghasemi, Y., Babapoor, A., Mojoudi, F., Arjomand, O., 2018. Pb(II) removal from synthetic wastewater using Kombucha scoby and graphene oxide/Fe₃O₄. *Phys. Chem. Res.* 6, 759–771.
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., 2005. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Bioresour. Technol.* 96, 1743–1748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.006>.
- Norouzi, F., Pourmadadi, M., Yazdian, F., Khoshmaram, K., Mohammadnejad, J., Sanati, M.H., Chogan, F., Rahdar, A., Bairo, F., 2022. PVA-based nanofibers containing chitosan modified with graphene oxide and carbon quantum dot-doped TiO₂ enhance wound healing in a rat model. *JFB* 13, 300. <https://doi.org/10.3390/JFB13040300>.
- Olszewska, M.A., Gędas, A., Simões, M., 2020. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: applications and limitations in the food industry. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>.
- Ong, G., Kasi, R., Subramaniam, R., 2021. A review on plant extracts as natural additives in coating applications. *Prog. Org. Coat.* 151. <https://doi.org/10.1016/j.PORGOAT.2020.106091>.
- Petrosyan, K., 2019. Produkty z tworzyw sztucznych – wykorzystanie i zagrożenia. *Zesz. Stud. Ruch. Nauk. Uniw. Jana Kochanowskiego w Kielc.* 28, 87–97.
- Qiao, C., Ma, X., Wang, X., Liu, L., 2021. Structure and properties of chitosan films: effect of the type of solvent acid. *LWT* 135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109984>.
- Razmovski, Radojka, Šćiban, Marina, 2008. Biosorption of Cr(VI) and Cu(II) by waste tea fungal biomass. *Ecol. Eng.* 34, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.020>.
- Savin, S., Craciunescu, O., Oancea, A., Ilie, D., Ciucan, T., Antohi, L.S., Toma, A., Nicolescu, A., Deleanu, C., Oancea, F., 2020. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of chitosan preparations extracted from *Ganoderma lucidum* mushroom. *Chem. Biodivers.* 17. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000175>.
- Shakeel, M., Kiani, M.H., Sarwar, H.S., Akhtar, S., Rauf, A., Ibrahim, I.M., Ajalli, N., Shahnaz, G., Rahdar, A., Díez-Pascual, A.M., 2023. Emulgel-loaded mannoseylated thiolated chitosan-coated silver nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Biol. Macromol.* 227, 1293–1304. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2022.11.326>.
- Sing, K.S.W., 1982. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Provisional. *Pure Appl. Chem.* 54, 2201–2218. <https://doi.org/10.1351/pac198254112201>.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.* 24, 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>.
- Soares, M.G., de Lima, M., Reolon Schmidt, V.C., 2021. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: a literature review. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>.
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Tharanathan, R.N., 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocoll.* 21, 1113–1122. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.005>.
- Stanicka, K., Dobrucka, R., Woźniak, M., Sip, A., Majka, J., Kozak, W., Ratajczak, I., 2021. The effect of chitosan type on biological and physicochemical properties of films with propolis extract. *Polymers* 13. <https://doi.org/10.3390/POLYM13223888>.
- Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X., Guo, Y., 2017. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydr. Polym.* 163, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.016>.
- Tanticharakunsiri, W., Mangmool, S., Wongsariya, K., Ochaikul, D., 2021. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. *J. Food Biochem.* 45. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13574>.
- Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, P.K., 2008. Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications. *e-Polymers* 8, 93. <https://doi.org/10.1515/epoly.2008.8.1.1082>.
- Vargas, M., Albers, A., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2011. Water interactions and microstructure of chitosan-methylcellulose composite films as affected by ionic concentration. *LWT Food Sci. Technol.* 44, 2290–2295.
- Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R., Deniņa, I., 2014. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *J. Med. Food* 17, 179–188. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>.
- Vohra, B.M., Fazry, S., Sairi, F., Babul-Airani, O., 2018. Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha, *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences Special Issue on International Conference on Agriculture*.
- Wali, M.K., Abed, M.M., 2019. Antibacterial activity of acetic acid against different types of bacteria causes food spoilage. *J. Food Technol. Pres.* 3 (1), 1–4. ISSN: 2591-796X.
- Wang, H., Qian, J., Ding, F., 2018. Emerging chitosan-based films for food packaging applications. *J. Agric. Food Chem.* 66, 395–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04528>.
- Wang, J., Euring, M., Ostendorf, K., Zhang, K., 2022. Biobased materials for food packaging. *J. Bioresour. Bioprod.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2021.11.004>.
- Wiles, J.L., Vergano, P.J., Barron, F.H., Bunn, J.M., Testin, R.F., 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *J. Food Sci.* 65 (7), 1175–1179.
- Yadav, S.K., Khan, Z.A., Mishra, B., Bahadur, S., Kumar, A., Yadav, B., 2021. The toxic side of nanotechnology: an insight into hazards to health and the ecosystem. *Micro Nanosyst.* 14, 21–33. <https://doi.org/10.2174/1876402913666210412160329>.
- Yang, Z.W., Ji, B.P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T., 2009. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *J. Sci. Food Agric.* 89, 150–156. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3422>.
- Zhang, W., Jiang, W., 2020. Antioxidant and antibacterial chitosan film with tea polyphenols-mediated green synthesis silver nanoparticle via a novel one-pot method. *Int. J. Biol. Macromol.* 155, 1252–1261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.093>.
- Zhang, W., Xue, J., 2016. Economically motivated food fraud and adulteration in China: an analysis based on 1553 media reports. *Food Control* 67, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.004>.
- Zhao, R., Guan, W., Zheng, P., Tian, F., Zhang, Z., Sun, Z., Cai, L., 2022. Development of edible composite film based on chitosan nanoparticles and their application in packaging of fresh red sea bream fillets. *Food Control* 132, 108545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108545>.

Article

Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers

Karolina Stefanowska ¹, Magdalena Woźniak ^{1,*}, Anna Sip ², Róża Biegańska-Marecik ³, Renata Dobrucka ⁴
and Izabela Ratajczak ¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60625 Poznań, Poland; karolina.stefanowska@up.poznan.pl (K.S.); izabela.ratajczak@up.poznan.pl (I.R.)

² Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60627 Poznań, Poland; anna.sip@up.poznan.pl

³ Department of Food Technology of Plant Origin, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60624 Poznań, Poland; roza.marecik@up.poznan.pl

⁴ Department of Industrial Products and Packaging Quality, Institute of Quality Science, Poznań University of Economics and Business, al. Niepodległości 10, 61875 Poznań, Poland; renata.dobrucka@ue.poznan.pl

* Correspondence: magdalena.wozniak@up.poznan.pl

Abstract: Plastic pollution and environmental degradation necessitate the development of natural, biodegradable food preservation materials. This study examined chitosan-based film-forming solutions using kombucha derived from black tea, lemon balm, and chamomile as natural solvents rich in bioactive compounds. Lemon balm kombucha solutions were used to create chitosan films and coat red peppers. The study assessed the mechanical properties of the films and the effects of chitosan coating on peppers, including texture, ascorbic acid content, sensory attributes, and antioxidant activity. Microbiological tests showed that a chitosan–lemon balm kombucha solution acted against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica*. Lemon balm kombucha had high total phenolic (381.67 µg GAeq/mL) and flavonoid (21.05 µg Qeq/mL) contents. The chitosan film exhibited a tensile strength of 11.08 MPa and an elongation at break of 53.45%. The water vapor transmission rate of the obtained chitosan film was 131.84 g/m²·24 h. Coated peppers showed a 32% increase in skin strength and retained 11% more ascorbic acid after 15 days. Sensory evaluation revealed no significant differences from controls. These results highlight lemon balm kombucha as a promising natural solvent for chitosan coatings, which have the potential to extend red pepper shelf life and to support food preservation.

