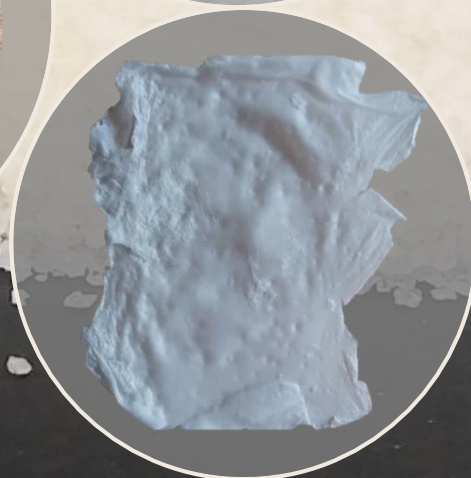
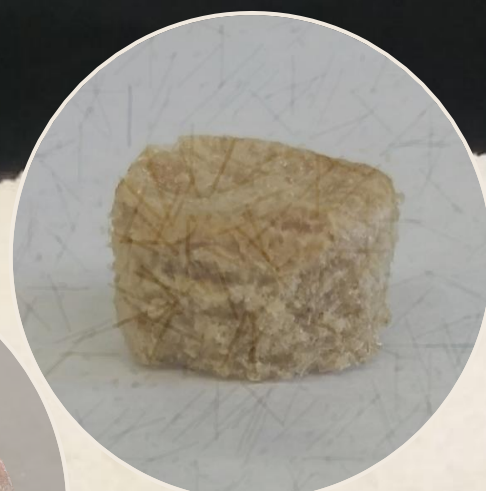
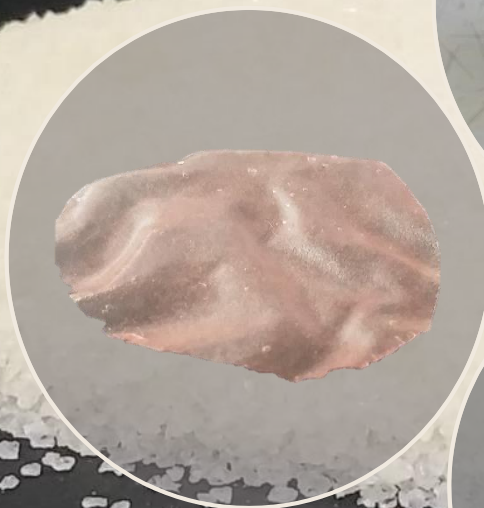


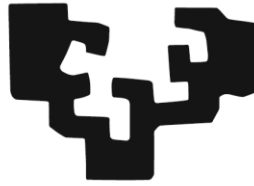
BIO-OINARRITUTAKO MATERIALEN DISEINUA ELIKAGAI INDUSTRIAKO HONDAKINAK ERABILIZ

Jone Uranga Gama

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren
Ingeniaritza Saila



eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Bio-oinarritutako materialen diseinua elikagai industriako hondakinak erabiliz

Jone Uranga Gama

Tesi zuzendariak: Koro de la Caba & Pedro Guerrero

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila

Donostia-San Sebastián, 2020

Nigan sinestu dutenei,

Badira bihotz txikietan handiak diren ametsak, lortuko diren ametsak.

Libre ta zabal dugu aurrean, baina ezin dugu edan.

Zauriak gatzez itxi ditzagun, malkoak urez eraso.

~Benito Lertxundi~

Esker onak

Bidaia batetan garrantzitsuena ez da helmuga izaten, ibilbideak dotoretzen du bidaia, izandako esperientziek, ikasitako lezio guztiek eta ondoan edukitako lagun zahar zein berriek. Beraz, tartetxo hau nire ikerkuntza bidaia dotoretzea, osatzea eta nola ez, erraztea, lortu duten guztiei nire eskerrak eskaintzeko erabili nahiko nuke.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis Koro de la Caba y Pedro Guerrero por haberme ofrecido la oportunidad de poder trabajar con ellos. Desde que comencé con vosotros el trabajo fin de grado, me disteis impulso para poder creer que el trabajo de un investigador, aunque muchas veces no salga como uno quiere, siempre vale para aprender, aportar y evolucionar. Este camino juntos ha sido un aprendizaje constante y esta tesis ha sido posible gracias a vuestra dedicación, constancia, vuestras sugerencias, correcciones...a vuestro trabajo.

I would also like to thank Maria Letizia Focarete, for offering me the mobility opportunity in their group in Bologna and leading me working with electrospinning. There will come a time you will plug yourself into electricity... Moreover, my special thanks to Giacomo Ciamician lab colleagues and Silvia Panzavolta for the unconditional aid supported. Grazie mille per tutto.

No puedo dejar sin agradecer a Maite Dueñas y a Ana Isabel Puertas. La estancia en la facultad de química me enseñó que el mundo de los “bichos” es tan bonito como difícil. Gracias por hacer que lo difícil fuera entretenido en vuestra compañía.

Eusko Jaurlaritzak doktorego-tesia burutzeko (PRE_2015_1_0205) emandako diru-laguntza eta ikerketa egonaldia egiteko luzatutako beka (EP_2018_1_0050) ere eskertu nahiko nituzke. Biomat ikerketa taldeari (GIU18/154) baita, eskerrak emandako babes ekonomikoagatik. UPV/EHU-ko SGIker ikerkuntza zerbitzu orokorrak ere eskertu nahiko nituzke.

Amaitzeko, ibilbide honetan uneoro laguntzen jardun dutenei NIRE ESKERRAK. Laborategiko kide lagunei, edozertarako laguntzeko prest beti egon zareten horiei. Mila esker bidea errazten laguntzeagatik bene-benetan. Beste herrialdeetatik etorri eta kultura eta lan egiteko modu berriez irakatsi didazuen horiei ere bai, nire ezagutzak aberastea lortu duzue. Lagunei, zuen jakinminak eta animuak ezinbestekoak izan dira ibilbide honetan. Nola ez, Ugaitzi, nire ondoan momentu onak ospatzen zein txarrak samurtzen egoteagatik, nigan sinesteagatik. Eskerrak bihotz bihotzez. Eta azkenik, nigan itsuki sinestu duten horiei, familiakoei. Eta bereziki amari, emandako indar guztiari esker nigan sinesten laguntzeagatik.

Laburpena

Plastikozko materialak dituzten propietate funtzionalei esker erabilgarriak dira hainbat aplikaziotan, esaterako elikagai industrian eta industria farmazeutikoan. Aipatutako propietate funtzional horien artean erresistentzia kimikoa eta mekanikoa aurki daitezke. Halere, plastikozko materialek jatorri ez-berriztagarria dute eta euren erabilera osteko tratamenduek ingurumenean arazoak sortzen dituzte, batik bat, denbora labur baterako edota erabilera bakar bat duten aplikazioetan erabiltzen direnean. Beraz, ez-biodegradagarriak eta ez-berriztagarriak diren material hauen erabilera murrizteko, ikerketak material alternatiboetara zuzentzea beharrezkoa da. Testuinguru honetan, biomasatik eratorritako polimeroen erabilera, esaterako, proteinena eta polisakaridoena, asko handitu da azken urteetan. Gorakada hau batik bat polimero horiek dituzten ezaugarri aipagarriengatik gertatu da: filmak sortzeko duten gaitasuna, biobateragarritasuna eta biodegradagarri izaera kontuan hartuta. Proteinen artean, bere ugartasunagatik gelatina da erabiliena. Biopolimero hau kolagenoaren hidrolisitik lortzen da, eta kolagenoa ehun konektiboetako egitura-proteina nagusia da. Zehazki arrain-gelatina, arrainen hezur, azal, ezkata eta tendoietatik erauz daiteke, elikagaien prozesatzean sortutako hondakinen balioztatzea sustatuz. Hortaz, tesi honen xede nagusia arrain-gelatinan oinarritutako material berriak prestatzea eta karakterizatzea da, horretarako hainbat prozesatze metodo eta gehigarri erabiliz. Erantsitako sustantzia horietako batzuk biohondakinetatik erauziak izan dira.

Lan hau bederatzi kapituluz dago osatua. 1. kapitulua biohondakinen balioztatzearen zein proteinazko materialetan gaur egun erabiltzen diren prozesatze metodoen eta aplikazioen ikuspegi orokorra da. Bertan elikagaien iraungitzea luzatzeko erabiltzen diren gelatinan oinarritutako materialak azpimarratu dira. Segidan, 2. kapituluan, erabilitako materialak eta erreaktiboak, zenbait elikagaien prozesatzean sortutako hondakinen balioztatzea bultzatzeko baliatutako erauzketa metodoak,

gelatinazko produktuak prestatzeko erabilitako teknikak eta ikerketa lan honetan burututako karakterizazio metodoak deskribatu dira.

Arrain-gelatinazko materialak prestatzeko hainbat prozesatze metodo erabili dira doktorego-tesi honetan. Gelatinaren elektroharikatzea erronka handia da eta hau 3. kapituluan aztertu da. Horrela, gelatinaren elektroharikatzeak suposatzen dituen zailtasunei aurre egin eta elektroharikatzeko gai diren soluzio aproposak aukeratzeko, arrain-gelatina/azido zitriko soluzioen neurketa erreologikoak burutu dira. Kapitulu honetan pH azidoak gelatinaren eta azidoaren arteko erreakzioa oztopatzen duela ikusi denez, 4. kapituluan pH basikoarekin lan egin da, disoluzio metodoaren bidez prestatutako gelatinazko filmetan saretzea sustatu eta propietateak hobetzeko. Gainera, film hauen ingurumen azterketa ere egin da.

Ondorengo kapituluetan disoluzio metodoaren, konpresio bidezko moldaketaren edo liofilizazioaren bidez prestatutako ontziratze aktibo edota adimendunetarako erabilgarriak diren materialak deskribatu dira. Horrela, 5. kapituluan disoluzio metodoaren bidez prestatutako filmen bakterioen aurkako aktibitatean eta propietate funtzionaletan azido zitrikoak eta kitosanoak duten efektu konbinatua aztertu da. Bakterioen aurkako eragileekin batera mota askotako konposatu antioxidatzaileak erabiltzen dira elikagaiak ontziratze materialak. Testuinguru honetan, 6. kapituluan elikagaien prozesatzean sortutako aza more hondakinetatik erauzitako antioxidatzaileak diren antozianinak aztertu dira. Gainera, konpresio bidezko moldaketa erabiliz antozianinak dituzten arrain-gelatinazko filmak prestatu dira eta material hauen analisi sakon bat egin da. 7. kapituluan liofilizazio bidez prestatutako arrain-gelatinazko laginak, sendotze eragile gisa txibia lumetatik erauzitako kitina dutenak, etsaminatu dira; hauei tetrahidrokurkumina (THC) ere gehitu zaie antioxidatzaile eramaile modura lan egiteko.

Azkenik, 8. kapituluan doktoretza-tesi honen ondorio orokorrak laburtu dira eta 9. kapituluan ikerketa lan honetan zehar aipatutako erreferentziak zerrendatu dira.

Helburuak

Doktorego-tesi honen helburu orokorra hainbat prozesatze metodoen bitartez propietate hobetuak dituzten arrain-gelatinan oinarritutako materialak prestatzea da.

Ikerlan honen helburu zehatzak, berriz, honakoak dira:

- ◆ Arrain-gelatinan oinarritutako materialen propietate funtzionalak analizatzea eta gelatinaren eta azido zitrikoaren arteko erreakzioa aztertzea.
- ◆ Gelatina sareak lortzeko elektrohariketako parametroak optimizatzea.
- ◆ Antozianinak eta kitina lortzeko elikagai industriako zenbait biohondakin balioztatzea eta hauek arrain-gelatinan oinarritutako materialetan duten eragina aztertzea.
- ◆ Arrain-gelatinan oinarritutako filmen ekoizpenean eta kitinaren erauzketa prozesuan ingurumenarekin erlazionatuta dauden alderdiak ebaluatzea.
- ◆ Azido zitriko, kitosano, antozianina eta tetrahidrokurkumina bioaktiboen portaera aztertzea: askapena, aktibitate antioxidatzailea edo bakterioen aurkako aktibitatea.

Aurkibidea

1 Sarrera.....	1
1.1 Laburpena	3
1.2 Hondakinen balioztatzea	5
1.3 Proteinazko produktuak sortzeko teknikak.....	8
1.3.1 Disoluzio metodoa	9
1.3.2 Konpresio bidezko moldaketa	12
1.3.3 Elektrohriketa.....	14
1.3.4 Liofilizazioa	18
1.3.5 3D inprimaketa.....	21
1.4 Gelatinan oinarritutako materialen aplikazioak.....	23
1.5 Etorkizuneko ikuspegia eta ondorio nagusiak.....	27
2 Materialak eta metodoak.....	31
2.1 Materialak eta erreaktiboak	33
2.2 Antozianinen erauzketa	34
2.3 Kitinaren erauzketa	35
2.4 Sareen, filmen eta liofilizatutako laginen prestaketa	35
2.4.1 Elektrohriketa.....	35
2.4.2 Disoluzio metodoa	36
2.4.3 Konpresio bidezko moldaketa	38
2.4.4 Liofilizazioa	38
2.5 Ebaluazio erreologikoa	39
2.6 Gainazalaren eta egituraren karakterizazioa	39
2.6.1 Mikroskopia optikoa (OM)	39
2.6.2 Ekorketazko elektro-mikroskopia (SEM).....	39
2.6.3 Angelu zabalen X izpien difrakzioa (WXR)D)	40
2.7 Karakterizazio fisiko-kimikoa	40
2.7.1 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)	40
2.7.2 Saretze hedadura	40

2.7.3 Hezetasun edukia (MC) eta disolbaturiko masa totala (TSM).....	41
2.7.4 Puzte gaitasunaren neurketak.....	41
2.8 Karakterizazio termikoa	42
2.8.1 Analisi termograbitmetrikoa (TGA)	42
2.8.2 Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC).....	42
2.9 Propietate optikoak.....	42
2.9.1 Kolore-neurketak.....	42
2.9.2 Distira-neurketak.....	43
2.9.3 Ultramore-ikuskor (UV-vis) espektroskopia	43
2.10 Hesi-propietateak eta hezetasun absortzioa	43
2.10.1 Ur-ukipen angelua (WCA)	43
2.10.2 Ur lurrunaren iragazkortasuna (WVP)	43
2.10.3 Hezetasun absortzioaren zinetika	44
2.11 Propietate mekanikoak	45
2.11.1 Trakzio entsegua	45
2.11.2 Konpresio entsegua	45
2.12 Bakterioen aurkako analisisia.....	46
2.13 Antozianinen karakterizazioa UHPLC-Q-TOF-MS/MS analisi bidez.....	46
2.14 Bioaktiboen askatzea	48
2.15 Aktibitate antioxidatzailea: DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea	48
2.16 Ingurumen azterketa.....	49
2.17 Analisi estatistikoa	50
3 Elektroharikatutako arrain-gelatina sareak	51
3.1 Laburpena	53
3.2 Emaitzak eta eztabaida	54
3.2.1 Arrain-gelatinaren elektrohariketa	54
3.2.2 Elektroharikatutako gelatinazko sareen karakterizazioa	56
3.3 Ondorioak.....	62
4 Azido zitrikoarekin saretutako arrain-gelatinazko filmak	65

4.1	Laburpena	67
4.2	Emaitzak eta eztabaida	67
4.2.1	Propietate fisiko-kimikoak	67
4.2.2	Propietate optikoak	72
4.2.3	Hesi-propietateak.....	73
4.2.4	Propietate mekanikoak	74
4.2.5	Ingurumen azterketa	75
4.3	Ondorioak.....	77
5	Arrain-gelatina/kitosano konposite filmak	79
5.1	Laburpena	81
5.2	Emaitzak eta eztabaida	82
5.2.1	Propietate fisiko-kimikoak	82
5.2.2	Propietate termikoak	87
5.2.3	Propietate optikoak	90
5.2.4	Argiarekiko hesi-propietateak eta propietate mekanikoak	91
5.2.5	Bakterioen aurkako analisisa	93
5.3	Ondorioak.....	94
6	Konpresio bidez moldatutako antozianinadun arrain-gelatinazko filmak.....	97
6.1	Laburpena	99
6.2	Emaitzak eta eztabaida	100
6.2.1	Antozianinen karakterizazio kualitatiboa	100
6.2.2	Filmen propietate morfologikoak	103
6.2.3	Filmen propietate optikoak	103
6.2.4	Hesi-propietateak eta propietate mekanikoak	104
6.2.5	Antioxidatzailearen askatzea eta filmen aktibitate antioxidatzailea	105
6.3	Ondorioak.....	107
7	Kitina eta THC gehituta dituzten liofilizatutako arrain-gelatinazko materialak	109
7.1	Laburpena	111
7.2	Emaitzak eta eztabaida	112

7.2.1 Kitina erauzketaren ingurumen azterketa.....	112
7.2.2 Propietate fisiko-kimikoak	115
7.2.3 Laginen morfologia eta porositatea	117
7.2.4 Hezetasun absortzioa	119
7.2.5 Portaera mekanikoa.....	121
7.2.6 Puzte portaera	122
7.2.7 THC-aren askatzea.....	123
7.3 Ondorioak.....	124
8 Ondorio orokorrak.....	125
9 Erreferentziak	129

1.1 Laburpena

Biohondakinak industrializatutako herrialdeetan kezka nagusienetako bat dira. Izan ere elikagai hondakinak ez dira arazo ekonomiko bat bakarrik, baita gai etiko eta ingurumen-kontu bat ere, baliabide naturalen zarrastelkeria suposatzen baitute. Beraz, elikagai hondarrak saihestu eta gutxitzeko elikagai katean zehar ekoizleetatik xehekari eta kontsumitzaileetara hainbat faktore kontuan hartu behar dira (Guerrero et al., 2015; Mirabella et al., 2014). Horrela, azken urteetan hondakinetatik eratorritako polimeroen erabilera asko handitu da. Horien artean aurki daitezke elikagaiak prozesatzeko industriatik, esaterako, arrainen kontserbetatik, otarrain industriatik eta lehorreratutako arrainetatik sortutako biohondakinak.

Biopolimeroen artean proteinei eta polisakaridoei, bakarka edo elkartuta, arreta berezia eskaini zaie filmen eta biomaterialen produkzioan (Chiralt et al., 2018; Costa et al., 2018; Lin et al., 2015). Proteinei dagokionez, heteropolimero hauek monomero mota bat baino gehiagoz osatuta daude eta askotariko talde funtzionalak dituzte, zeinek hainbat indarren laguntzaz proteinak eurekiko tolestea sustatzen duten. Aipatutako indarrak disulfuro zubiak edota elkarrekintza hidrofobiko zein hidrofilikoa izan daitezke eta horiei esker proteina globularrak edo haritsuak lor daitezke (Balcão & Vila, 2015; Gudipati, 2013). Proteinek elikagaiak ontziratzeke produktuak sortzeko propietate baliotsuak azaltzen dituzte, izan ere, ugariak dira, filmak sortzeko gaitasuna dute, gardenak dira eta O_2 , CO_2 eta lipidoekiko sekulako hesi propietateak dituzte (Lacroix & Vu, 2014). Oxigenoarekiko iragazkortasun baxua izateak adibidez, baldintza anaerobikorik sortu gabe elikagaien iraungitzea luzatzeko aukera ematen du. Proteinak biomaterial moduan erabiltzeari dagokionez, aipatzekoa da proteinak matrize extrazelularrean zati esanguratsua osatzen dutela, zeina zelulen portaeran eginkizun aktiboa duen edozein ehunen ezinbesteko osagaia den. Biobateragarritasunaz gain, proteinek orokorrean izaera hidrofilikoa, immunogenizitate baxua eta biodegradagarritasuna azaltzen dute, *in vivo* aplikazioetan gorputz arrotzarekiko

erreakzioak saihestu daitezkeelarik. Beraz, proteinetan oinarritutako materialak askotan erabili izan dira ehun-ingeniaritzan, bioaktiboen/farmakoen askapen sistemetan, eta zaurientzako bendetan, konposatu aktiboak modu kontrolatuan askatzen diren bitartean zelulen itsaspen eta hazkunderako aldi baterako matrize extrazelular diren biomaterialetan (Barbosa & Martins, 2018). Aipatu bezala, proteinak hainbat talde funtzional dituzten heteropolimeroak dira eta beraz, proteinetan oinarritutako materialen propietateak eraldaketa entzimatico, kimiko edota fisikoak eginez elikagaien ontziratzeetan eta biomedikuntzako aplikazioetan beharrezkoak diren ezaugarrietara egokitu daitezke (Hammann & Schmid, 2014).

Aipatzekoa da, proteinetan oinarritutako produktuak biologikoki aktiboak diren hainbat konposaturen eramaile bikainak direla (Gudipati, 2013). Horrela, konposatu bioaktiboen onurak kontuan hartuta, elikagaien ontziratzean eta biomedikuntzako aplikazioetan potentzial handia izan dezaketen material biopolimerikoak sortzeko aukera berriak ireki dira (Chen et al., 2017; Lau et al., 2017; Yu et al., 2018). Proteinak konposatu bioaktiboen eramaile eraginkor gisa jokatuz, elikagaien kalitatea hobetzeko/luzatzeko erabil daitezke eta baita ehunen birsorkuntza hobea izateko ere; gainera, kirurgia osteko gaixoaren sendatzea hobetzen ere lagun dezakete. Proteinek eramaten dituzten bioaktiboen artean olio esentzialak, konposatu fenolikoak, bitaminak, mineralak eta peptidoak aurkitzen dira, eta hauek besteak beste aktibitate antioxidatzailea, eta hanturaren eta mikrobioen aurkako propietateak dituzte (Etxabide et al., 2017a, 2018; Santoro et al., 2014).

Testuinguru honetan, elikagaiekin interakzioak izan ditzaketen ontziratze aktiboak prestatu izan dira, horrela jakiak kanpo inguruneko efektuetatik babesteko eta ontziratutako elikagaien kalitatea eta segurtasuna mantenduz edota hobetuz iraugitzea luzatzeko. Elikagaien ontziratze aktiboetako materialak bioaktiboak eta gehigarri funtzionalak txertatzeko diseinatuak izan dira, jakiaren eta bere ingurunearen artean interakzioak sustatzeko. Hortaz, ontziratutako elikagaiaren baldintzak aldatzea lortzen

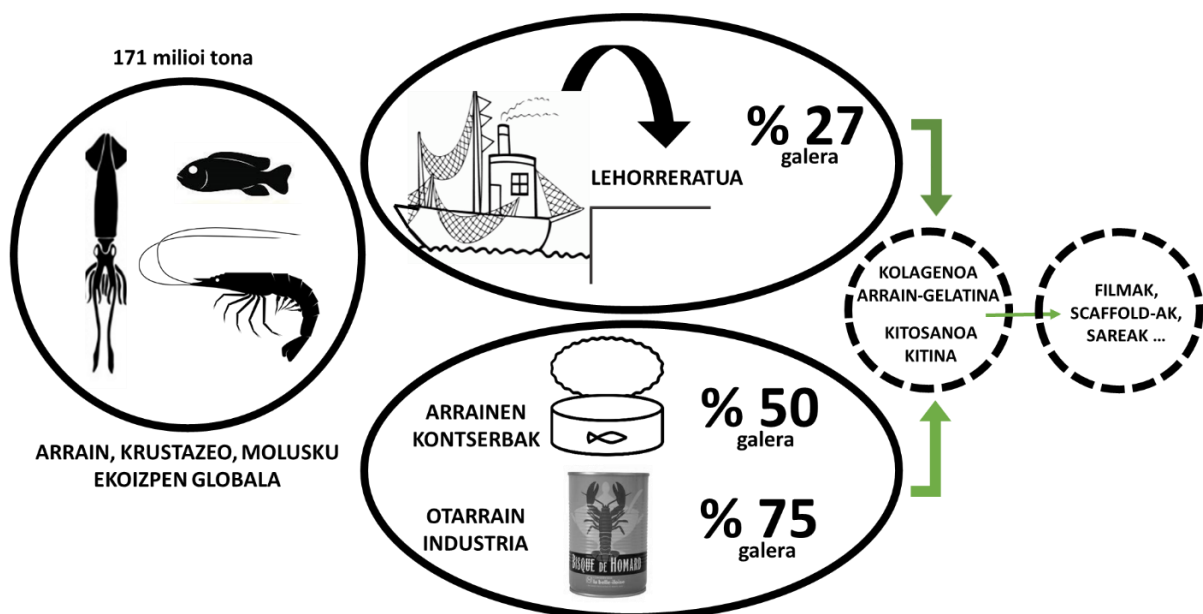
da produktuaren kalitateak gehiago iraun dezan (Grumezescu & Holban, 2017). Helburu hau betetzeko ontziratze aktiboek antioxidatzaileen, mikrobioen aurkako gehigarrien, eta beste molekula bioaktibo naturalen erabilera dakarte. Bestalde, konposatu bioaktiboak biomedikuntzako aplikazioetan erabiliak izan dira, inplante moduan erabil daitezkeen edo botika moduan ematen diren biomaterialetatik molekula hauen askapen jarraitua diseinatu eta gaixoen sendatze azkarrago eta erosoago bat lortzeko (Moaddab et al., 2018; Patel et al., 2018; Raja & Fathima, 2015; Ruiz-Ruiz et al., 2017).

Kapitulu honetan biopolimeroetan oinarritutako materialen laburpen bat egiten da, arreta berezia itsas jatorria duten biopolimeroetan jarriz. Lehenik, laburki biopolimero hauen erauzketarako erabilitako teknikak deskribatuko dira. Jarraian, animalia eta landareetatik eratorritako proteinak erabiliz materialak prestatzeko hainbat prozesatze teknika aipatuko dira. Animalia proteinen artean, gelatinan oinarritutako materialak zehaztuko dira, elikagaien iraungitzea luzatzeko erabilitako arrain-gelatinan oinarritutako materialetan arreta berezia jarriz.

1.2 Hondakinen balioztatzea

Itsaskien industriako azpiproduktuen balioztatzea baliotsua izan daiteke jasangarriak diren eta balio-erantsia duten produktuak sortzeko, izan ere, azpiproduktu hauek proteinetan eta polisakaridoetan aberatsak dira. 2016an arrain-ekoizpen globala (ekoizpen honen barruan arrain, krustazeo, molusku eta beste uretako animaliak, arrantzakoak zein akuikulturakoak sartzen dira) 171 milioi tona ingurura iritsi zen (FAO, 2018) eta lurreratutako arrain, krustazeo eta moluskuen eta kontsumitutakoaren artean % 27ko galerak kalkulatu ziren (**1.1 irudia**). Gainera, arrantza-industrian sortzen diren hondakin solido kantitate handiak kontuan hartu behar dira; esaterako, arrainen kontserbatze prozesuetako hondakin kantitatea produktu gordinaren pisuaren % 50 izatera irits daiteke (Kafle et al., 2013). Arrainen azpiproduktu (azal, hezur, ezkata, tendoi) guzti hauetan kolageno kantitate handia dago, zeina egitura-funtzioa duen proteina haritsua den (Ferraro et al., 2017; Venkatesan et al., 2017). Kolagenoaren

desnaturalizazio termikoa edo hidrolisi partziala eginez gelatina lor daiteke (Huang et al., 2017), eta azken honen propietateak arrain espeziearen arabera dira. Orokorrean, ur hotzetako arrain-gelatinak imino azido hondar kantitate gutxiago edukitzeagatik gel indar baxuagoa daukate ur epeleko arrain-gelatinekin alderatuz (Lin et al., 2017). Imino azido hondarren ezberdintasuna ikusteko adibide gisa aipa daitezke izokin azaletik (ur-hotzetako arraina) eratorritako gelatina eta lupiaren azaletik (ur-epeleko arraina) erauzitako gelatina, lehenak 1000 amino azido totaletatik 166 imino azido hondar ditu eta bigarrenak aldiz, 198-202 (Sinthusamran et al., 2014).