Keywords: fruit coating; ascorbic acid; fruit quality; barrier properties



check for updates

Academic Editor: Jongbok Lee

Received: 10 March 2025

Revised: 25 March 2025

Accepted: 31 March 2025

Published: 2 April 2025

Citation: Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Sip, A.; Biegańska-Marecik, R.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. *Materials* **2025**, *18*, 1605. <https://doi.org/10.3390/ma18071605>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

When choosing products in a store, consumers usually assess the quality of vegetables purchased based on their appearance and freshness at the time of purchase. Unfortunately, storing vegetables and fruits on store shelves or transporting them to the store negatively affects the integrity of these products, causing them to brown, change taste and texture and lose nutritional value [1]. Furthermore, studies have shown that about one third of the total production of fruits and vegetables is lost before it reaches the consumer [1]. In order to protect food from spoilage and mechanical damage during transport and storage, packaging is used. However, due to the environmental threat posed by plastic packaging, new solutions are being sought that could successfully replace these while also acting as an environmentally friendly alternative.

An example of such a solution is that of edible coatings, which can protect food products against adverse biological factors, allow for the extension of shelf life [2], limit lipid oxidation [3] and reduce moisture loss from food products [4]. Edible coatings applied to products by spraying or immersion perform a barrier function, protect against gas penetration, moisture migration, aroma changes and the exchange of various soluble substances [5,6]. Various types of matrices are used to produce coatings: polysaccharides such as chitosan, cellulose, starch, pectin [7–9]; proteins such as casein, bean proteins, soy proteins [10–12]; and lipids or composite materials [13].

Chitosan is a natural polysaccharide obtained from chitin, which in turn is obtained from, among other things, the shells of crustaceans constituting industrial waste. Due to its film-forming properties, biocompatibility, and biodegradability, it is a good matrix for the production of natural packaging or coatings for food products [14]. Literature data show that packaging materials and coatings produced on the basis of chitosan exhibit antibacterial and antifungal activity, which is beneficial from the point of view of protecting packaged food from spoiling too quickly [15–17]. Chitosan is a polysaccharide that is insoluble in water, but which dissolves well in acidic substances, e.g., acetic, citric, or lactic acids. Studies have shown that the type of solvent used affects the biological and mechanical properties of the obtained chitosan-based materials [18,19]. Current research focuses on seeking out new solvents for obtaining chitosan materials that, apart from their solvent function, are rich in biologically active substances, and which allow for an increase in, among other things, the microbiological activity of the obtained materials [20,21].

Kombucha is a traditional beverage obtained through the fermentation of tea. This process occurs due to the presence of a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), which consists of acetic acid bacteria (AAB), lactic acid bacteria (LAB), and yeast [22,23]. Kombucha is a rich source of bioactive compounds such as phenolic compounds, organic acids, and vitamins [22]. Due to the presence of bioactive compounds, kombucha is a very effective antioxidant [24,25]. It also exhibits antimicrobial activity against strains such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*; research shows that this activity varies depending on the length of the fermentation process or the type of tea used in the process [26].

The aim of this work was to obtain chitosan coatings using a natural solvent that is rich in biologically active substances, i.e., kombucha. Three types of tea were used to prepare kombucha: black tea, lemon balm and chamomile. A kombucha that is characterized by the best biological activity was used to produce a chitosan film and a protective coating, which was then used to cover red bell peppers. The plant material was subjected to qualitative tests to assess the potential possibility of extending the shelf life by covering food products with a film-forming solution of chitosan and kombucha based on lemon balm. The obtained results suggest that lemon balm kombucha can be an effective, natural and novel solvent for chitosan, one that is characterized by the additional benefits that result from the richness of the bioactive ingredients contained in it, and the obtained coating allowed for the maintenance of the product's high quality during its storage.

2. Materials and Methods

2.1. Research Methodology of Kombucha, Chitosan–Kombucha Solutions and Films

2.1.1. Preparation of Kombucha

The kombucha was prepared by dissolving 70 g of sucrose (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) in 1 L of distilled and boiled water, followed by adding 4 g of three tea types: chamomile tea, lemon balm and black tea (Herbapol, Lublin, Poland). After brewing for 10 min, the teas were removed from the solution. Once cooled to room temperature, 100 mL of a previously fermented black tea broth was added as a starter culture. Fermentation

proceeded at room temperature for 21 days. For analysis, microorganism cells were removed from the kombucha solutions by centrifugation at $5000\times g$ for 10 min, followed by microfiltration with Millex GV membrane filters (Millipore, Burlington, MA, USA).

2.1.2. Preparation of Chitosan–Kombucha Solutions

Chitosan, derived from crab shells purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), was used to obtain film-forming solutions. Three separate chitosan–kombucha solutions were prepared by dissolving 4 g of chitosan in 400 mL of cell-free kombucha solutions made from chamomile, lemon balm, and black teas. The solutions were stirred mechanically. The symbols of the samples received are explained and presented in Table 1.

Table 1. Symbols of received samples.

Symbols	Kombucha Solution	Symbols	Chitosan–Kombucha Solutions
C	Chamomile tea	CS	Chitosan–chamomile tea kombucha
LB	Lemon balm tea	LBS	Chitosan–lemon balm kombucha
B	Black tea	BS	Chitosan–black tea kombucha

2.1.3. Preparation of Chitosan–Kombucha Films

To produce the chitosan–kombucha films, the film-forming solutions obtained as in point 2.1.2. were poured into Petri dishes lined with Teflon and allowed to dry at room temperature for 48 h. Only the film obtained using lemon balm kombucha allowed for further mechanical tests. The obtained chitosan–lemon balm kombucha film was described by the symbol LBF, while the literature data [27] for the chitosan film produced with the commonly used acetic acid was used as a control sample, marked with the symbol CF.

2.1.4. Total Phenolic and Flavonoid Content in Kombucha Solutions

The total phenolic content (TPC) in kombucha solutions was determined using the Folin–Ciocalteu procedure. The kombucha solution (0.1 mL) was mixed with Folin–Ciocalteu reagent (0.25 mL, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), and, after 3 min, with Na_2CO_3 solution (3 mL, 10%, Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland). The absorbances at 765 nm in all solutions were measured by a Cary 300 Bio UV–Visible scanning spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) after incubation for 40 min in the dark and at ambient temperature. Results were expressed as gallic acid equivalent in mL of kombucha solution (mg GAeq/mL). All measurements were made in triplicate.

Measurement of the total flavonoid content (TFC) in kombucha solutions was performed based on the aluminum chloride colorimetric method. The kombucha solution (0.1 mL) was mixed with methanol (0.9 mL) and AlCl_3 solution (2 mL, 2%, Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland). The absorbance at 430 nm was read by a Cary 300 Bio UV–Visible scanning spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) after incubation for 45 min in the dark and at ambient temperature. All results are expressed as μg of quercetin equivalent in mL of kombucha solution (μg Qeq/mL). All measurements were made in triplicate.

2.1.5. Preparation of Indicator Microorganism Cultures for Antibacterial Testing

Bacterial strains stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ were gently thawed (at room temperature) and then passaged twice in BHI medium (Oxoid, Basingstoke, UK) with 2% glucose (temperature $30\text{--}37\text{ }^\circ\text{C}$, depending on the strain, 24 h). Petri dishes with Mueller–Hilton Agar (Oxoid, Basingstoke, UK) were then inoculated with a suspension of the prepared strains containing 10^6 cfu/mL. The inoculated plates were left for 15 min to absorb microorganisms on their surface. The strains used for testing were *Bacillus subtilis* (food isolate), *E. coli* (ATCC 10536), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), and *S. enterica* (clinical isolate).

2.1.6. Antibacterial Activity of Kombucha–Chitosan Solutions

An amount of 10 µL of tested kombucha–chitosan solution was applied to each of the surfaces of plates inoculated with standardized bacterial suspensions (10^6 cfu/mL). Plates with applied samples were incubated at 30–37 °C (depending on the strain) for 24 h. After incubation, the antimicrobial activity of the tested samples was assessed. For this purpose, the diameters of the inhibition zones formed around the sites of the applied samples were measured using a computer scanning system (MultiScaneBase v14.02). Results are expressed in millimeters.

2.1.7. Water Vapor Transmission Rate

The water vapor transmission rate (WVTR) of kombucha–chitosan films was evaluated following the ISO 2528:2017 standard [28]. For this measurement, vessels containing 10 g of anhydrous calcium chloride (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) were covered with the film samples, sealed securely, and placed inside a desiccator. The desiccator maintained a relative humidity (RH) of 65%, which was achieved using a saturated solution of sodium chloride (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland), and a controlled temperature of 23 °C. The vessels were weighed with a precision of 0.001 g. The WVTR was determined using the formula presented as the following formula:

$$\text{WVTR} = \frac{m \cdot 24}{A}$$

where WVTR—water vapor transmission rate ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h}$), m (g)—mass increase and A (m^2)—water vapor transmission area.