1.1 irudia 2016ko arrantza ekoizpen globala, galerak eta balioztatze-estrategia posibleak.

Krustazeoen eta molusku azpiproduktuei dagokienez, izkira eta karramarroen azalak/oskolak kitina lortzeko erabil daitezke (Arya et al., 2017). Adibide gisa aipa daitezke baita ere otarrainen prozesatze industriako azpiproduktuak, hasierako materialaren pisuaren % 75 izatera irits daitezkeenak (**1.1 irudia**). Kitina polisakarido bat da eta kolagenoaren antzera egitura-funtzioa du. Gainera, kitina bigarren polimero natural ugariena da zelulosaren atzetik, eta normalean aplikazio eremua zabaltzeko eraldatu eta uretan disolbagarria den kitosano izeneko polimeroa izatera pasatzen da. Eraldatze prozesu honetan baldintza alkalinoetan kitinaren desazetilazioa burutzen da

(Hamed et al., 2016; Sayari et al., 2016; Soares et al., 2016). Kontuan hartu behar da kitosanoaren propietate funtzionalak egitura-ezaugarrien menpe daudela, hala nola, batezbesteko pisu molekularren eta desazetilazio graduaren menpe (Rocha et al., 2017).

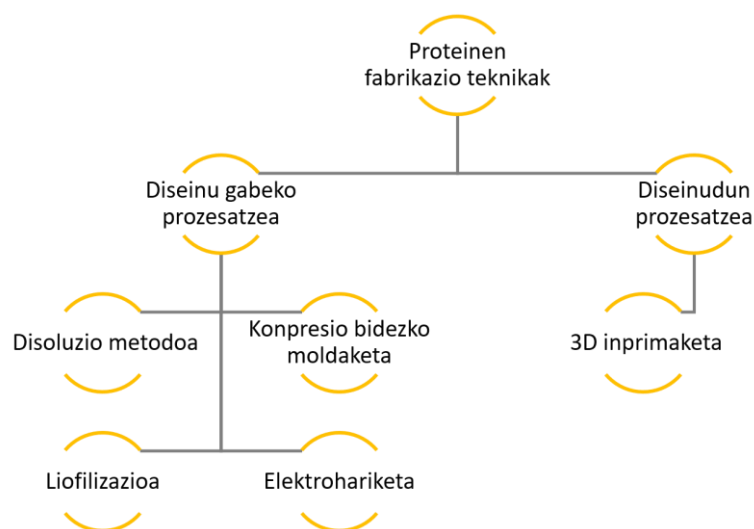
Aurretik aipatu moduan, kolagenoa arrainen azal, ezkata, tendoi eta hezurretatik eskura daiteke eta erauzketa errazteko, arrain atal hauek garbitu eta zati txikiagotan mozten dira (Chen et al., 2016). Arrantza industriako hondakinen erauzketa prozesuak bi urrats nagusi ditu: lehengaien aurretratamendua eta kolagenoaren erauzketa. Arrain-gelatinaren erauzketari dagokionez, proteina hau kolagenoaren desnaturalizazio termikoa edo degradazio kimikoa eginez lortzen da. Prozesu honetan kolagenoaren helize hirukoitzaren egitura galtzen da eta zorizko kiribil egitura, gelatinan ohikoa dena, osatzen da. Baldintza jakin batzuetan gelatinaren makromolekulak berrantolatu daitezke, berriz helize hirukoitz sekuentziak osatuz. Halere, kolagenoaren egitura haritsua ezin berreskura daiteke eta materiala ur-ingurunean disolbagarria izatera pasatzen da. Literaturako hainbat ikerketek arrain-gelatina erdiesteko protokolo ezberdinak aipatu dituzte. Erauzketa protokoloetan aurretratamendu modura azidoak edo alkalinoak erabili ohi dira. Hortaz, bi gelatina mota bereiz daitezke: A gelatina, aurretratamendu azidoekin landutako kolagenotik eratorria, arrain-gelatina gehienak talde honen barruan aurki daitezke; eta B gelatina, kolagenoaren aurretratamendu alkalinoaren emaitza (Hattrem et al., 2015).

Kitina eta kitosanoaren erauzketari dagokionez, tratamendu kimiko edota biologikoak erabili izan dira (Hou et al., 2016). Kitina krustazeoen oskoletatik erauzi nahi denean hiru pausu burutu behar dira: desproteinizazio, despigmentazio eta desmineralizazioa (Hou et al., 2016; Muxika et al., 2017). Txibia lumen kasuan berriz, lumak koloregabeak direnez ez da despigmentaziorik behar eta konposatu inorganikoen presentzia txikia denez ez da desmineralizazio pausurik egiten (Garrido et al., 2017). Kitina erauzi ondoren, desazetilazio prozesuaren bitartez kitosanoa lor daiteke.

Tratamenduaren sendotasunaren arabera kitosanoaren desazetilazio gradua aldatu ahal izango da, materialaren amaierako propietateetan eraginez (Castillo et al., 2017).

1.3 Proteinazko produktuak sortzeko teknikak

Biopolimero eta gehigarri aproposen aukeraketarekin batera, diseinu zein prozesatze metodoek produktuen amaierako propietateetan erabat eragiten dute. Izan ere, manufaktura prozesuek gradu ezberdineko historia termo-mekanikoak dakartzate eta hori horrela, eragina izango dute, hala nola, porositatean, degradatze portaeran, gainazal-propietateetan, propietate mekanikoetan, eta biobateragarritasunean. Beste biopolimero batzuetan oinarritutako produktuekin gertatzen den antzera, proteinak hainbat metodorekin prozesa daitezke aplikazio ezberdinetarako film, zuntzdun sare eta scaffold-ak sortzeko. Teknologia hauen artean daude, besteak beste, disoluzio metodoa, konpresio bidezko moldaketa, liofilizazioa, elektrohariketa eta hiru dimentsiotako (3D) inprimatzea (Ebnesajjad, 2012). Orokorrean, fabrikazio teknika hauek bi kategoriatan bereiz daitezke: diseinu gabeko eta diseinudun prozesatze metodoak. Erabilgarri dauden manufaktura teknika gehienak, hala nola, disoluzio metodoa, konpresio bidezko moldaketa, liofilizazioa, elektrohariketa eta teknika hauen konbinaketak, diseinu gabeko manufaktura tekniken barruan daude; 3D inprimatzea ordea, diseinudun manufaktura tekniken barruan sailkatzen da (**1.2 irudia**).



1.2 irudia Proteinen diseinu gabeko eta diseinudun fabrikazio teknikak.

1.3.1 Disoluzio metodoa

Filmak landare eta animalia proteinez eginiko material mota ohikoenak dira eta elikagaien ontziratze eta ehun-ingeniaritza aplikazioetarako erabiltzen dira. Testuinguru honetan, disoluzio metodoa da laborategi eskalan proteinazko filmak prestatzeko hobesten den metodoa. Teknika honetan disolbatze, isurtze eta lehorte pausuak jarraitzen dira (**1.3 irudia**). Prozesua polimeroen eta gehigarrien, plastifikatzaile edo konposatu bioaktiboak kasu, disolbatzearekin hasten da, egokia den disolbatzaile batekin, eskuarki ura edo ur-alkohol soluzioaren batekin, lan eginez. Berotzeak edota pH doiketak soluzioaren baldintzak eralda ditzakete, filmen amaierako propietateetan eraginez. Gero, soluzioa Petri ontzietara isurtzen da, azkenik disoluzioak lehorte prozesuan daudenean disolbatzailea lurrundu eta filmak sortzen direlarik. Lehortzeko prozesuak ingurune-baldintzetan edo tenperatura eta hezetasun erlatibo kontrolatuetan burutu daitezke, honek ere filmen propietateetan eragina izanik (Cerqueira et al., 2016).



1.3 irudia Disoluzio metodoaren ilustrazio eskematikoa.

Disoluzio metodoaren bidez hainbat proteina film prestatu izan dira elikagaien ontziratze aplikazioetarako (Arrieta et al., 2013; Etxabide et al., 2017b; Hassan et al., 2018). Testuinguru honetan, proteina film batzuk hainbat estrakturen eramaile gisa erabili izan dira. Proteina filmen aktibitate antioxidatzailea handitzeko, soja-proteina isolatuko filmak eratzeko formulazioan erregalaz hondakin estraktua gehitu zen (Han et al., 2018). Fenoliko eduki totala elikagai-simulatzaile urtsuan (% 10 etanol) eta koipetsuan (% 95 etanol) neurtu zen, eta emaitzetan ikusi zen txertatutako estraktuak konposatu fenoliken askapena zeharo handitu zuela, simulatzaile urtsuan

4,0-5,6 mg azido galiko/g film eta simulatzaile koipetsuan 2,2-5,5 mg azido galiko/g film balioak lortuz. Gainera, estraktua txertatzean ur lurren iragazkortasuna txikitu eta tentsio erresistentzia handitu zen.

Beste ikerketa lan batean (Kaewprachu et al., 2018), film aktiboak sortzeko asmotan arrain-proteina miofibrilarrari krakon estraktua, mikrouhinak (500 W, 62 s) erabiliz lortutakoa, eta katekina gehitu zitzaizkion. Arrain-proteina miofibrilarraren DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitate baxua eta burdina erreduzitzeko indar antioxidatzaile (FRAP) ahula estraktu/katekina nahastearen gehitzearekin hobetu ziren; gainera, lagin hauek haustura-elongazio handiagoak azaldu zituzten. Film hauek atun zatiak biltzeko erabili ziren (Kaewprachu et al., 2017). Bildu gabeko atunaren kolorea 4 egunetan gorri argitik marroi izatera pasatzen zen bitartean, film aktiboekin bildutako atun zatiek 8 egunen ondoren kolore gorria mantentzen zuten. Hori horrela, bildutako laginek TBARS balio baxuagoak (2,16 mg MDA/kg lagin) azaldu zituzten bildu gabeko laginekin (7,35 mg MDA/kg lagin) alderatuz. Gainera, biltzeak atunaren ehundura hobetzea suposatu zuen. Beraz, azterketa sensorialak eta emaitzak ikusita atun zatien biltzeak laginen iraungitzea 4 aldiz luza zezakeela ondorioztatu zen.

Proteinazko filmak biomedikuntzako aplikazioetarako ere erabiliak izan dira (Etxabide et al., 2017c; Posati et al., 2018). Ehun-ingeniaritzarako filmak prestatzeko kolagenoa fukoidan izeneko polisakarido batekin nahastu zen (Perumal et al., 2018). Polisakarido hau algetatik eratortzen da eta aktibitate fisiologiko eta biologiko asko ditu, esaterako, aktibitate antioxidatzailea, eta minbiziaren, tumoreen eta koagulazioaren aurkako propietateak ditu. Fukoidandun filmek poro tamaina txikiagoa eta egitura haritsuagoa erakutsi zuten kontrol filmekin alderatuz, horrela zelulen itsaspena eta mintz barru alderako infiltrazioa hobe zitezkeelarik. Bestalde, degradazio entzimatikoa neurtzeko kolagenasarekin *in vitro* biodegradazio entseguak egin ziren eta fukoidandun filmek kolageno puruak (kontrola) baino kolageno degradazio txikiagoa azaldu zuten.

Hortaz, ondorioztatu zen fukoidan sustantziak kolagenoan loturak sortzeko dauden gune aktiboak kolagenasatik babesten zituela.

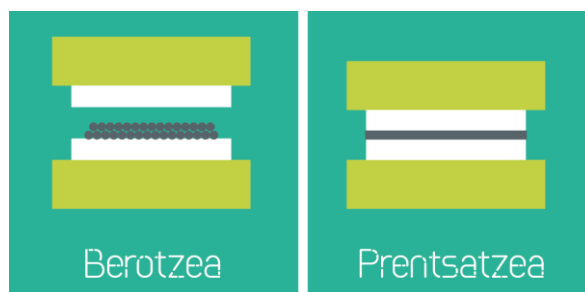
Halaber, biomedikuntzako aplikazioetarako *Delonix regia*-tik erauzitako galaktomananoa zuten gelatinazko filmak prestatu ziren disoluzio metodoa erabiliz (Siqueira et al., 2015). Filmak 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimida hidrokloruroaren ur-soluzio batean 2 orduz murgildu eta hauen saretzea lortu zen. Dentsitate handiagoko egitura izateagatik saretutako filmek saretu gabeko filmek baino 2 aldiz puzte balio baxuagoak azaldu zituzten. Gainera, L929 zeluletan eginiko azterketa biologikoak galaktomanano kontzentrazioa edozein izanik ere zitotoxizitaterik ez zegoela azaldu zuen, film hauek zauriak sendatzeko bendetan erabiltzeko duten potentziala iradokiz.

Disoluzio metodo klasikoak ez du dimentsio handiko filmak prestatzeko aukera ematen. Beraz, azken urteetan zinta bidezko disoluzio metodoa proposatu izan da filmekin eskala handiagoan lan egin eta denbora gutxiagoan film gehiago prozesatu ahal izateko. Zinta bidezko disoluzio metodoa, disoluzio metodoaren moldaketa bat da eta bertan filmak eratzeko formulazioa erregulagarria den xafla baten laguntzaz zabaltze tresnaren hondoan (xafla doktorean) hedatzen da, esekiduraren lodiera kontrolatzeko aukera izanik. Jarraian, zabalduetako esekidura beroaren eroapenaren, konbekzioaren, irradiazio infragorriaren, edo mekanismo hauen konbinazioaren bidez temperatura kontrolatu batean lehortzen da (de Moraes et al., 2015). Hori horrela, zinta bidezko disoluzio metodoaren bidez soja-proteinazko filmak prestatu ziren lehortzeko metodoek eta tenperaturak (beroaren eroapena 40, 50 eta 60 °C-an, eta irradiazio infragorria 60 °C-an) filmen propietate fisikoetan zuten eragina aztertzeko (Ortiz et al., 2017). Zehazki % 5,0, 10,0, 10,5, 11,0 eta 12,5 w/v soja-proteina zuten filmak eratzeko formulazioak pH 10,5ean prestatu ziren eta 1,8 cm/s-ko abiaduran zabaldu ziren 30 cm x 84 cm platerrean. Filmak eratzeko formulazioa platerrean zabaldu eta 2 mm-ko lodiera lortzeko xafla doktore bat erabili zen. Soja-proteinazko filmak zinta bidezko

disoluzio metodoaren bidez prestatzeko gutxieneko proteina kontzentrazioa % 10,5 w/v zela zehaztu zen. Lehortze metodoa eta tenperatura edozein izanik ere filmen hezetasun edukia, disolbagarritasuna, ur lurrunaren iragazkortasuna eta kolore parametroak ez ziren aldatzen. Halere, eroapen metodoa 60 °C-an jasan zuten filmek propietate onenak azaldu zituzten jarrera mekanikoari eta zigilatze termikoarekiko sendotasunari dagokienez. Bestalde, lehortze tenperaturaren handitzearekin opakutasuna nabarmen txikitu zen.

1.3.2 Konpresio bidezko moldaketa

Proteinan oinarritutako filmak konpresio bidezko moldaketaren bidez ere prozesatu daitezke (Garrido et al., 2016a; Uranga et al., 2018). Teknika honetan deformagarria den material bat berotutako bi molde erdiren artean kokatzen eta prentsatzeko da, eta moldearen tenperaturaren eraginpean produktu solido bat izatera pasatzen da (1.4 irudia). Prozesuko etapa bakoitzeko parametroak (presioa, tenperatura eta denbora) erabilitako proteinaren baitan daude.



1.4 irudia Konpresio bidezko moldaketaren ilustrazio eskematikoa.

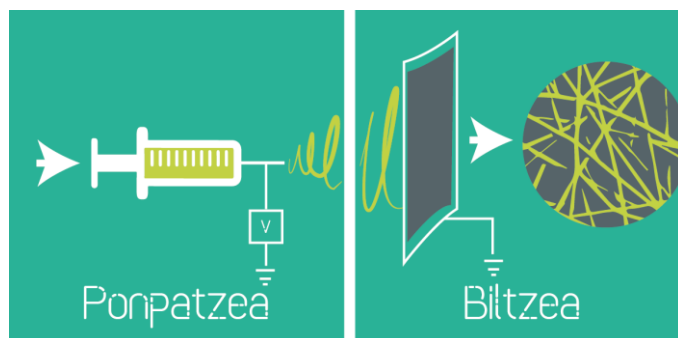
Polimero sintetikoetan oinarritutako termoplastikoak ez bezala, landare proteinak izatez ez dira biopolimero termoplastikoak eta ondorioz, proteinen aldaketa beharrezkoa da hauek jariatzea ahal izateko. Honela, konpresio bidezko moldaketa erabiliz filmak prestatzeko proteina-polisakarido nahasteak ibili izan dira. Esaterako, soja-proteinazko filmak *Gelidium sesquipedale* (*Rhodophyta*) alga gorritik erauzitako agarraren (% 3, 6 eta 9, masa portzentajearen arabera) eramaile gisa erabili ziren (Garrido et al., 2016b). Lan honetan, filmak lortzeko prozesuan gertatutako konformazio aldaketak deskribatu ziren

eta agarra txertatzeak proteinazko filmen amaierako egituran zuen eragina zehaztu zen. Soja-proteina/agar filmak gardenak eta homogeenak ziren eta ultramore izpiekiko hesi propietate bikainak azaldu zituzten 200-280 nm uhin-luzeretan. Agarra txertatzean filmen disolbagarritasuna gutxitu, baina putze gaitasuna handitu zen, batik bat % 9 agardun filmetan. Beraz, film hauek sustantzia aktiboen askapen kontrolatuetarako erabil zitezkeen, bai aplikazio farmazeutikoetan baita elikagaigintzako aplikazioetan ere. Izan ere, soja-proteinazko filmak bioaktiboen eramaile gisa erabili izan dira, esaterako, mahats gorriaren estraktuaren eramaile gisa (Ciannamea et al., 2016). Hainbat estraktu kantitate (% 0-10, masa portzentajearen arabera) gehitu eta hiru urratseko operazioan termo-konprimatu ziren: 5 minutuz 150 °C-an eta 10 kg/cm²-ko presioan, 2 minutuz 150 °C-an eta 100 kg/cm²-ko presioan, eta 30 minutu inguruz 30 °C arteko hoztea 100 kg/cm²-ko presioan. Emaitzek azaldu zuten estraktuaren gehitzeak haustura-elongazio balio txikiagoak eta modulu elastiko handiagoak zekartzala. Gainera, % 5 estraktu txertatzeak filmen aktibitate antioxidatzailea hobetu zuen, izan ere, DPPH erradikalak ezabatzeak aktibitatea % 58tik % 81era handitu zen konposatu polifenoliken, hala nola, mahats gorri estraktuko katekina, epikatekina eta prozianidinaren, presentziari esker. Halere, estraktu kontzentrazio altuagoek (% 10) ez zuten filmaren aktibitate antioxidatzailean eraginik.

Konpresio bidezko moldaketa ontziratzeko aktiboak prestatzeko ere erabil daiteke. Testuinguru honetan, gelatina, almidoia, ura eta glizerolaren nahaste bat prentsatzeko platerrean 160 °C-an berotu zen 5 minutuz; jarraian, tenperatura 160 °C-an mantenduta, 2 minutuz 3000 kPa eta 6 minutuz 13000 kPa aplikatuz, termikoki trinkotu zen (Moreno et al., 2018). Ondoren, 3 minutuz 6 °C arteko hozte zikloa aplikatu zen. Termo-konprimatutako film hauek oilasko bular xerren iraungitzea luzatu zuten eta bildutako laginetan bizigaien erabateko kontaktaren onargarritasun mikrobiologikoaren mugara 12 egunen ondoren iritsi zen.

1.3.3 Elektrohariketa

Elektrohariketak (hariketa elektrostatiakoak) bere sinpletasun, kostu-efikazia eta moldakortasunagatik zuntz solido ultrafinak modu jarraituan sortzeko interesa piztu du azken hamarkadetan (Deng et al., 2018; Moheman et al., 2016). Sortutako zuntzen tamainak mikrometro eta nanometroen artekoak izaten dira, azalera espezifikoko handikoak. Polimero likatsu edo urtu batetik zuntzak lortu ahal izateko teknika hau karga elektrostatiakoetan oinarritzen da, tentsio altuko energia hornitzailea, kontrol zehatzeko xiringa ponpa, orratza duen xiringa eta lurrari konektatutako euskarria erabiliz (**1.5 irudia**) (Santos et al., 2018). Horrela, gainazal-tentsioari esker kapilar tuboaren bukaeran atxikita dagoen polimero soluzioa eremu elektriko baten menpe jarri eta karga elektriko bat induzitzen da likidoaren gainazalean, eremu elektrikoaren indarra areagotuta indar elektrostatiakoak handituz. Indar elektrostatiakoa gainazal-tentsioarekin berdintzen denean, likidoaren tantak kono itxura (Taylor konoa) hartzen du eta indar elektrostatiakoak gainazal-tentsioa gainditzen duenean elektrikoki kargatuta dagoen zorrotada sortzen da Taylor konotik. Zorrotada hau, lurrari konektatuta dagoen euskarri batetara (metalezko pantailara edo danborrera) zuzentzen da, zeinetan disolbatzailea lurruntzen den bitartean zuntzak deskargatzen diren (Drosou et al., 2018). Zorrotadak hartzen duen kurbaturarengatik elektroharikatutako zuntzak hiru dimentsiotan (3D) bil daitezke, nahaspilatu gabeko eta ausaz orientatutako zuntzak dituzten sare porotsuetan.



1.5 irudia Elektroharikatzearen ilustrazio eskematikoa.

Teknika hau erabiliz, zuntzak edo sareak lortzeko hainbat biopolimero elektroharikatu izan dira (Jiang et al., 2015). Testuinguru honetan, proteinak biomedikuntza eta elikagaien ontziratzeko aplikazioetarako maiz erabili izan dira (Aytac et al., 2017; Luo et al., 2018a; Mendes et al., 2017). Azken urteetan, elektrohariketa bioaktiboen kapsulazio eta askapen kontrolaturako teknologia gisa aztertu izan da (Altan et al., 2018; da Silva et al., 2018; Wang et al., 2016, 2017a). Izan ere, teknika honek abantaila ugari azaltzen ditu kapsulatze teknika tradizionalekin (esprai bidezko lehortzearekin edo emultsifikazioarekin) alderatuz. Kapsulatze aplikaziorako elektrohariketak dituen ezaugarri interesgarrienak hauexek dira: urrats bateko prozesua izatea, lagin lehorrak ekoiztea, eta beroarekiko sentikorrek diren materialak prestatzeko aproposak diren baldintzak (giro temperatura eta presio atmosferikoa) erabiltzea (Bhushani & Anandharamakrishnan, 2014). Bioaktiboen kapsulatzearen alorrean elektrohariketaren bidez hainbat proteina erabil daitezke. α -tokoferol antioxidatzailea hainbat proteinatan (gazur proteinan, soja-proteinan edo zeinan) kapsulatuz eta hidrokoloide sareak zuzenean gari glutenezko filmaren gainean elektroharikatuz, bi geruzako ontziratzeko aktiboak prestatu ziren (Fabra et al., 2016). Zeina zuntzek α -tokoferola kapsulatzeeko eraginkortasun handiagoa eta askapen mantsoagoa erakutsi zuten gazur edo soja-proteinen kapsulatzeekin alderatuz. Horrela, zuntzetan “bead” edo tantatxo izeneko egituretan baino kapsulatzeeko eraginkortasun handiagoa zegoela esan zitekeen. Gainera, egitura hauei industriako ohiko esterilizazio prozesu bat aplikatuz gero, α -tokoferolaren egonkortasuna mantentzen zen, batik bat matrize moduan zeina erabiltzen zen kasuan.

Elektrohariketa bidez bioaktiboen kapsulatzea egiteko nahasteak ere baliagarriak izan dira. Zehazki, amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteina isolatu eta pululano nahastea erabiliz azido folikoa, uretan disolbagarria den B bitamina, kapsulatu zen (Aceituno-Medina et al., 2015). Amaranto proteina isolatua gutxi erabiltzen den Mexikoko labore tradizional batetik eratortzen da, zeinak ale eta hosto elikagarriak

dituen. Pululanoa berriz, uretan disolbagarria den polisakarido mikrobianoa da, almidoi eta azukre hazkuntzetan *Aureobasidium pullulans*-ek ekoiztua. Amaranto proteina isolatu/pululano egiturekin eginiko kapsulatzeak azido folikoaren argiarekiko degradazioa gutxitzen du, eta ondorioz, elikagaigintzako aplikazioetarako baliagarria izan daiteke, esaterako, elikagaiak aberastu eta maila bat arte jatea gomendatuak dauden folato basalen neurriak handiagotzeko. Aplikazio nutrazeutikoetarako ere kafirina, basartoaren aleko prolamina proteina, eta polikaprolaktona nahastu ziren, zuntz hibridoak zituzten sareak lortzeko (Xiao et al., 2016). Nutrazeutikoen askapena gorputzeko fluidoetan nolakoa litzatekeen simulatzeko, azido karnosikoa aukeratu zen eredu gisa, eta askapenaren portaera difusio bidez kontrolatua zegoela ikusi zen. Askapenaren konposizioan kafirinaren zati amorfoa nagusitu zen bitartean, polikaprolaktonak 3D zuntzen egitura mantentzeko eskeleto hidrofobiko gisa jokatzeko zuten.

Elektroharikatutako proteinazko sareetan bioaktibo hidrofobikoen txertatzea egin nahi denean, disolbatzeko ezintasunagatik zenbait zailtasun aurki daitezke. Hortaz, ur soluzioetan surfaktanteak barreiatzen dira mizela kontzentrazio kritikoaren gainetik, mizelak sortu, bioaktibo hidrofobikoak disolbatu, eta elektrohariketa prozesuari laguntzeko (García-Moreno et al., 2016). Testuinguru honetan, Tween 80 ez-ionikoa, zetiltrimetil amonio bromuro kationikoa, eta sodio dodezil sulfonato anionikoa surfaktanteak gelatina soluzioetan erabili ziren (Deng et al., 2017). Honela, gelatina nanozuntzen morfologia modulatu eta kapsulatutako kurkuminaren askapenari eta antioxidatzaile eta mikrobioen aurkako aktibitateei lagundu nahi zitzaie, hau lortuta elikagai industrian nutrazeutikoen eramaile gisa aplikatzeko. Sodio dodezil sulfonatoak ez bezala, Tween 80 eta zetiltrimetil amonio bromuro surfaktanteek izugarri hobetu zuten kurkuminaren askapena disolbatzaile polarretan.