2.1.8. Mechanical Properties

The mechanical properties of the prepared films were assessed using an Instron universal testing machine (Model 5965, Instron, Norwood, MA, USA), following the ASTM D882-12 standard [29]. Film samples were cut into strips measuring 1.5 cm by 10 cm and conditioned at 23 °C with 50% relative humidity for at least 48 h. The testing was carried out at a speed of 100 mm/min, evaluating mechanical properties such as tensile strength and elongation at break. The average values were derived from ten samples. Tensile strength (TS) was determined using the following equation:

$$\text{TS (MPa)} = \frac{F_{\max}}{A}$$

where F_{\max} —the maximum load (N) and A —the cross-sectional area of the initial film strip sample (mm^2).

Elongation at break (EB) was determined using the following equation:

$$\text{EB(\%)} = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \cdot 100$$

where L_0 —the initial length of the film strip sample (mm) and L_1 —the final length of the film strip sample at breakage (mm).

2.2. Research Methodology of Coated Red Bell Peppers

2.2.1. Plant Material

Red bell peppers were purchased from Lidl (Neckarsulm, Germany). The peppers were selected for uniformity, shape, color, and size, and all fruits with defects were rejected. The fruits were randomly divided into 2 groups of 8 fruits. The fruits of the first group were coated with a chitosan–lemon balm kombucha solution prepared as in point 2.1.2. by

dipping them twice in the solution, before being dried at room temperature for 24 h. The second group was a control sample and was not coated. Chitosan–lemon balm kombucha-coated peppers were marked with the symbol LBP, while the control group, which was not coated with the solution, was given the symbol CP. Both the coated and control groups were stored for 15 days at 18 °C, simulating supermarket retail conditions.

2.2.2. Texture Parameter Analysis

The measurement of puncture force and skin elasticity was performed using a TA.XT plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, UK). A P/2 probe and a load cell with a maximum capacity of 5 kg were utilized for this purpose. Measurement parameters were as follows: probe speed of 0.5 mm/s, penetration distance of 6 mm, and a contact force of 50 g.

2.2.3. Ascorbic Acid Determination

The extraction of ascorbic acid from the samples was performed using 1% metaphosphoric acid (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The content was determined using the UPLC method [30] with an LC Agilent Technologies 1260 Infinity system (Waldbronn, Germany) equipped with a Zorbax SB-C18 column (4.6 mm × 150 mm; 5 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a DAD detector (Agilent Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Germany). The mobile phase consisted of methanol (phase A) and 0.005 mol/L KH₂PO₄ solutions (phase B). A gradient elution was applied as follows: a linear gradient from 5% A to 22% A over 6 min, followed by a return to the initial conditions within 9 min. The flow rate was set at 0.7 mL/min. Detection was performed at a wavelength of 245 nm, and quantification was carried out using the external standard method. The determinations were performed in triplicate for two parallel tests (n = 6).

2.2.4. Sensory Evaluation

Sensory evaluation was conducted by a 10-member evaluation panel in sensory assessment booths specifically prepared for the analysis. A structured 9-point hedonic scale was used, with boundary descriptors ranging from “undesirable” to “highly desirable.” The following sensory quality attributes were assessed: color, aroma, firmness (evaluated by touch), and overall appearance.

2.2.5. Radical Cation Scavenging Activity

Antioxidant activity determined by Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) was evaluated by means of the spectrophotometric method as well as the ABTS⁺ method (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical monocation scavenging activity was determined following a procedure described by Re et al. [31]. The amount of 0.007 mol/L water ABTS⁺ solution was mixed with 0.002 mol/L potassium persulphate solution at a 1:0.5 ratio. The prepared solution was left in the dark for 12–16 h at room temperature. Prior to measurements, the cation radical solution was diluted with a phosphate buffer (PBS) at pH 7.4. The buffer was added until the solution reached absorbance of 0.700 (±0.020). To determine antioxidant activity, an extract of polyphenolic compounds was prepared from fresh red pepper and LBP-coated red pepper (50 µL) was mixed with 5 mL diluted ABTS⁺ solution and its absorption was measured at 734 nm after 6 min at 30 °C, with a phosphate buffer used as a reference sample. The capacity of free radical scavenging was expressed as micromoles of Trolox per g of sample.

2.2.6. Statistical Analysis

The results are expressed as mean standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using Statistica 13.1 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) and Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Analysis of one-way and two-way variance (ANOVA) at $p < 0.05$ followed by the post-hoc Tukey test was applied. The relationships between variables were examined using the Pearson correlation coefficient.

3. Results and Discussion

3.1. Properties of Three Types of Kombucha and Kombucha–Chitosan Solutions

3.1.1. Total Phenolic (TPC) and Flavonoid (TFC) Content in Kombucha Solutions

Phenolic compounds contribute to the bioactive properties of kombucha, affecting its antioxidant and antimicrobial activities, among other things. Consequently, the total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in the three types of kombucha were analyzed, and the results are presented in Table 2.

Table 2. Total phenolic compounds and flavonoid content.

Symbol	TPC ($\mu\text{g GAeq/mL}$)	TFC ($\mu\text{g Qeq/mL}$)
C	135.00 ^c \pm 0.16	13.76 ^b \pm 1.68
LB	381.67 ^a \pm 0.05	21.05 ^a \pm 0.37
B	377.90 ^b \pm 0.08	14.28 ^b \pm 0.11

Values are mean \pm standard deviation; the different letters within a given parameter indicate a significant difference at $p < 0.05$ for the one-way ANOVA and Tukey post-hoc test means comparisons.

The obtained data showed that the highest total phenolic content (381.67 $\mu\text{g GAeq/mL}$) was characterized by kombucha obtained from lemon balm. Additionally, black tea kombucha contained high TPC (377.90 GAeq/mL), though it was statistically lower than in lemon balm kombucha. Literature data indicated that black tea showed a total phenolic content 137.5 $\mu\text{g GAeq/mL}$, which was lower than the value obtained for kombucha, at 234.1 $\mu\text{g GAeq/mL}$ [32]. These studies also suggested that the value of total phenolic content was dependent on the time of fermentation—the highest value (234.1 $\mu\text{g GAeq/mL}$) was recorded after a month of fermentation, while over time this value decreased and was, after 9 months, 80.8 $\mu\text{g GAeq/mL}$ [32]. A higher TPC (420 $\mu\text{g GAeq/mL}$) value for kombucha based on black tea was obtained in studies conducted by La Torre et al. [32], who carried out the fermentation process for 7 days. This is consistent with the conclusion that the length of fermentation significantly affects the total phenolic content, and that the TPC value decreased with the length of the fermentation process. Similar results have also been obtained by Shahbazi et al. [33], who examined the TPC in kombucha with the addition of plants with medicinal properties such as cinnamon or thyme, their obtained results also indicate a decrease in the TPC over time, which could be related with the acidity of the samples and the presence of enzymes. Moreover, studies have also shown that total phenolic content varies depending on the type of raw material used in the fermentation process [34].

The data obtained for the total flavonoid content exam showed that the highest TFC (21.05 $\mu\text{g Qeq/mL}$) was observed for kombucha obtained using lemon balm. Literature data showed that the TFC for kombucha based on black tea was 13 $\mu\text{g Qeq/mL}$, which is a value that is slightly lower than the results obtained in this research (14.28 $\mu\text{g Qeq/mL}$) [35]. Studies conducted by Shahbazi et al. [33] have shown that the TFC value depended on the raw materials used in the fermentation process but also on the time of its conduct. Unlike for TPC, in the case of TFC, an increase in the value with time could be observed, this is due to the numerous biotransformations that occur during the fermentation process, as

well as the stability of some flavonoids such as theaflavin and thearubigen, and the lower stability of e.g., epicatechin, as well as their variable content in the sample depending on the raw material which was used [33].