Surfaktanteekin batera elektrohariketan erabilitako disolbatzaileek eragina dute materialen amaierako propietateetan. Hala, aplikazio nutrazeutikoetarako, ω -3-an

aberatsa zen arrain oliodun zeina sareetan etanol eta isopropanol disolbatzaile urtsuak zuten eragina aztertu zen (Moomand & Lim, 2015). Isopropanol-ur disoluzioa erabili zenean tantatxo egiturak sortu ziren elektroharikatutako zuntzetan. Etanol-ur disoluzioa erabili zenean aldiz, zuntz leun eta jarraituak lortu ziren. Guzti honek kapsulatzearen eraginkortasunean eta askapenaren abiaduran eragina zuen. Aipatzekoa da, zuntzak jarraian lortu ahal izateko alderantzikatutako antolamendua erabili zela, izan ere, elektroharikatze prozesuan zeina soluzioak orratzaren punta ixteko joera du eta zeina soluzioan lipidoen gehitzeak elektroharikatze prozesua gehiago mantsotzen du. Beraz, bapore iturri gisa disoluzio andel bat erabili zen disoluzioaren lurruntze portzentajea modu eraginkorrean gutxitu eta soluzio polimerikoa orratzaren puntan solidifikatzea saihesteko. Elektrohariketa alderantzikatuaz gain, metodo koaxiala erabil daiteke proteina-bioaktibo materialak lantzeko. Gainera, orratz bakarreko elektrohariketa teknika koaxialarekin konparatuz gero, azken honek kapsulatze geruzen, morfologiaren, bioaktiboen gordetze edukieraren eta atxikipenaren kontrol gehiago eskaintzen du. Hau kontuan izanik, zeina prolamina zuntzetan arrosa mosketa haziaren olioaren mikroenkapsulazioa gauzatzeko teknika koaxiala landu zen (Yao et al., 2016). Olio barne ingurunerako eta zeina soluzioa zorro modura (barnekoa biltzeko) erabili ziren. Zuntzez osatutako zeina/olio filmek ontziratzeko prozesu sinple batekin aukeratutako fruituen iraungitzearen luzapenean eragin nabarmena azaldu zuten. Honetaz gain, elektrohariketa koaxialak metodo uniaxialak baino konposatu bioaktibo sentikorren kapsulatze hobekia eskaintzen zituela ondorioztatu zen (Isik et al., 2018).

Gaur egun, elektrohariketarako teknika berria ere erabiltzen da, azalera askeko edo orratzik gabeko elektrohariketa bezala ezaguna. Elektrohariketaren metodo aldatu hau nanozuntzen ekoizpen komertzialerako erabiltzen da eta bertan gainazal aske batetik, sistemaren geometriarekin dependentziarik ez duen azalera batetik, gertatzen da elektroharikatzea (Moreira et al., 2018). Hainbat geometria aztertu izan dira, hala nola, tanbor, disko, kable, eta ponpa gaseosoak (Bhattacharyya et al., 2016).

1.3.4 Liofilizazioa

Liofilizazio teknika proteinazko 3D egitura porotsuak prozesatzeko erabiltzen da (Teimouri et al., 2015; Varley et al., 2016) eta orokorrean biomedikuntza sektorerako baliatzen da. Teknika honen erabilerak disolbatzea, isurtzea, izoztea eta lehortzea pausoak dakartza (**1.6 irudia**). Proteina suspentsio bat molde batetara isurtzen da, esaterako, kikarak dituen plaka baten kizarara, eta solidotu (izoztu) egiten da. Izozte etapak izotz kristalen nukleazio eta hazkuntzan eragina du eta beraz, izotz eta proteina faseen morfologia eta poro tamaina zehaztuko ditu. Ondoren, liofilizatzaile batekin izotza kentzen da, zeinetan izoztutako uraren sublimazio prozesuak esponja porotsuen sorrera dakarren. Proteinazko scaffold-etan eduki nahi diren poro egiturak (poroen geometria, poro tamaina eta tamainen distribuzioa, poroen interkonektibitatea, eta poro-hormen lodiera) eta propietate mekanikoak lortu ahal izateko zenbait faktore hartu beharko dira kontuan, horien artean, proteina soluzioaren kontzentrazioak eta liofilizazio parametroak (Deng & Kuiper, 2017; Horn et al., 2018).



1.6 irudia Liofilizazioaren ilustrazio eskematikoa.

Hasierako proteina kontzentrazioak scaffold-en propietate biofisikoetan duen eragina aztertzeko liofilizazioaren bidez kolageno scaffold-ak prestatu ziren (Offeddu et al., 2016). Kolagenoa azido azetikoan eseki zen zehaztutako kontzentrazioetan: % 0,5 w/v eta % 1,5 w/v artean, % 0,25 w/v-eko gehikuntzarekin. Izozte etapa -20 °C-an burutu zen, hozte prozesua giro tenperaturatik 0,5 °C/min-ko abiaduran gauzatu. Lehortze etapa berriz, 0 °C-an, 10,7 Pa-etako hutsunean egin zen. Ondoren, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida hidrokloruroa, N-hidroxisuzinimida eta

etanol-ura (% 95 v/v) 5:2:1 proportzio molarretan erabiliz scaffold-ak saretu egin ziren. SEM mikrografiek kontzentrazio guztietan kualitatiboki antzeko poro arkitekturak azaldu zituzten; halere, kolageno kontzentrazioaren handitzeak poro-horma eta eustoinaren lodieraren handitzea zekarren. Aipatutako faktore hauek hidratatutako laginetan puzte bolumena zehazten zuten, zeina kolageno kontzentrazioarekin handitzen zen. Gainera, poro-hormen presentziak fluidoan scaffold-ean zeharreko mugikortasunean eragina zuela ikusi zen. Emaitza honek ondorioak izan zitzakeen ehun-ingeniaritza aplikazioan elikagaien eta hondakinen difusioan, zelulen infiltrazioan, eta baita denboraren mendeko diren erantzun mekanikoetan ere.

Liofilizazio bidez prestatutako gelatinazko scaffold porotsuen propietate fisiko-kimiko, mekaniko eta biologikoetan, gelatinaren hasierako kontzentrazioak, laktosak eragindako saretze erreakzioak eta bioaktiboen gehitzeak zuten eragina aztertu zen (Etxabide et al., 2018). Gelatina scaffold-ak tetrahidrokurkuminaren eramaile gisa erabili ziren ehun-ingeniaritzako aplikazioan, zehazki kartilagoen birsorkuntzan. Tetrahidrokurkumina uretan disolbagarria den kolorerik eta gusturik gabeko antioxidatzailea da, diabetesaren, minbiziaren eta hanturaren aurkakoa. Landareetatik eratorritako bioaktibo hau kurkuminaren metabolito nagusia da eta *Curcuma longa* L.-tik (kurkumatik) erauz daiteke Soxhlet, ultrasoinu eta mikrouhin erauzketa metodoen bidez (Li et al., 2014). Hasierako gelatina kontzentrazioa (% 2,5 eta 4,0 w/v) edozein izanik ere, gelatina eta laktosaren arteko saretze erreakzioak esanguratsuki hobetu zuen fosfato tanpoi-disoluzioan (PBS), 37 °C-an, scaffold-en osotasun fisikoa. Gainera, erreakzio kimikoarekin batera, hasierako gelatina kontzentrazioa handitzeak scaffold-en sendotzea eta morfologiaren aldatzea zekarren, % 4,0 w/v-ko gelatinazko scaffold-etan poro handiagoak eta porositate gutxiago agertuz. Scaffold-en puzte gaitasuna ere gelatinaren hasierako kontzentrazioaren menpe zegoen; eta honek eragina zuen PBS ingurunean tetrahidrokurkuminaren askapenean, lehen 8 ordutan % 2,5 w/v eta % 4,0 w/v scaffold-etan % 82 ± 4 eta % 64 ± 9 antioxidatzaile askatuz, hurrenez hurren.

Azkenik, scaffold-en karakterizazio biologikoan tetrahidrokurkuminadun gelatina kontzentrazio ezberdineko bi laginetan zelula osasuntsuen hazkuntza ikusi zen.

Proteina-polisakarido nahasteak ere erabili izan dira liofilizazio bidez scaffold-ak prestatzeko (Horn et al., 2018). Zeina/kitosano/nanohidroxiapatita hainbat pisu proportzio erabiliz scaffold nanokonpositeak presatu ziren liofilizazio teknikaren bidez eta hauen propietate mekanikoak eta *in vitro* propietateak aztertzeko karakterizazioa burutu zen (Shahbazarab et al., 2017). Nanohidroxiapatita kantitatearen handitzeak poroen gutxitzea eta scaffold-en puzteko gaitasuna txikitzea bultzatu zuen, propietate horiek konposatuen arteko hidrogeno lotura intermolekularrekin erlazionatuak baitzeuden. Konposatean nanohidroxiapatitaren gehitzeak scaffold-en degradazioa mantsotu zuen. Horrela, 28 egunen ostean konposate bakoitzaren masa galeraren tasa % 15-20 inguruan zegoen. Nanohidroxiapatita, kitosano eta zeina kantitateen aldaketekin lortutako degradazioaren kontrola ehun-ingeniaritza aplikazioetan desiragarria izan zitekeen. Bestalde, zitotoxizitatearen *in vitro* azterketan zehar ikusi zen kitosano eta zeina kantitate handiagoekin zelulen itsaspen, hazkuntza eta infiltrazio hobeak lortzen zirela.

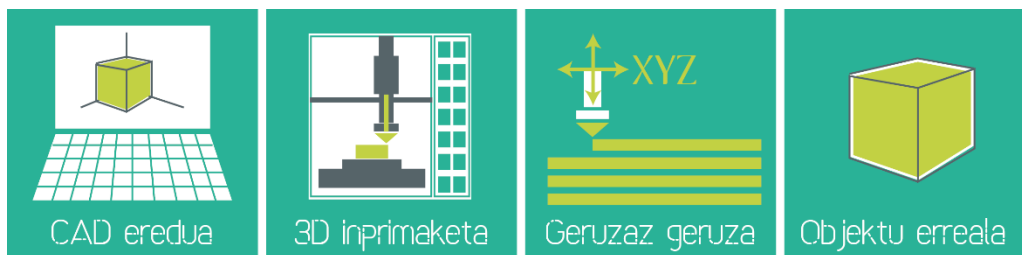
Ehunen birsorkuntzarako erantzun hobeak dituzten scaffold-ak sortzeko hainbat teknologia eta ingeniaritzako estrategia konbinatu izan dira. Testuinguru honetan, kartilagoen ehun-ingeniaritzarako entzimatikoki saretutako zetaren fibroinazko scaffold-ak, sendoak eta poro interkonektatudunak, sortzeko gatz lixibiazio eta liofilizazio teknologien konbinazioa erabili zen (Ribeiro et al., 2018). Gatz lixibiazio metodoa porositate handiko eta interkonektatutako poro asko dituzten scaffold-ak fabrikatzeko prozesu sinplea da. Bertan gatz partikulak gehitzen dira, esaterako, NaCl edo KCl gehitzen da polimero soluzioan, disolbatzailea polimero soluziotik kentzen da, eta laginak murgilduta partikulen lixibiazioa egiten da. Kasu honetan, NaCl partikula granularrak (500-1000 μm) zetaren fibroina soluziora gehitu ziren eta saretze entzimatikorako errefau peroxidasa erabili zen. Ur destilatuan NaCl partikulak kendu

ondoren, scaffold-ak liofilizatu egin ziren. Laginek gainazalean eta scaffold barruan antzeko makro- ($> 500 \mu\text{m}$) eta mikro-poro ($< 50 \mu\text{m}$) egiturak azaldu zituzten. Saretutako scaffold-en degradazio entzimatikoa ere aztertu zen proteasa XIV erabiliz. Scaffold-en degradazioa azkarragoa zen proteasa XIV-ren presentzian kontrolarekin alderatuz; kontrol baldintzetan scaffold-ak PBS soluzioan 30 egunez egon ondoren euren jatorrizko pisua mantentzen zen. Azkenik, sagu eredu batean larruazalpeko ezarpena eginez saretutako scaffold-en *in vivo* bateragarritasuna etsaminatu zen. Tindatutako irudietan zenbait gertaera ikus zitezkeen: ehun konektiboaren geruza lodi bat scaffold-en gainazal osoan itsatsi zen egitura porotsuan sakonki infiltratuz eta scaffold-etako barruko poroak betez. Ezarpen periodoaren ondoren aurkitutako edema ezak edo neutrofiloen arrastoak ezagutarazi zuten saretutako scaffold-ek ez zutela hantura akuturik eragiten. Gatz lixibiazio eta liofilizazio metodoen konbinazio bidez proteina-polisakarido nahasteak ere, hala nola, gelatina eta kitosano biopolimeroak, prestatu izan dira, azaleko ehun-ingeniaritzako aplikaziorako zelulak hazteko scaffold gisa erabiltzeko (Pezeshki-Modaress et al., 2014).

1.3.5 3D inprimaketa

Hasiera batean 3D inprimaketa teknologiak aplikazio industrialetarako (auto eta kosmetika industria, eraikuntza eta industria aeroespazialerako) garatu ziren. Halere, 3D forma konplexuak sortzeko malgutasunagatik, biomedikuntza aplikazioetarako teknika erakargarria bihurtu da, bereziki ehun-ingeniaritza alorrean. Izan ere, aurretik aipaturiko scaffold-ak fabrikatzeko metodo tradizionalak orokorrean makro-arkitekturaren zehar mugak azaltzen ditu, 3D formak eta geometriak molde batzuek eta esku-prozesuek determinatuak baitaude. Teknologia berri eta zehatzagoen garapenarekin, 3D inprimagailuak kasu, scaffold-en arkitekturaren kontrol espaziala hobetu da makro eta mikro eskalan, horrela erreproduzigarritasuna hobetuz, xehetasun maila handituz, eta gaixoen berariazko eraikuntzak gauzatzuz (Bracaglia et al., 2017).