3.1.2. Antibacterial Properties of Kombucha–Chitosan Solutions

In order to assess the suitability of the three types of kombucha–chitosan solutions for further studies and to indicate which sample is characterized by the highest antibacterial activity, microbiological studies were conducted against selected strains of gram-positive and gram-negative bacteria which can cause food spoilage and additionally be a source of food poisoning. The results are presented in Table 3.

Table 3. Antibacterial activity of kombucha–chitosan solutions.

Symbol	Gram-Positive Strain		Gram-Negative Strains	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>
CS	12.97 ± 0.15	11.03 ± 0.15	12.06 ± 0.11	st
LBS	13.13 ± 0.15	11.10 ± 0.10	12.00 ± 0.10	11.93 ± 0.06
BS	st	st	10.13 ± 0.11	st

Diameter of the resulting zones of inhibition: 5–10 mm—weak activity; 11–14 mm—moderate activity; >14 mm—strong activity; st means weak static action.

The obtained results show that the broadest spectrum of activity against gram-negative and gram-positive bacteria was demonstrated by chitosan–lemon balm kombucha solution. The LBS sample showed moderate activity against bacteria such as *B. subtilis*, *E. coli*, including pathogenic *P. aeruginosa* and *S. enterica*. After its application, zones of complete inhibition of the growth of these bacteria were observed. In contrast, other samples showed only static activity against *S. enterica*, i.e., they only slightly reduced the intensity of their growth. Research conducted by Stefanowska et al. [21] showed that the antimicrobial activity of kombucha also depends on the type of raw material used in the fermentation process.

3.2. Properties of Lemon Balm Kombucha Films

For further studies, chitosan films were produced using three types of kombucha, the films obtained using black tea and chamomile-based kombucha did not allow for microbiological and mechanical tests.

Based on the results of the microbiological tests presented in Section 3.1.2 and the assessment of the suitability of the obtained films for further research, a chitosan film obtained using lemon balm-based kombucha was selected. The results of the tests on mechanical and barrier properties of the obtained film are presented in Figure 1.

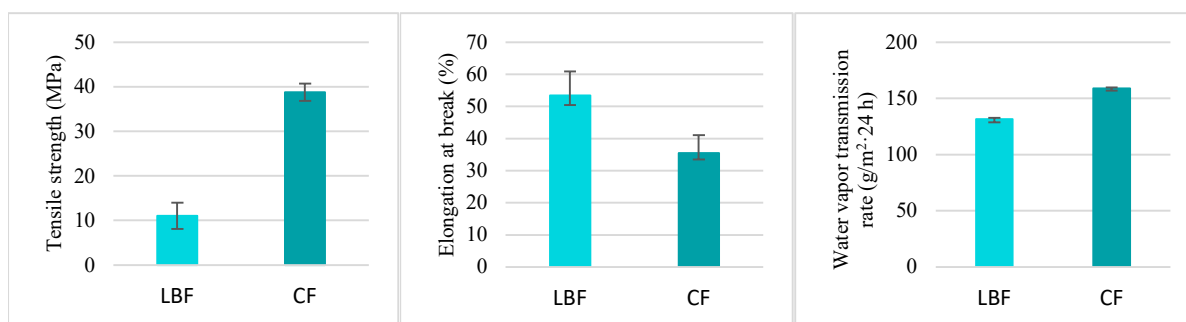


Figure 1. Comparison of mechanical and barrier properties of chitosan–kombucha films versus films produced using acetic acid.

The tensile strength (TS) value for the obtained chitosan film was 11.08 MPa, which is twice as high as the value of 4.89 MPa obtained for chitosan films produced using white tea-based kombucha, this value also exceeded the values obtained for chitosan films produced using black tea-based kombucha (3.82 MPa) and coffee-based kombucha (2.77 MPa) [21]. The obtained value is, however, much lower than in the case of the chitosan films produced using the commonly used acetic acid, for which the TS value was 38.80 MPa [27].

In the case of elongation at break (EB), the value obtained for the LBF sample was 53.45%. Literature data showed that EB values obtained for chitosan films produced using kombucha were lower, 24.46% for films based on white tea kombucha and 50.62% for films based on green tea kombucha [21]. A lower EB value (35.5%) was also noted for the film produced with acetic acid as a solvent [27]. Higher values were obtained for chitosan films produced using coffee-based kombucha, 74.5% [21], and for those produced with citric acid, 121.87% [27]. The obtained results and literature data show that the acidic solvent used, or, in the case of kombucha, the mutual proportions of acids present, affected parameters such as TS and EB, which determine the elasticity and strength of the obtained materials [21,27].

The result of the water vapor transmission rate (WVTR) study for the film based on kombucha produced from lemon balm was $131.84 \text{ g/m}^2 \cdot 24 \text{ h}$, which was slightly lower than in the study conducted by Stefanowska et al. [21], where the values obtained for chitosan films based on four different types of kombucha were in the range of 140.8 to $153.2 \text{ g/m}^2 \cdot 24 \text{ h}$. Literature data showed that the WVTR value for chitosan films produced using a traditional solvent, acetic acid, was $159.09 \text{ g/m}^2 \cdot 24 \text{ h}$, which is higher than in the case of the film with kombucha based on lemon balm [27].

3.3. Evaluation of the Quality of Red Pepper Coated with Chitosan–Lemon Balm Kombucha Solution

The quality assessment of control peppers (CP) and peppers coated with chitosan–lemon balm kombucha solution (LBS) was conducted based on the measurement of texture parameters, including skin strength and elasticity, sensory evaluation and ascorbic acid, as well as the antioxidant activity of the samples. Photographic documentation of the coated red bell peppers and the control sample on days 1 and 15 of storage is presented in Figure 2.

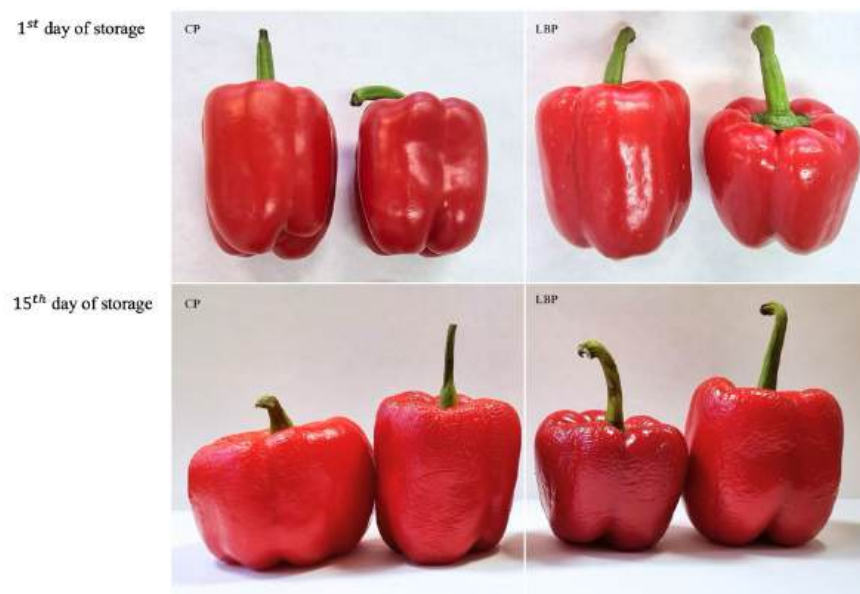


Figure 2. Photographic documentation of the coated red bell peppers and the control sample on days 1 and 15 of storage.

3.3.1. Texture Parameters

Texture parameters can serve as indicators of changes occurring during the storage of fresh peppers [36]. These changes were described using two parameters: skin strength and skin elasticity. The obtained results are presented in Table 4.

Table 4. Texture parameters of red bell pepper coated with chitosan–lemon balm kombucha solution and control pepper during 15 days of storage at 18 °C.

Day of Storage	CP	LBP
Skin Strength (N)		
1	8.55 ^a ± 0.8	11.3 ^c ± 1.2
5	10.3 ^b ± 0.9	9.8 ^b ± 0.7
10	7.63 ^a ± 0.7	9.9 ^b ± 1
15	10.5 ^{b,c} ± 0.9	10.7 ^{b,c} ± 0.9
Skin Elasticity * (mm)		
1	3.3 ^a ± 0.7	3.9 ^{a,b} ± 0.4
5	4.0 ^{a,b} ± 0.7	4.0 ^{a,b} ± 0.8
10	3.5 ^a ± 0.3	4.2 ^{b,c} ± 0.4
15	4.7 ^{c,d} ± 0.6	4.9 ^d ± 0.8

* Deflection distance of the sample until skin puncture. Values are mean ± standard deviation; the different letters within a given parameter indicate a significant difference at $p < 0.05$ for the two-way ANOVA and Tukey post-hoc test means comparisons.