Orokorrean, edozein 3D inprimaketa prozesutan, scaffold-en kanpo eta barne egitura digitalak lehenik ordenagailu laguntzazko diseinu (CAD) software bat edo gaixoaren berariazko datu mediku irudikatuak, hala nola, CT eskaner edo X-izpi bidez lortutakoak, erabiliz diseinatzen dira. Jarraian, gainazal-ezaugarrien 3D artxibo digitalak normalean .STL luzapena duen artxibo batetara esportatzen dira. .STL artxiboa ingurune birtual batean, zehazki bi dimentsiotako (2D) geruza askotan, zatitua egoten da eta 3D inprimagailuak egitura fisikoa sortzeko erabiltzen du. Azkenik, geruza bakoitza bata bestearen segidan/gainean prozesatzen da diseinatutako 3D egitura osatzeko (1.7 irudia). Zati bakoitza geruzaz geruza fabrikatzen denez, prozesatze mota hau “fabrikatze eransgarri” gisa ere ezagutzen da (Balakrishnan et al., 2018). Inprimatutako scaffold-en nanoarkitektura aldatzeko prozesatze ondoren gainazalen aldaketa egin daiteke.



1.7 irudia 3D inprimatzearen ilustrazio eskematikoa.

Gaur egun, hogeita hamar 3D inprimaketa sistema baina gehiago daude, esaterako, 3D inprimaketa zuzena, 3D bioinprimaketa, material-urtzearen bidezko modelatzea, laser bidezko sinterizazio selektiboa, estereolitografia eta zeharkako 3D inprimaketa (Deng & Kuiper, 2017). Sistema hauek erabiltzen den materialaren formaren arabera sailkatzen dira, hau da, likido (hidrogelak/tintak), solido (filamentuak) eta hauts sistemak. Proteinen inprimaketari dagokionez, gehien erabiltzen den material taldea hidrogelak (tintak) sortzen dituzten uretan disolagarriak diren biopolimeroena da, izan ere, kimikoki moldagarriak dira eta 3D zelulen hazkuntzarako baldintza lagungarriak dituzte (Włodarczyk-Biegun & del Campo, 2017).

3D inprimaketa teknologia orokorrean ez da elikagaigintzarekin lotutako sektorean erabili eta adibidez, ebakuntzetarako zelularik gabeko denbora baterako scaffold-ak edota zelulaz kargatutako tintak (bioinprimaketa) inprimatzeko erabili izan da (Duan et al., 2013; Luo et al., 2018b; Mandrycky et al., 2016; Na et al., 2018; Pourchet et al., 2017; Rodriguez et al., 2017). Halere, azken aldian 3D inprimaketa elikagaien prozesatzean aplikatzeak garrantzia hartu du (Sun et al., 2015). 3D inprimaketa teknologia elikagai materialak inprimatzeko erabiltzearen arrazoiak honakoak dira: ekoizpen prozesuak sinplifikatzea eta ehundura berriko eta elikadura-balio hobetuko elikagaien diseinua uztartzea (Pallottino et al., 2016). Esaterako, proteinazko hainbat elikagai osagai 3D inprimatu izan dira gantz edo azukre gutxiko egitura osasuntsuak diseinatzeko (Lille et al., 2018; Wang et al., 2018).

1.4 Gelatinan oinarritutako materialen aplikazioak

Proteinen artean gelatinak biodegradagarriak eta biobateragarriak dira eta puzteko eta gel bihurtzeko gaitasunaz gain egonkortasun termikoa azaltzen dute (Hashim et al., 2015; Patel et al., 2018). Lehenengoz gelatina lortzeko, 1930ean lehengai gisa txerri azala erabili zen (Gómez-Guillén et al., 2011). Gaur egun, gelatina komertziala batik bat behien eta txerrien azaletatik eta hezurretatik lortzen den arren (Roy et al., 2017), beste gelatina iturri batzuk ere interesa pizten ari dira, esaterako, arrain-gelatina. Testuinguru honetan, gelatinazko film aktiboak eta geruzak azpimarra daitezke **(1.1 taula)**.

Txerri-gelatinari dagokionez, filmetan zenbait antioxidatzaile, hala nola, azido askorbikoa (Kowalczyk, 2016) edo lupuluaren estraktu etanolikoa (Kowalczyk & Biendl, 2016), gehitu ziren eta gelatina film hauetatik antioxidatzaileen askapen kontrolatua ikusi zen. Txerri-gelatina filmetan kurkumaren estraktu etanolikoa ere gehitu zen (Bitencourt et al., 2014). Kurkumak dituen konposatu fenolikoak sustantzia honen aktibitate antioxidatzailearen eta hanturaren aurkako aktibitatearen erantzule dira. Gehigarri hau txerri-gelatina filmetan txertatzean konposatu fenolikoaren eta gelatinaren artean

elkarrekintzak sortu ziren, gelatina filmen ahalmen antioxidatzailea hobetzeaz gain, ultramore-ikuskor argiaren hesi propietateak hobetuz.

1.1 taula Txerri-, behi- eta arrain-gelatinan oinarritutako film aktiboak eta geruzak.

Gelatina	Bioaktiboak	Bioaktibitatea	Erreferentzia
Txerri	Azido askorbikoa	AO	Kowalczyk 2016
	Lupuluaren estraktu etanolikoa	AO	Kowalczyk & Biendl 2016
	Kurkumaren estraktu etanolikoa	AO	Bitencourt et al. 2014
Behi	α -tokoferola, zinamaldehidoa eta baratxuri olio esentzialak	AO	Córdoba & Sobral 2017
	Azenario hondakin zuntza	AO	Iahnke et al. 2015
	Alga marroi estraktua	AO	Kadam et al. 2015
	Oregano eta izpiliku olio esentzialak	AM AO	Martucci et al. 2015
Arrain	Kurkumina/ β -ziklodextrina	AO AM	Sun et al. 2019
	Mango azal estraktua	AO	Adilah et al. 2018
	Tirosola, azido feruliko eta kafeikoa, eta kitosanoa	AO	Benbettaieb et al. 2018
	Henna estraktu urtsua	AM AO	Jridi et al. 2018
	Kanela-azal olio esentziala	AO AM	Kim et al. 2018
	Epigalokatekina galatoa	AO	Nilsuwan et al. 2018
	Kurkumina/ β -ziklodextrina	AO	Wu et al. 2018
	Oliba fenolikoak	AM	Bermúdez-Oria et al. 2017
	<i>Aloe vera</i>	AO	Chin et al. 2017
	Te polifenola	AM AO	Feng et al. 2017
	Eskulina	AO	Liang et al. 2017
	Boldina	AO AM	López et al. 2017
	Kumarina eta kitosanoa	AO	Benbettaieb et al. 2016
	Kitosanoa	AM	Feng et al. 2016
	Kitosano nanopartikulak	AM	Hosseini et al. 2016
Ezkai olio esentziala	AM	Lee et al. 2016	
Menda eta zitronela olio esentzialak	AM	Yanwong & Threepopnatkul 2015	

AO = antioxidatzailea; AM = mikrobioen aurkakoa

Behi-gelatinan mikroorganismoen hazkuntza eragozteko olio esentzialak gehitu izan dira. Zehazki, oregano eta izpiliku olio esentzialak elikagaien hondatzea dakarten bakterioen aurka, bereziki bakterio gram-positiboaren aurka, eraginkorrak direla ikusi zen,

aktibitate antioxidatzaile eta mikrobioen aurkako efektu eraginkorrenak oregano olio esentzialak izanik (Martucci et al., 2015). Gainera, aktibitate antioxidatzaile handiko filmak prestatzeko, α -tokoferola, zinamaldehidoa eta baratxuri olio esentzialak uretan nanoemultsionatu eta behi-gelatina filmetan erabili ziren (Córdoba & Sobral, 2017). Beste gehigarri natural batzuen, hala nola, alga marroi estraktuaren eragina ere aztertu zen behi-gelatina filmetan eta emaitzek erakutsi zuten alga estraktu eduki handiagoak aktibitate antioxidatzailea handiagotzen zuela (Kadam et al., 2015). Bestalde, eguzki-lore olioaren oxidazioa atzeratzen duten behi-gelatina filmak prestatzeko, minimoki prozesatutako azenarioen hondakinak erabili ziren (Iahnke et al., 2015).

Arrain-gelatina filmak eta geruzak ere erabil daitezke elikagaien kalitatea hobetu eta iraungitzea luzatzeko. Hainbat estrategia erabili izan dira xede hau lortzeko. Saretzeak normalean filmen hesi propietateak hobetu eta ur, argi eta kimikoekiko erresistentzia areagotzen du (Azeredo & Waldron, 2016). Horrela, Etxabide et al. (2016a) lanean bakailao arrain-gelatina komertziala laktosarekin saretu zen eta Taghizadeh et al. (2018) lanean berriz, arrain-gelatina filmak eratzeko formulazioan riboflabina gehitu zen argiarekiko sentikorra den saretzea aurrera eramateko. Bi azterketetan argiarekiko hesi propietateak hobetu ziren, film hauek argiaren bidez elikagaietan gerta zitekeen oxidazioa saihesteko potentziala, eta beraz, elikagaien iraungitzea luzatzeko gaitasuna, azalduz. Azken urteotan, uretako hainbat arrain espezieetatik eratorritako gelatinak erabili izan dira propietate antioxidatzaile edota mikrobioen aurkako propietateak dituzten film aktiboak prestatzeko. Horrela, arrain-gelatinan oinarritutako ontziratze aktiboak egiteko olio esentzialak erabili izan dira; zehazki, ezkai (Lee et al. 2016), oregano (Hosseini et al., 2016), eta menda eta zitronela olio esentzialak (Yanwong & Threepopnatkul, 2015), zeinek elikagaien hondatzea dakarten bakterio batzuen aurkako propietateak azaldu zituzten, esaterako, *Staphylococcus aureus* eta *Escherichia coli*-ren aurkako propietateak. Gainera, arrain-gelatinan olibetatik erauzitako polifenolak gehitzean (Bermúdez-Oria et al., 2017)

mikrobioen aurkako ahalmena zuten filmak prestatu ziren eta marrubien iraungitzea luzatu zen. Bestalde, arrain-gelatina filmak eratzeko formulazioan estraktuak ere gehitu izan dira. Adilah et al. (2018) lanean filmak eratzeko formulazioan mango azal estraktua gehitu zen. Horrela, mango azaleko polifenolen, karotenoideen, fitokimikoen, entzimen, C bitaminaren eta E bitaminaren presentzia handiari esker, erradikal askeak ezabatzeko sekulako aktibitatea zuen materiala lortu zen. Aipatzekoa da, mango azalak fruituaren pisu osoaren % 7-24 osatzen duela eta beraz, azpiproduktu hau erabiliz hondakinen murrizpenean laguntzen dela. *Aloe vera* ere arrain-gelatinarekin agente antioxidatzaile bezala erabili zen, eta filmen propietate antioxidatzaileak *Aloe vera* kontzentrazioaren mende zeuden (Chin et al., 2017). Modu horretan, kontrol filmak eta % 9 *Aloe vera*-dun filmak % 66 eta % 75 DPPH eta % 33 eta % 65 ABTS erradikalak ezabatzeko aktibitatea azaldu zuten, hurrenez hurren. Halaber, film aktiboak prestatzeko helburuarekin, tilapia azaletatik erauzitako gelatinadun filmak eratzeko formulazioan te estraktutik lortutako flabonoide nagusienetakoa den epigalokatekina galatoa gehitu zen (Nilsuwan et al., 2018). Epigalokatekina galatoak aktibitate antioxidatzailea eskaintzeaz gain, filmen ultramore argiarekiko hesi propietateak hobetzen zituen, elikagaien iraungitzea esanguratsuki luzatuz. Liang et al. (2017) lanean farmako txinatar tradizional bat erabili zen eskulina, agente antioxidatzaile natural bat, erauzteko; sustantzia hau ondoren gaizkata azaletatik erauzitako gelatinadun filmak eratzeko formulazioan gehitu zen ontziratze gisa erabili eta elikagaiei epe luzeko babesa eskaintzeko. Gainera, antioxidatzaile hau gehitua zuten filmetan lotura ez-kobalenteak sortu ziren eskulinaren talde hidroxilo eta gelatinaren amino azido hondarren artean, propietate kimiko, fisiko eta mekanikoak hobetuz. Halere, antioxidatzaile gehigarri batzuk mugak azaltzen dituzte, hala nola, disolbagarritasun urria izatea; horrelakoa da kurkuminaren kasua. Hau kurkuma rizomaren (*Curcuma zedoaria*) konposatu bioaktibo nagusia da eta elikagaigintzan erabilera onartua duenez, espezie, elikagai kontserbatzaile, gozatzaile eta koloratzaile gisa erabiltzen da. Wu et al. (2018) eta Sun et al. (2019) lanetan disolbatzeko arazoari aurre egiteko kurkumina β -ziklodextrinan kapsulatu zen eta

konplexua zilarrezko karpa arrainaren azalarekin elkartu zen film aktiboak eta geruzak prestatzeko, hurrenez hurren. Gainera, kurkuminak mikrobioen hedapena eragotz zezakeela behatu zen. Aktibitate antioxidatzailearen eta mikrobioen aurkako aktibitatearen konbinazio hau arrain-gelatinarekin erabiltzen diren beste zenbait gehigarritan ere gertatzen da, hala nola, kanela-azal olio esentzian (Kim et al., 2018), henna estraktu urtsuan (Jridi et al., 2018) eta te polifenoletan (Feng et al., 2017). Bestalde, arrain-gelatina espezie batzuk berezko mikrobioen aurkako efektua edo aktibitate antioxidatzailea daukate, esaterako, Atlantikoko izokinak (López et al., 2017) edo txokoak (Kchaou et al., 2017), hurrenez hurren.

Arrain-gelatina film eta geruzetan saretze agenteak, mikrobioen aurkako gehigarriak eta antioxidatzaileak gehitzeaz gain, arrain-gelatina beste polimero batzuekin, polisakaridoak kasu, nahastea baliagarria izan daiteke elikagaien iraungitzearen luzapena lortzeko. Adibidez arrain-gelatina eta kitosanoa, mikrobioen aurkako berezko propietateak dituen polimeroa, bateragarriak direla ikusi izan da. Kitosanoa positiboki eta gelatina negatiboki kargatuta daudenean, pH baldintza egokietan, biopolimero hauek lotura elektrostatiko eta hidrogeno zubizko lotura bidez elkarrekintzak eduki ditzakete. Hortaz, tilapia arrain-gelatina/kitosano geruzak aztertu ziren eta miosina kate arinen eta mioglobinen degradazioa saihestuz, 4 °C-an urrezko palometa xerren hondatzea esanguratsuki atzeratzen zutela ikusi zen (Feng et al., 2016). Gainera, antioxidatzaile naturalen (azido ferulikoa, azido kafeikoa) gehitzearekin azido kafeikodun edo azido kafeiko-feruliko nahastedun arrain-gelatina/kitosano filmetan erradikalak ezabatzeko aktibitate handia lortu zen (Benbettaïeb et al., 2018).

1.5 Etorkizuneko ikuspegia eta ondorio nagusiak

Biohondakin kantitate handiak sortzen dira elikagai industrian. Biohondakin hauei balioa eman dakieke, elikagaien ontziratzerako eta biomaterialen ekoizpenerako lehengai gisa erabiliz. Horrela, ez-berriztagarriak eta ez-biodegradagarriak diren materialen erabilera gutxi daiteke jasangarritasunaren printzipioekin bat egirik.

Kolagena eta kitina bezalako biopolimeroek garrantzia hartu dute naturan ugariak direlako eta hauek arrantzako hondakin eta azpiproduktuetatik erauzteko aukera dagoelako. Biopolimero hauetatik gogoko ez diren sustantziak kentzeko eta gelatina eta kitosanoa erauzteko eraldatze kimiko edota biologikoak erabiltzen dira. Gaur egun, polimero hauen prozesatzea industria mailara igo da eta material hauek salgai daude merkatuan. Biopolimeroen erauzketaz gain, ontziratze aktiboetan eta biomedikuntzako aplikazioetan erabilgarriak diren zenbait konposatu bioaktibo elikagai industriako beste hondakin edo azpiproduktu batzuetatik erauz daitezke.

Material jasangarri berriak sortzeko landare eta animalia proteinak etorkizun handiko irtenbidea direla uste da. Proteinak jangarriak, berriztagarriak eta ingurumenarekiko lagunkoiak dira eta ezaugarri horiei esker besteak beste filmak, sareak edo scaffold-ak sortzeko lehengai egokiak dira. Testuinguru honetan, diseinu gabeko eta diseinudun fabrikazio teknikak erabili izan dira proteinazko materialak prestatzeko. Horrela, disoluzio metodoa edo konpresio bidezko moldaketa erabiliz prestatutako filmak elikagaien ontziratze aplikazioan erabiltzen dira iraungitzea luzatzeko, baina baita biomedikuntzako aplikazioetarako ere, zaurien sendatzerako adibidez. Elektrohariketa bidez lortutako zuntzdun sareak bioaktiboen kapsulatzerako erabil daitezke, elikagaigintzan zein aplikazio biomedikuetarako. Liofilizazioa edo 3D inprimaketa erabiliz lortutako scaffold-ak berriz, gehienbat aplikazio biomedikuetarako erabiltzen dira, hala nola, ehun-ingeniaritzan. Disoluzio metodoaren, konpresio bidezko moldaketaren eta elektrohariketaren bitartez bioaktiboen gehitzea sakon aztertu bada ere, teknika berriagoek, esaterako, 3D inprimaketak, analisi sakonagoa behar dute bioaktiboen gehitzearen onurak maximizatzeko. Proteinan oinarritutako produktuen ekoizpenean berrikuntza teknologikoak garatu diren arren, azaltzen diren zenbait ingeniaritza mugei aurre egiteko ikerketa gehiagoren beharra dago. Muga hauek proteina produktuak prototipoetatik bolumen handiko manufaktura prozesuetara pasatzean, hots, industria mailara igo nahi denean, azaltzen dira.

Animalia proteinei dagokienez, gelatina elikagaien ontziratzeetako materialak prestatzeko iturri potentzial gisa azaldu izan da. Hau plastikozko materialen ordezkotik posiblea izan daiteke, batik bat denbora laburrerako edo erabilera bakarreko aplikazioetan, izan ere, plastikozko materialak iturri ez-berriztagarritik datoz eta euren erabilera amaitzen denean ingurumen arazoak sortzen dituzte. Beraz, gelatinazko filmak, eta bereziki arrain-gelatinazko materialak, elikagaien ontziratze jasangarriagoak edukitzeko aproposak izan daitezke.

2 Materialak eta metodoak

2.1 Materialak eta errektiboak

Arrain-gelatina komertziala (A mota, 240 bloom, 125-150 kDa), Healan Ingredients-ek (East Yorkshire, Ingalaterra) emana, materialen formulazioko sustantzia nagusia zen. Gelatinaren amino azido konposizioa **2.1 taulan** azaltzen da. Bioaktibo gisa berriz, honako sustantzia hauek erabili ziren: Panreac-en (Bartzelona, Espainia) erositako azido zitriko anhidroa, Sigma-Aldrich-ek (Madril, Espainia) hornitutako pisu molekular altuko kitosanoa (deazetilazio gradua > % 75), bertako merkatuan erositako aza moretik (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) erauzitako antozianinak eta Sabinsa Europe GmbH-ek (Langen, Alemania) emandako tetrahidrokurkumina (THC). Plastifikatzaile moduan Panreac-ek (Bartzelona, Espainia) hornitutako % 99,01eko purutasuneko glizerola erabili zen eta sendotze-agente gisa β -kitina, Kantauri itsasoan (Espainia) arrantza-denboraldian (Martxoa-Abuztua) arrantzatutako eta bertako merkatuak eskuzabaltasunez emandako txibia lumetatik (*Loligo* sp.) erauzia. 3. kapituluan txerri-gelatina (A mota, 280 bloom) erreferentzia moduan erabili zen, hau Italgelatine SpA-tik (Cuneo, Italia) lortua. Formulazio guztietan ur destilatua erabili zen.

Elikagai-simulatzaile gisa % 50 etanol soluzioa baliatu zen, zeina Panreac-ek (Bartzelona, Espainia) hornitutakoa zen. Sodio bikarbonatoa, sodio hidroxidoa, azido klorhidrikoa, azido 2,4,6-trinitrobenzenosulfonikoa (TNBS) eta dietil eterra Sigma-Aldrich-en (Milan, Italia) erosi ziren saretze hedadura azertu ahal izateko. Azetonitriloa, azido formikoa eta ura, Fisher Scientific-ek (Fair Lawn, NJ, AEB) hornitutakoak, errendimendu ultra-handiko likidoen kromatografian (UHPLC) erabili ziren. Sigma-Aldrich Chemie-tik (Steinheim, Alemania) eskuratutako enzefalin hidratatu leuzin azetatoa (% 95eko purutasuna) eta 0,1 M sodio hidroxido soluzioa, eta Merck-en (Darmstadt, Alemania) erositako azido trifluoroazetikoa ere erabili ziren. 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) eta α -tokoferol sustantziak Sigma-Aldrich-ek (Saint-Louis, AEB), etanola Scharlab-ek (Bartzelona, Espainia) eta metanol purua VWR

international-ek (Fontenay-sous-Bois, Frantzia) hornituak, aktibitate antioxidatzailearekin lotutako parametroak aztertzeko erabilera ziren.

2.1 taula Arrain-gelatinaren aminoazidoen konposizioa, ioi-trukearen kromatografia bidez lortua.

Arrain-gelatinako aminoazidoak	Konposizioa (%)
Azido aspartikoa	4,3
Treonina	2,1
Serina	2,8
Azido glutamikoa	7,2
Prolina^a	19,7
Glizina	33,7
Alanina	13,8
Zisteina	-
Balina	1,7
Metionina	1,5
Isoleuzina	0,6
Leuzina	2,4
Tirosina	0,4
Fenilalanina	1,5
Histidina	0,5
Lisina^b	3,0
Arginina	4,7
Triptofano	-

^aProlina eta hidroxiprolinaren balioa

^bLisina eta hidroxilisinaren balioa

2.2 Antozianinen erauzketa

Antozianinak ohiko solido-likido erauzketa bat, ura disolbatzaile gisa erabiltzen deneko Soxhlet erauzketa bat, eginez erauzi ziren. Aza morea moztu, izoztu eta liofilizatu egin zen hautsa lortu eta beraz, iragazkiak errazago bete ahal izateko eta prozesua eraginkorragoa izateko. Erauzketa bitan errepikatu zen eta lortutako likidoa, batik bat ur eta antozianinez osatua, izoztu eta liofilizatu egin zen. Erauzitako antozianina hautsak lehorgailu batean ontziratuta eta argitik babestuta gorde ziren.

2.3 Kitinaren erauzketa

Kitina isolatu aurretik organiko disolbagarriak eta ezpurutasunak kentzeko, bildutako txibia lumak urarekin garbitu ziren. Jarraian, lumak izoztu eta -20 °C-an gorde ziren erabiltzeko unerarte. Prozesatu baino lehen lumak desizoztu, 1 × 2 cm²-tako zatietan moztu eta giro tenperaturan lehortzen utzi ziren. Txibia lumak NaOH-rekin (1 M) tratatu ziren 1:20 (w/v) erlazioan, 24 orduz, giro tenperaturan eta nahaste jarraitua erabiliz, jatorrizko kitinaren degradazioa eta desazetilazioa ekidinez. Ondoren, nahastea iragazi eta frakzio solidoa (β -kitina) hainbat aldiz ur destilatuarekin garbitu zen pH neutroa lortu arte. Azkenik, β -kitina hautsa lortu ahal izateko, eskuratutako frakzio solidoa izoztu, liofilizatu eta ehotu zen.

2.4 Sareen, filmen eta liofilizatutako laginen prestaketa

Hiru motatako materialak aurki daitezke ikerketa lan honetan: mat izenez ezagutzen diren elektroharikatutako sareak, disoluzio metodoaren edo konpresio bidezko moldaketaren bidez prestatutako filmak, eta liofilizatutako laginak. Atal honetan material hauen prestaketa burutzeko erabilitako pausuak azaltzen dira.

2.4.1 Elektrohariketa

Arrain-gelatina soluzioa (FG soluzioa) prestatzeko gelatina, azido zitrikoa eta ur destilatua 40 minutuz 50 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran nahastu ziren; erabilitako azido zitriko/gelatina/ura masa proportzioa 0,9:1,0:3,0 izan zen. Lehen soluzio honen pH-a aldatzeko NaOH gehituz nahaste berri bat sortu zen (FG+NaOH soluzioa) prestatze baldintza berdinetan (50 °C eta 200 bira minutuko abiadura 40 minutuz). Kasu honetan erabilitako azido zitriko/gelatina/ura masa proportzioa 0,9:1,0:2,3 izan zen eta jarraian 0,7 mL NaOH (5 M) gehitu ziren. Soluzioen pH-a kalibratutako pH-metro baten (XS Instrument pH7) laguntzaz neurtu zen. FG-ren eta FG+NaOH-ren pH-ak 1,8 eta 3,7 ziren, hurrenez hurren. Arrain-gelatina soluzioen konposizioak azterketa erreologiko bitartez, txerri-gelatina soluzio bat oinarri gisa hartuz (PG soluzioa), aukeratu ziren. Aipatutako txerri-gelatina soluzio hau Panzavolta et al.

(2011) lanean azaldu bezala prestatu zen: disolbatzaile moduan azido azetiko eta ur destilatu soluzioa (% 60/40 v/v azido azetiko/ur destilatu) erabili zen % 30 w/v kontzentrazioan eta nahastea 60 minutuz 50 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran irabiatu zen.

Arrain-gelatinazko sareak elektrohariketa teknikaren bidez prestatu ziren. Ekipoak tentsio altuko energia hornitzailea (Spellman SL 50 P 10/CE/230), xiringa ponpa (KD Scientific 200 series), eta tefloizko hodi batekin elkartutako beirazko xiringa eta altzairu herdoilgaitzezko orratza (barne diametroa = 0,51 mm) zituen. Elektrohariketa giro tenperaturan eta % 40-50eko hezetasun erlatiboan burutu zen. FG honako baldintzetan elektroharikatu zen: aplikatutako potentzial elektrikoa = 20 kV, fluxu abiadura = 0,3 mL/h eta xiringa-euskarri arteko distantzia = 15 cm. NaOH gehitzean biskositatea handitzen zenez, FG+NaOH elektroharikatzeko baldintzak zertxobait aldatu ziren, potentzial elektrikoa 23 kV-tara igoz eta fluxu abiadura 0,1 mL/h-ra mantsotuz. Sareak prestatu ondoren, hauetako batzuk termikoki tratatu ziren 30 minutuz, hutsean eta 80 °C-an mantenduz. Propietateak aztertu baino lehen, lortutako sare guztiak lehorgailu batean 4 °C-an gorde ziren.