The results indicate that skin strength in LBS peppers showed a significant increase of approximately 32% compared with CP. Up to the 10th day of storage, the applied coating improved skin strength; however, prolonged storage reduced the difference in parameter values to a statistically insignificant level. A similar trend was observed for skin elasticity, which exhibited higher values in coated samples (LBP) up to the 10th day of storage, which increased by approximately 18% on day 1 and around 20% on day 10. Considering that pepper wilting inherently led to a decrease in both parameters, the obtained results indicate a positive effect of the LBS coating on the overall quality of the peppers. Previous studies have indicated that lipid-based coatings derived from mineral oil, as well as protein–wax coatings applied to fruits and vegetables, including peppers, reduce skin damage during distribution and transportation, as well as storage-related injuries [37,38].

3.3.2. Sensory Evaluation

The sensory evaluation of LBS peppers showed comparable scores for the assessed attributes relative to the control sample. This included color desirability, color intensity, and overall appearance; however, for the latter attribute, a significantly higher score was recorded after 15 days of storage. The obtained results of sensory evaluation are presented in Table 5.

The aroma of the evaluated samples was rated more favorably in the uncoated peppers, as the LBS coating altered the typical pepper scent. In the case of the coated samples, the aroma, described as fermentative-sweet-sour, although not perceived as negative, differed from the typical scent of red bell peppers. Nevertheless, the obtained results indicate only minor differences in sensory quality between the LBP samples and the control group. Given the improvement in other quality parameters, such as texture properties and the content of bioactive compounds, this outcome appears fully acceptable, suggesting the potential effectiveness of the LBS coating for application on fruits and vegetables. In the study conducted by Nasrin et al. [39], which compared the sensory quality of red pepper coated with 1.5% and 2% chitosan solution to uncoated pepper after 9 days of storage, and

similar to the present study, the appearance and overall acceptability of the chitosan-coated samples were significantly higher compared with the control sample.

Table 5. Results of sensory evaluation of red bell pepper coated with chitosan–lemon balm kombucha solution (LBS) and control pepper (CP) during 15 days of storage at 18 °C.

Day of Storage	CP	LBP
Desirability of Color		
1	9.8 ^c ± 0.4	9.4 ^{b,c} ± 0.8
5	9.8 ^c ± 0.4	9.1 ^{a,b,c} ± 1.0
10	8.4 ^{a,b} ± 0.8	9.2 ^{a,b,c} ± 0.8
15	8.0 ^a ± 0.8	8.4 ^{a,b} ± 0.9
Color Intensity		
1	9.6 ^c ± 0.5	9.8 ^c ± 0.4
5	9.6 ^c ± 0.9	9.6 ^c ± 0.5
10	8.8 ^{a,b,c} ± 0.4	9.2 ^{b,c} ± 0.4
15	7.8 ^a ± 0.9	8.2 ^{a,b} ± 0.4
Aroma		
1	9.2 ^c ± 0.8	5.2 ^{a,b} ± 0.7
5	8.6 ^c ± 1.0	3.8 ^a ± 0.8
10	8.8 ^c ± 0.9	5.8 ^b ± 0.8
15	8.0 ^c ± 1.0	6.0 ^b ± 0.9
Overall Appearance		
1	9.2 ^e ± 0.9	8.8 ^{d,e} ± 0.9
5	7.8 ^{c,d,e} ± 1.0	7.6 ^{c,d} ± 1.0
10	6.0 ^{a,b} ± 1.0	5.4 ^{a,b} ± 0.9
15	4.8 ^a ± 0.8	6.6 ^{b,c} ± 0.8

Values are mean ± standard deviation; the different letters within a given parameter indicate a significant difference at $p < 0.05$ for the two-way ANOVA and Tukey post-hoc test means comparisons.

3.3.3. Ascorbic Acid Content

Peppers are an excellent source of ascorbic acid, with its content in pepper fruits ranging widely from 60 to 470 mg/100 g FW (fresh weight) [40–43]. However, it should be noted that the ascorbic acid content in peppers can vary depending on several factors, including variety, cultivation conditions, fruit ripeness, and storage conditions [40–43]. Therefore, it may serve as a key indicator of pepper quality. The obtained results of the ascorbic acid content analysis are presented in the Table 6.

Table 6. Content of ascorbic acid and antioxidant activity of red pepper coated with chitosan–lemon balm kombucha solution (LBS) and control red pepper (CP) during 15 days of storage at 18 °C.

Day of Storage	Ascorbic Acid Content (mg/100/g FM)		Antioxidant Activity (µmol of Trolox/g FM)	
	CP	LBP	CP	LBP
1	131.0 ^b ± 1.0	139.0 ^{b,c,d} ± 5.1	10.5 ^{c,d} ± 0.08	11.6 ^e ± 0.2
5	102.0 ^a ± 2.9	143.0 ^d ± 0.4	8.4 ^a ± 0.3	9.4 ^b ± 0.2
10	133.0 ^{b,c} ± 2.8	140.0 ^{c,d} ± 2.6	9.7 ^{b,c} ± 0.2	10.6 ^{c,d} ± 0.7
15	144.0 ^d ± 4.2	160.0 ^e ± 1.6	9.0 ^{a,b} ± 0.3	11.2 ^{d,e} ± 0.1

Values are mean ± standard deviation; the different letters within a given parameter indicate a significant difference at $p < 0.05$ for the two-way ANOVA and Tukey post-hoc test means comparisons.

In the conducted study, the ascorbic acid content in the CP sample was 131.7 mg/100 g FW, while in LBP it was approximately 5% higher. Lemon balm contains around 70 mg/100 g FW of ascorbic acid, therefore, lemon balm kombucha may also contain ascorbic acid, which could contribute to this difference [37]. During storage, the ascorbic acid content fluctuated in both samples, likely due to the natural variability of the pepper material. However, after 15 days of storage, the final ascorbic acid content in LBP was approximately 11% higher than in CP, a difference that was statistically significant. This suggests a beneficial effect of the applied coating in preserving ascorbic acid in peppers. Nasrin et al. [39] have also reported a beneficial effect of chitosan coating (1.5% and 2% solution) on the retention of ascorbic acid content in red pepper during 9 days of storage at 25 ± 2 °C compared with the uncoated control sample. However, the study demonstrated a decrease in ascorbic acid content after the 9th day of storage in both the control and coated samples. In the present study, the observed increase in ascorbic acid content may result from changes in sample mass during storage and the variability of the tested material.

The obtained results of the antioxidant activity are presented in Table 6. The conducted analyses of antioxidant activity demonstrated significantly higher values in the LBP samples compared with CP on days 1, 5, and 15 of storage. The increase in the analyzed parameter in the coated sample compared with the control was approximately 10% after 1, 5, and 10 days, and 24% after 15 days of storage. Moreover, a significant decrease in antioxidant activity was observed in CP after 15 days of storage compared with day 1, where in LBP, this value remained stable, with no significant decline after 15 days. No significant correlation was found between the antioxidant activity of the analyzed samples and their ascorbic acid content. Nevertheless, the higher value of the measured parameter in the LBP samples could be the result of the antioxidant activity of the coating itself [37]. However, the absence of a decline in this parameter during the storage of coated peppers appeared to be beneficial. Kumar et al. [44] reported a decrease in the antioxidant activity of bell pepper coated with a chitosan–pullulan (50:50) composite edible coating enriched with pomegranate peel extract and stored at 23 ± 3 °C. The reduction was approximately 35% in the coated sample and around 45% in the control sample. In the present study, the decrease in antioxidant activity was not statistically significant in the coated sample, amounting to 3.5%, where in the control sample, it was 14%, representing a statistically significant reduction. The antioxidant activity values of the pepper samples were consistent with literature data for red sweet pepper varieties [45,46].

4. Conclusions

This study demonstrates that lemon balm kombucha is an effective natural solvent for chitosan-based coatings, one that increases the shelf life of red bell peppers. In addition, kombucha from lemon balm was found to be a rich source of phenolic compounds and flavonoids. Microbiological studies have shown that the chitosan solution made with lemon balm kombucha was active against strains that are undesirable in food, such as *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. enterica*. The TS test of the chitosan film produced using lemon balm kombucha showed that the value of this parameter is twice as high as the value obtained for films commonly produced with acetic acid. Higher values were also recorded for the tested film in the EB test. However, in the WVTR test, the values obtained were slightly lower than those available in the literature data. Red bell peppers coated with LBS retained more ascorbic acid over time compared with the peppers from the control group, indicating better nutrient preservation. Sensory evaluation showed that the coating did not negatively affect the appearance or overall quality of the peppers. Studies have indicated that lemon balm kombucha can be an effective solvent for chitosan with additional properties resulting from the presence of biologically active substances. These

findings highlighted the potential of kombucha-based chitosan coatings as a sustainable alternative for food preservation, reducing the impact of storage on product quality and extending shelf life.

Author Contributions: Conceptualization, K.S.; methodology, K.S., M.W., A.S., R.B.-M. and R.D.; formal analysis, K.S., M.W., A.S., R.B.-M. and R.D.; writing—original draft preparation, K.S.; writing—review and editing, M.W., A.S., R.B.-M., R.D. and I.R.; supervision, I.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Barman, K.; Ahmad, M.S.; Siddiqui, M.W. Factors Affecting the Quality of Fruits and Vegetables: Recent Understandings. In *Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops*; Apple Academic Press: Pleasant, NJ, USA; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 23–72. [\[CrossRef\]](#)
2. Abdollahzadeh, E.; Nematollahi, A.; Hosseini, H. Composition of Antimicrobial Edible Films and Methods for Assessing Their Antimicrobial Activity: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *110*, 291–303. [\[CrossRef\]](#)
3. Kazemian-Bazkiaee, F.; Ebrahimi, A.; Hosseini, S.M.; Shojaee-Aliabadi, S.; Farhoodi, M.; Rahmatzadeh, B.; Sheikhi, Z. Evaluating the Protective Effect of Edible Coatings on Lipid Oxidation, Fatty Acid Composition, Aflatoxins Levels of Roasted Peanut Kernels. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 1025–1038. [\[CrossRef\]](#)
4. De Pilli, T. Development of a Vegetable Oil and Egg Proteins Edible Film to Replace Preservatives and Primary Packaging of Sweet Baked Goods. *Food Control* **2020**, *114*, 107273. [\[CrossRef\]](#)
5. Körge, K.; Bajić, M.; Likožar, B.; Novak, U. Active Chitosan-Chestnut Extract Films Used for Packaging and Storage of Fresh Pasta. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 3043–3052. [\[CrossRef\]](#)
6. Yousuf, B.; Qadri, O.S.; Srivastava, A.K. Recent Developments in Shelf-Life Extension of Fresh-Cut Fruits and Vegetables by Application of Different Edible Coatings: A Review. *LWT* **2018**, *89*, 198–209. [\[CrossRef\]](#)
7. Garcia, L.C.; Pereira, L.M.; De Luca Sarantópoulos, C.I.G.; Hubinger, M.D. Effect of Antimicrobial Starch Edible Coating on Shelf-Life of Fresh Strawberries. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, *25*, 413–425. [\[CrossRef\]](#)
8. Kumarihami, H.M.P.C.; Kim, Y.H.; Kwack, Y.B.; Kim, J.; Kim, J.G. Application of Chitosan as Edible Coating to Enhance Storability and Fruit Quality of Kiwifruit: A Review. *Sci. Hortic.* **2022**, *292*, 110647. [\[CrossRef\]](#)
9. Rohasmizah, H.; Azizah, M. Pectin-Based Edible Coatings and Nanoemulsion for the Preservation of Fruits and Vegetables: A Review. *Appl. Food Res.* **2022**, *2*, 100221. [\[CrossRef\]](#)
10. Moghadam, M.; Salami, M.; Mohammadian, M.; Khodadadi, M.; Emam-Djomeh, Z. Development of Antioxidant Edible Films Based on Mung Bean Protein Enriched with Pomegranate Peel. *Food Hydrocoll.* **2020**, *104*, 105735. [\[CrossRef\]](#)
11. Mohanty, B. Functionality of Protein-Based Edible Coating-Review. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2020**, *8*, 1432–1440.
12. Yousef, A.R.; Abd El-Moniem, E.A.; Sh Mahmoud, T.M. Edible Coating of Soy Protein or Gelatin as a Carrier of Thyme Oil for Maintaining Quality of “Barhee” Dates Fruits During Cold Storage. *Plant Arch.* **2020**, *20*, 9311–9322.
13. Yousuf, B.; Sun, Y.; Wu, S. Lipid and Lipid-Containing Composite Edible Coatings and Films. *Food Rev. Int.* **2022**, *38*, 574–597. [\[CrossRef\]](#)
14. Wang, H.; Ding, F.; Ma, L.; Zhang, Y. Edible Films from Chitosan-Gelatin: Physical Properties and Food Packaging Application. *Food Biosci.* **2021**, *40*, 100871. [\[CrossRef\]](#)
15. Amor, G.; Sabbah, M.; Caputo, L.; Idbella, M.; De Feo, V.; Porta, R.; Fechtali, T.; Mauriello, G. Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and Microencapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging. *Foods* **2021**, *10*, 121. [\[CrossRef\]](#)
16. Kumar, N.; Neeraj; Pratibha; Singla, M. Enhancement of Storage Life and Quality Maintenance of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Fruit Using Chitosan: Pullulan Blend Antimicrobial Edible Coating. *Int. J. Fruit Sci.* **2020**, *20*, S1662–S1680. [\[CrossRef\]](#)

17. Melo, N.F.C.B.; de Lima, M.A.B.; Stamford, T.L.M.; Galembeck, A.; Flores, M.A.P.; de Campos Takaki, G.M.; da Costa Medeiros, J.A.; Stamford-Arnaud, T.M.; Montenegro Stamford, T.C. In Vivo and in Vitro Antifungal Effect of Fungal Chitosan Nanocomposite Edible Coating against Strawberry Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 3381–3391. [[CrossRef](#)]
18. Melro, E.; Antunes, F.E.; da Silva, G.J.; Cruz, I.; Ramos, P.E.; Carvalho, F.; Alves, L. Chitosan Films in Food Applications. Tuning Film Properties by Changing Acidic Dissolution Conditions. *Polymers* **2020**, *13*, 1. [[CrossRef](#)]
19. Qiao, C.; Ma, X.; Wang, X.; Liu, L. Structure and Properties of Chitosan Films: Effect of the Type of Solvent Acid. *LWT* **2021**, *135*, 109984. [[CrossRef](#)]
20. Adımcılar, V.; Kalaycıoğlu, Z.; Akın-Evingür, G.; Torlak, E.; Erim, F.B. Comparative Physical, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Films Prepared by Dissolving Chitosan in Bioactive Vinegar Varieties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *242*, 124735. [[CrossRef](#)]
21. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Wąskiewicz, A.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. A New Approach to Obtain Chitosan Films—Characteristics of Films Prepared with Tea and Coffee Kombucha as Natural Chitosan Solvents. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *197*, 116634. [[CrossRef](#)]
22. de Miranda, J.F.; Ruiz, L.F.; Silva, C.B.; Uekane, T.M.; Silva, K.A.; Gonzalez, A.G.M.; Fernandes, F.F.; Lima, A.R. Kombucha: A Review of Substrates, Regulations, Composition, and Biological Properties. *J. Food Sci.* **2022**, *87*, 503–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Soares, I.F.; de Lima, M.A.; Lucarini, M.; Durazzo, A.; Arcanjo, D.D.R.; Lima, S.K.R.; da Silva, R.A. The Kombucha Ingestion Benefits on the Intestinal Microbiota. *Rend. Lincei Sci. Fis. Nat.* **2023**, *34*, 833–841. [[CrossRef](#)]
24. Massoud, R.; Khosravi, K.; Jafari-Dastjerdeh, R.; Naghavi, N.; Khosravi-Darani, K. All Aspects of Antioxidant Properties of Kombucha Drink. *Biointerface Rep. Appl. Chem.* **2022**, *12*, 4018–4027. [[CrossRef](#)]
25. Wang, X.; Wang, D.; Wang, H.; Jiao, S.; Wu, J.; Hou, Y.; Sun, J.; Yuan, J. Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Kombucha Tea by the Pure Cultured Kombucha. *LWT* **2022**, *168*, 113931. [[CrossRef](#)]
26. Vohra, B.M.; Fazry, S.; Sairi, F.; Babul-Airianah, O. Effects of Medium Variation and Fermentation Time on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Kombucha. *Malays. J. Fundam. Appl. Sci.* **2018**, *14*, 298–302. [[CrossRef](#)]
27. Stefanowska, K.; Woźniak, M.; Majka, J.; Sip, A.; Mrówczyńska, L.; Kozak, W.; Dobrucka, R.; Ratajczak, I. Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 12351. [[CrossRef](#)]
28. ISO 2528:2017; Sheet Materials—Determination of Water Vapour Transmission Rate (WVTR)—Gravimetric (Dish) Method. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017.
29. ASTM D882-12; Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2012. Available online: <https://www.astm.org/d0882-12.html> (accessed on 20 February 2024).
30. Howard, L.A.; Wong, A.D.; Perry, A.K.; Klein, B.P. β -Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 929–936. [[CrossRef](#)]
31. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
32. La Torre, C.; Fazio, A.; Caputo, P.; Plastina, P.; Caroleo, M.C.; Cannataro, R.; Cione, E. Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. *Molecules* **2021**, *26*, 5474. [[CrossRef](#)]
33. Shahbazi, H.; Hashemi Gahrue, H.; Golmakani, M.T.; Eskandari, M.H.; Movahedi, M. Effect of Medicinal Plant Type and Concentration on Physicochemical, Antioxidant, Antimicrobial, and Sensorial Properties of Kombucha. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 2568–2577. [[CrossRef](#)]
34. Teixeira Oliveira, J.; Machado da Costa, F.; Gonçalves da Silva, T.; Dotto Simões, G.; dos Santos Pereira, E.; Quevedo da Costa, P.; Andrezza, R.; Cavalheiro Schenkel, P.; Pieniz, S. Green Tea and Kombucha Characterization: Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Enzymatic Inhibition Potential. *Food Chem.* **2023**, *408*, 135206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ivanišová, E.; Meňhartová, K.; Terentjeva, M.; Godočiková, L.; Árvay, J.; Kačániová, M. Kombucha Tea Beverage: Microbiological Characteristic, Antioxidant Activity, and Phytochemical Composition. *Acta Aliment.* **2019**, *48*, 324–331. [[CrossRef](#)]
36. Liu, L.; Wei, Y.; Shi, F.; Liu, C.; Liu, X.; Ji, S. Intermittent Warming Improves Postharvest Quality of Bell Peppers and Reduces Chilling Injury. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *101*, 18–25. [[CrossRef](#)]
37. Kazimierczak, R.; Hallmann, E.; Sokołowska, O.; Rembiałkowska, E.; Kazimierczak, R.; Hallmann, E.; Sokołowska, O.; Rembiałkowska Sggw, E.; Nauk Żywieniu Człowieka Konsumpcji, W.; Żywności Ekologicznej, Z. Zawartość Związków Bioaktywnych w Roślinach Zielarskich z Uprawy Ekologicznej i Konwencjonalnej. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* **2011**, *56*, 200–205.
38. Kowalczyk, D.; Pikula, E. Wpływ Jadalnej Powłoki Białkowo-Woskowej Na Jakość Przechowalniczą Winogron (*Vitis Vinifera* L.). *Żywność Nauka Technol. Jakość* **2010**, *17*, 67–76.
39. Nasrin, T.A.A.; Rahman, M.A.; Islam, M.N.; Arfin, M.S.; Akter, L. Effect of Edible Coating on Postharvest Quality of Bell Pepper at Ambient Storage. *Bull. Inst. Trop. Agric.* **2018**, *41*, 73–83. [[CrossRef](#)]
40. Navarro, J.M.; Flores, P.; Garrido, C.; Martinez, V. Changes in the Contents of Antioxidant Compounds in Pepper Fruits at Different Ripening Stages, as Affected by Salinity. *Food Chem.* **2006**, *96*, 66–73. [[CrossRef](#)]

41. Chilczuk, B.; Staszowska-Karkut, M.; Materska, M.; Michałojć, Z. Zmiany Zawartości Witaminy C w Owocach Czterech Odmian Papryki-Chłodzonych, Mrożonych i Liofilizowanych w Zależności Od Okresu Przechowywania. *Żywność Nauka Technol. Jakość* **2019**, *26*, 56–66. [[CrossRef](#)]
42. Davey, M.; Van Montagu, M.; Inze, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.J.; Strain, J.J.; Favell, D.; Fletcher, J. Plant L-Ascorbic Acid: Chemistry, Function, Metabolism, Bioavailability and Effects of Processing. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 825–860.
43. Surma-Zadora, M.; Cieślik, E.; Grzych-Tuleja, E.; Bodzioch, A. Próba Znalezienia Współzależności Pomiedzy Zawartością Witaminy C a Barwą. *Bromatol. Chem. Toksykol.* **2011**, *44*, 17–24.
44. Kumar, N.; Pratibha; Neeraj; Ojha, A.; Upadhyay, A.; Singh, R.; Kumar, S. Effect of Active Chitosan-Pullulan Composite Edible Coating Enrich with Pomegranate Peel Extract on the Storage Quality of Green Bell Pepper. *LWT* **2021**, *138*, 110435. [[CrossRef](#)]
45. Sim, K.H.; Sil, H.Y. Antioxidant Activities of Red Pepper (*Capsicum Annuum*) Pericarp and Seed Extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1813–1823. [[CrossRef](#)]
46. Hamed, M.; Kalita, D.; Bartolo, M.E.; Jayanty, S.S. Capsaicinoids, Polyphenols and Antioxidant Activities of *Capsicum Annuum*: Comparative Study of the Effect of Ripening Stage and Cooking Methods. *Antioxidants* **2019**, *8*, 364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Karolina Stefanowska

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.: „Biodegradowalne polisacharydowe materiały kompozytowe z wypełniaczami lignocelulozowymi oraz dodatkiem produktów naturalnych” napisałam samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data 12.05.2025

K. Stefanowska

podpis autora rozprawy

prof. dr hab. inż. Izabela Ratajczak
dr hab. Renata Dobrucka, prof. UEP
dr Magdalena Woźniak – promotor pomocniczy

imię i nazwisko ~~promotora~~ / promotorów / promotora pomocniczego

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Biodegradowalne polisacharydowe materiały kompozytowe z napełniaczami lignocelulozowymi oraz dodatkiem produktów naturalnych”, została przygotowana pod ~~moim~~ naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 12.05.2025

Podpis promotora rozprawy

Two handwritten signatures in blue ink. The top signature is 'Izabela Ratajczak' and the bottom signature is 'Renata Dobrucka'.

Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy

A handwritten signature in blue ink that reads 'Magdalena Woźniak'.

Karolina Stefanowska
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Bucher M., Reichert C.L., Sip A., Woźniak M., Schmid M., Dobrucka R., Ratajczak I., 2024, Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. Industrial Crops and Products 219, 119112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu.

Data

14.05.2025

Podpis

K. Stefanowska

Attachment 2

Matthias Bucher

Albstadt-Sigmaringen University, Faculty of Life Sciences, Sustainable Packaging Institute
SPI, Anton-Günther-Strasse 51, Sigmaringen 72488, Germany

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: Stefanowska, K., Bucher, M., Reichert, C.L., Sip, A., Woźniak, M., Schmid, M., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2024. *Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials*. Industrial Crops and Products 219, 119112, my individual contribution to it is conducting tests on the characterization of the obtained chitosan-based films: barrier properties, surface free energy and co-participation in the development of the results.

Date 08.01.2025.....

.....
Matthias Bucher
signature

Attachment 2

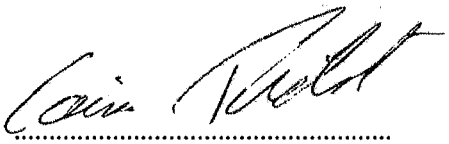
Corina L. Reichert

Albstadt-Sigmaringen University, Faculty of Life Sciences, Sustainable Packaging Institute
SPI, Anton-Günther-Strasse 51, Sigmaringen 72488, Germany

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: Stefanowska, K., Bucher, M., Reichert, C.L., Sip, A., Woźniak, M., Schmid, M., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2024. *Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials*. Industrial Crops and Products 219, 119112, my individual contribution to it is conducting tests on the characterization of the obtained chitosan-based films: barrier properties, surface free energy and co-participation in the development of results.

Date .02.01.2025.....



.....
signature

Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Bucher M., Reichert C.L., Sip A., Woźniak M., Schmid M., Dobrucka R., Ratajczak I., 2024, Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. Industrial Crops and Products 219, 119112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

17.04.2025
.....

Podpis

A. Sip
.....

Magdalena Woźniak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Bucher M., Reichert C.L., Sip A., Woźniak M., Schmid M., Dobrucka R., Ratajczak I., 2024, Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. Industrial Crops and Products 219, 119112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych oraz na opracowaniu manuskryptu.

Data

8.05.2025

Podpis

Magdalena Woźniak

Attachment 2

Markus Schmid

Albstadt-Sigmaringen University, Faculty of Life Sciences, Sustainable Packaging Institute
SPI, Anton-Günther-Strasse 51, Sigmaringen 72488, Germany

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: Stefanowska, K., Bucher, M., Reichert, C.L., Sip, A., Woźniak, M., Schmid, M., Dobrucka, R., Ratajczak, I., 2024. *Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials*. Industrial Crops and Products 219, 119112, my individual contribution to it was to scientifically interpret the test results on the characterization of the obtained chitosan-based films: barrier properties, surface free energy.

Date 18.12.2024



signature

Renata Dobrucka
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Bucher M., Reichert C.L., Sip A., Woźniak M., Schmid M., Dobrucka R., Ratajczak I., 2024, Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. Industrial Crops and Products 219, 119112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

08.05.2024 r.

Podpis

Renata Dobrucka

Izabela Ratajczak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

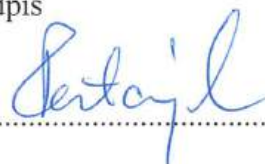
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Bucher M., Reichert C.L., Sip A., Woźniak M., Schmid M., Dobrucka R., Ratajczak I., 2024, Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. Industrial Crops and Products 219, 119112 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

5.05.2025

Podpis



Karolina Stefanowska
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu oraz na przygotowaniu grafik.

Data

14.05.2025

Podpis

K. Stefanowska

Magdalena Woźniak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, recenzji i edycji manuskryptu.

Data

8.05-2023

Podpis

Magdalena Woźniak

Jerzy Majka
Katedra Nauki o Drewnie i Techniki Ciepłej,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 38/42, 60637 Poznań, Polska

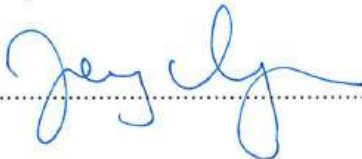
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Stefanowska K., Woźniak M., Majka, J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej oraz na opracowaniu grafik.

Data

11. IV. 2023r.
.....

Podpis


.....

Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

17.04.2025

Podpis

Anna Sip

Lucyna Mrówczyńska
Katedra Biologii Komórki,
Wydział Biologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Uniwersytet Poznański 6, 61614 Poznań, Polska

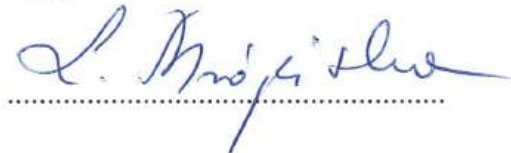
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

07-05-2025
.....

Podpis


.....

Wojciech Kozak
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

13.05.2025r.
.....

Podpis

Wojciech Kozak
.....

Renata Dobrucka
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

08.05.2024r.

Podpis


.....

Izabela Ratajczak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, Chitosan Films with Caffeine and Propolis as Promising and Ecofriendly Packaging Materials. Applied Sciences, Vol. 13, 12351 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

5.05.2025

Podpis



Karolina Stefanowska
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., 2025, Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. Polymers 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu, recenzji i edycji manuskryptu oraz na przygotowaniu grafik.

Data

14.05.2025.....

Podpis

K. Stefanowska.....

Magdalena Woźniak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., 2025, Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. Polymers 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, recenzji i edycji manuskryptu.

Data

08.05.2025.....

Podpis

Magdalena Woźniak.....

Renata Dobrucka
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., 2025, Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. Polymers 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, zbieraniu danych oraz opiece merytorycznej.

Data

08.05.2025 r.

Podpis

Renata Dobrucka

Anna Sip

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Polska

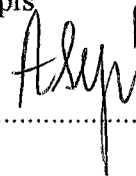
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., 2025, Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. *Polymers* 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz zebraniu danych.

Data

17.04.2025

Podpis



Lucyna Mrówczyńska
Zakład Biologii Komórki,
Wydział Biologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., 2025, Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. *Polymers* 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: opracowaniu metod badawczych oraz zbieraniu danych.

Data

14.05.2025

Podpis

Lucyna Mrówczyńska

Agnieszka Waśkiewicz
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., Fruit vinegars as natural and bioactive chitosan solvents in the production of chitosan-based films. Polymers 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz na zbieraniu danych.

Data

7/05/2018

Podpis

Walimier

Izabela Ratajczak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska


Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Dobrucka R., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Ratajczak I., Polymers 17, 11 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz opiece merytorycznej.

Data

5.05.2025

Podpis



Karolina Stefanowska
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, zbieraniu danych oraz na przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu.

Data

14.05.2025

Podpis

K. Stefanowska

Magdalena Woźniak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych oraz na opracowaniu manuskryptu.

Data

8.05.2025

Podpis

Magdalena Woźniak

Jerzy Majka
Katedra Nauki o Drewnie i Techniki Ciepłej,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 38/42, 60637 Poznań, Polska


Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

11.11.2025r.

Podpis



Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

17.04.2025

Podpis

A. Sip

Lucyna Mrówczyńska
Katedra Biologii Komórki,
Wydział Biologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Uniwersytet Poznański 6, 61614 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

07.04.2025
.....

Podpis


.....

Wojciech Kozak
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: opracowaniu metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

13.05.2025r.

Podpis

Wojciech Kozak

Agnieszka Waśkiewicz
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak, I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowanie metod badawczych oraz analizie formalnej.

Data

7/05/2025

Podpis

Walucian

Renata Dobrucka
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

08.06.2023r.

Podpis

Renata Dobrucka

Izabela Ratajczak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Majka J., Sip A., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Kozak W., Dobrucka R., Ratajczak I., 2023, A new approach to obtain chitosan films – Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents. Industrial Crops and Products 197, 116634 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji oraz opiece merytorycznej.

Data

5.05.2025

Podpis



Karolina Stefanowska
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej oraz na przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu.

Data

14.05.2025

Podpis

K. Stefanowska

Magdalena Woźniak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej, recenzji i edycji manuskryptu.

Data

8.05. 2025

Podpis

Magdalena Woźniak

Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej oraz na recenzji i edycji manuskryptu.

Data

17,04, 2025

Podpis

A. Sip

Róża Biegańska-Marecik
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej oraz na recenzji i edycji manuskryptu.

Data

11.04.2025

Podpis

R. Biegańska-Marecik

Renata Dobrucka
Katedra Jakości Produktów Przemysłowych i Opakowań,
Instytut Nauk o Jakości,
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu,
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metod badawczych, analizie formalnej oraz na recenzji i edycji manuskryptu.

Data

08.05.2025r.

Podpis

Renata Dobrucka

Izabela Ratajczak
Katedra Chemii,
Wydział Leśny i Technologii Drewna,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Stefanowska K., Woźniak M., Sip A., Biegańska-Marecik R., Dobrucka R., Ratajczak I., 2025, Kombucha as a Solvent for Chitosan Coatings: A New Strategy to Extend Shelf Life of Red Peppers. Materials, Vol. 18, 1605 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji i edycji manuskryptu oraz opiece merytorycznej.

Data

5.05.2025

Podpis

Izabela Ratajczak