2.4.2 Disoluzio metodoa

Disoluzio metodoaren bidez prestatutako **arrain-gelatinazko filmetan** lehendabizi gelatina eta azido zitrikoa ur destilatuan nahastu ziren. Lan honetan erabilitako azido kantitateak % 10, 20, 30 eta 40 (gelatina idorreriko, masa portzentajearen arabera) izan ziren. Nahasteak 30 minutuz berotu ziren, 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran. Ondoren, plastifikatzaile moduan % 20 glizerol (gelatina idorrarekiko, masa portzentajearen arabera) eta jarraian pH 10eko ingurune basikoa izateko NaOH (1 M) gehitu zitzaizkien nahastei. Berotze prozesua errepikatu egin zen eta azkenik, nahasteak Petri ontzietara isuri ziren, eta ontzi bakoitzeko edukia 48 orduz giro tenperaturan lehortzen utzi zen. Filmen izendapena zuten azido kantitatearen

araberakoa izan zen: 0CA, 10CA, 20CA, 30CA eta 40CA. Azidorik gabe prestatutako filmak (0CA) kontrol gisa erabili ziren.

Arrain-gelatina/kitosano konposite filmak ere disoluzio metodoaren bidez prestatu ziren. Hasieran, % 10 eta 20 azido zitriko (gelatina idorreriko, masa portzentajearen arabera) soluzioak prestatu ziren. Kontzentrazio hauek disoluzio metodoaren bidez prestatutako arrain-gelatinazko filmen aurreko ikerketan (Uranga et al. 2016) oinarrituz aukeratu ziren. Jarraian, kitosanoa 100 mL azido zitriko soluziotan disolbatu zen eta 30 minutuz irabiatzen mantendu zen. Ondoren, 5 g gelatina gehitu ziren eta lortutako soluzioa 30 minutuz berotu zen 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran. Segidan, plastifikatzaile moduan % 20 glizerol (gelatina idorrarekiko, masa portzentajearen arabera) eta ingurunearen azidotasuna gutxitu eta pH-a 4,5era egokitzeko NaOH (1 M) gehitu ziren. Azkenik, berotze prozesua errepikatu zen, soluzioa 30 minutuz, 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran nahastuz. Filma eratzeko soluzioak Petri ontzietara isuri ziren eta hauek, aurretik azaldu den bezala, 48 orduz giro tenperaturan lehortzen utzi ziren. Erabilitako kitosano kantitateak % 0, 3, 6 eta 9 (gelatina idorrarekiko, masa portzentajearen arabera) izan ziren, eta filmen izendapena 10CAXCHI edo 20CAXCHI moduan egin zen, % 10 eta 20 azido zitriko zuten filmentzat, hurrenez hurren, kitosano kantitatearen (X) arabera. Gainera, azido zitrikorik eta kitosanorik gabeko kontrol filmak (0CA0CHI) prestatu ziren.

Propietateak aztertu baino lehen, film guztiak 25 °C-an eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren. Filmek lodiera 0,001 mm-ko zehaztasunarekin neurtu zen, eskuz heldu daitekeen QuantuMike digimatic mikrometro baten laguntzaz (Mitutoyo Spain, Elgoibar, Espainia). Arrain-gelatinazko filmek kasuan 116 ± 29 µm-ko balioak eta arrain-gelatina/kitosano konpositeen kasuan 50 ± 2 µm-ko emaitzak lortu ziren.

2.4.3 Konpresio bidezko moldaketa

Antozianinak gehituta zituzten filmak konpresio bidezko moldaketa erabiliz prestatu ziren. Lehenik, sustantzia guztiak nahastu ziren: 5 g gelatina, % 40 ur, % 20 glizerol, % 10 azido zitriko eta % 10 antozianina, ehuneko guztiak gelatina idorrarekiko eta masa portzentajearen arabera adieraziak. Ondoren, nahasteak termikoki trinkotu ziren lehendik 60 °C-raino berotua zegoen laborategi mailako prentsa erabiliz eta 2 minutuan 0,8 MPa-eko presioa aplikatuz; baldintzak aurretiazko azterketa batzuei esker finkatu ziren. Propietateak aztertu baino lehen, film guztiak 25 °C-an eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren. Filmen lodiera 0,001 mm-ko zehaztasunarekin neurtu zen, eskuz heldu daitekeen QuantuMike digimatic mikrometro baten laguntzaz (Mitutoyo Spain, Elgoibar, Espainia) eta $86 \pm 7 \mu\text{m}$ -ko batezbesteko balioak lortu ziren.

2.4.4 Liofilizazioa

Liofilizazio metodoaren bidez prestatutako **kitina eta THC gehitua zuten arrain-gelatinazko laginak 2.2 taulan** daude zerrendatuta. Arrain-gelatina soluzioak (3,5 g gelatina 50 mL ur destilatuan) azido zitriko, kitina eta THC gehigarriekin nahastu ziren 30 minutuz, 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran. Ondoren, glizerola gehitu zen eta pH-a 10 baliora doitu zen NaOH (1 M) erabiliz.

2.2 taula Liofilizatutako laginen konposizioa.

Lagina	Arrain-gelatina (% w/v)	Azido zitrikoa (% w/w)	Glizerola (% w/w)	Kitina (% w/w)	THC (% w/w)
Kontrola	7	20	20	0	0
CHI15	7	20	20	15	0
CHI30	7	20	20	30	0
CHI15-THC	7	20	20	15	5
CHI30-THC	7	20	20	30	5

Arrain-gelatinaren portzentajeak urarekiko daude adierazita; gehigarrien portzentajeak gelatina idorrarekiko daude adierazita.

Beste 30 minutuz soluzioak 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran irabiatu ziren eta soluzio bakoitza 24 kikara dituen plaka batera isuri zen. Plakak hozkailuan

4°C-an mantendu ziren soluzioak hoztu ahal izateko. Behin soluzioak gel bihurtuta, plakak izozkailu batean -23 °C-an mantendu eta jarraian, 48 orduz liofilizatu (Alpha 1-4 LDplus, CHRIST, Alemania) egin ziren. Azkenik, liofilizatutako gelatinazko laginak (1,5 cm-ko diametroa eta 1 cm-ko altuera) kikaretatik atera ziren.

2.5 Ebaluazio erreologikoa

Elektrohariketa-soluzioen neurketa erreologikoa erreometro birakorrean (Anton Paar MCR 102) xafla-xafla konfigurazioa erabiliz burutu ziren. Saiakuntzetako temperatura Peltier sistema integratuaren eta Julabo AWC100 hozte sistemaren laguntzarekin konstante mantendu zen 25 °C-an. Laginak hidratatuta mantentzeko soluzio-tranpa bat (H-PTD200) erabili zen. Denboran zeharreko neurketa oszilakorrak egin ziren, tentsio anplitudea % 0,3-an eta frekuentzia angeluarra 1 rad/s-an mantenduz.

2.6 Gainazalaren eta egituraren karakterizazioa

2.6.1 Mikroskopia optikoa (OM)

Elektrohariketa prozesuan zehar zuzenean beira xaflatan elektroharikatutako zuntzak hautemateko polarizatutako mikroskopia optikoa (Zeiss Axioscop) erabili zen.

2.6.2 Ekorketazko elektro-mikroskopia (SEM)

Elektroharikatutako materialen morfologia 515 ekorketazko elektro-mikroskopia (Philips) erabiliz aztertu zen, 15 kV-tako azelerazio tentsiopean. Laginak bi aldeko zinta itsasgarriaren laguntzaz metalezko oinarrian kokatu ziren eta behaketa aurretik urrez estali ziren. Analisi hau sareen fabrikazio egin eta 24 ordura burutu zen. Zuntzen diametroen distribuzioa (batezbestekoa eta desbiderapena) neurtzeko ImageJ softwarean 50 zuntz inguru aztertu ziren.

Bestalde, antozianinadun filmen zeharkako sekzioen morfologia bistaratzeko eta kitinadun laginen morfologia ezagutzeko emisio-eremuzko S-4800 (Hitachi High-Technologies Corporation) ekorketazko elektro-mikroskopia erabili zen. Konposizio bakoitzeko laginak bi aldeko zinta itsasgarriaren laguntzaz metalezko oinarrian kokatu

ziren eta behaketa aurretik urrez estali ziren (JFC-1100) argoizko ingurune hutsean. Antozianinadun filmak 5 kV-tako azelerazio tentsiopean aztertu ziren eta kitinadun laginak oster, 10 kV-tako azelerazio tentsiopean. Gainera, poroen tamainaren ebaluaziorako ImageJ softwarea erabiliz SEM irudiak aztertu ziren.

2.6.3 Angelu zabalen X izpien difrakzioa (WXR)

Elektroharikatutako sareen WXR analisi X'Celerator detektagailuz ekipatutako hauts difraktometroa (PANalytical) erabiliz gauzatu zen. Erradiazioa CuK_α ($\lambda = 0,15418 \text{ nm}$) iturritik (40 mA, 40 kV) sortu zen. WXR datuak 5° eta 60° tarteko 2θ balioetatik lortu ziren, non θ laginarekiko X-izpiaren elektro-sortaren eraso-angelua den.

2.7 Karakterizazio fisiko-kimikoa

2.7.1 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)

FTIR analisisia Nicolet Nexus FTIR espektrofotometroan burutu zen, Golden Gate (Specac) ATR osagarria erabiliz. Guztira 32 ekorketa egin ziren 4 cm^{-1} -eko erresoluzioarekin, 800 eta 4000 cm^{-1} -eko uhin-zenbakien tartean. Espektroak leuntzeko Savitzky-Golay funtzioa erabili zen. Kurben egokitze prozedurarako, banden posizioen gidan amida zonako espektroaren bigarren deribatua erabili zen, Byler & Susi (1986) lanean azaldutako prozedura kontuan izanik, OriginPro 9.1 softwarearen laguntzaz.

2.7.2 Saretze hedadura

Elektroharikatutako materialen saretze hedadura ezagutzeko Panzavolta et al. (2011) lanean azaldutako metodoa erabili zen. Konposizio bakoitzeko hiru lagin aztertu ziren. Hitz gutxitan, sare ezberdinetan eta arrain-gelatinan (erreferentzia gisa) ϵ -amino talde askeen UV analisisia egin zen. Laginak % 0,5 TNBS-rekin erreakzionatu ondoren gelatina HCl (6 M) erabiliz hidrolizatu eta etil eterraren laguntzarekin erauzi zen. Soluzio diluituaren absorbantzia 346 nm -an neurtu zen zuri batekin alderatuz. ϵ -amino talde askeak gelatina gramoko jarraian azaldutako ekuazioaren bidez kalkulatu ziren:

$$[\text{NH}_2] = \frac{2 \cdot A \cdot V}{\varepsilon \cdot b \cdot x}$$

non A laginaren absorbantzia, V laginaren amaierako bolumena (L), ε TNP-lys elkarketaren absortzio molarra, zehazki $1,46 \times 10^4$ L/(mol·cm), b gelaxkarainoko bidearen luzera (cm) eta x laginaren pisua (g) diren.

Saretze hedadura gelatina sareetan erreakzionatutako ε -amino taldeen molen (saretzea gertatu aurretik eta ondoren aske dauden taldeen diferentzia zehaztuz lortutako baloreak) eta arrain-gelatinako ε -amino taldeen molen arteko proportzioa kontuan hartuz zehatz zitekeen.

2.7.3 Hezetasun edukia (MC) eta disolbaturiko masa totala (TSM)

MC zehazteko konposizio bakoitzeko hiru lagin pisatu ziren (w_0) eta jarraian laginak 105 °C-an 24 orduz labe batean lehortu ziren. Denbora hori igaro ostean, laginak berriz ere pisatu ziren (w_1) beraien MC zehazteko:

$$\text{MC (\%)} = \frac{w_0 - w_1}{w_0} \cdot 100$$

TSM balioak lortzeko, lagin lehorrak 200 mL ur destilatuan murgildu ziren 24 orduz. Ondoren, laginak labean lehortu ziren 105 °C-an beste 24 orduz eta labetik ateratako film horiek pisatu ziren (w_2). TSM balioak jarraian azaldutako ekuazioa erabiliz kalkulatu ziren:

$$\text{TSM (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \cdot 100$$

2.7.4 Puzte gaitasunaren neurketak

Arrain-gelatina/kitosano konposite filmen puzte gaitasuna analizatzeko, lehenik konposizio bakoitzeko hiru disko ($\varnothing = 52$ mm) pisatu (w_H) eta ur destilatuan murgildu ziren. Ondoren, laginak denbora zehatz batzuetan uretatik atera eta pisatu egin ziren

(w_T), prozedura balio konstanteak lortu arte errepikatuz. Puzte gaitasuna (S) ondorengo ekuazioa erabiliz kalkulatu zen:

$$S (\%) = \frac{w_T - w_H}{w_H} \cdot 100$$

Kitinadun laginen puzte gaitasuna ere kalkulatu zen konposizio bakoitzeko hiru lagin % 50 etanol soluzioan murgildu eta azaldutako prozedura errepikatuz.

2.8 Karakterizazio termikoa

2.8.1 Analisi termograbitmetrikoa (TGA)

Laginen egonkortasun termikoa TGA erabiliz aztertu zen eta neurketak Mettler Toledo TGA SDTA 851 (Mettler Toledo S.A.E.) ekipoa egin ziren. Laginak 25 °C-tik 800 °C-ra berotu ziren, 10 °C/min-ko berotze-abiadurarekin eta erreakzio termo-oxidatzaileak ekiditeko ingurune inerteetan (10 mL N₂/min).

2.8.2 Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC)

DSC analisia Mettler Toledo DSC 822 (Mettler Toledo S.A.E.) ekipoa egin zen. Laginak (3,0 ± 0,2 mg) hermetikoki itxitako aluminiozko kapsuletan sartu ziren, berotzerakoan masa galerak ekiditeko. Lagindun kapsulak 25 °C-tik 250 °C-ra berotu ziren 10 °C/min-ko berotze-abiadura eta erreakzio termo-oxidatzaileak ekiditeko ingurune inerteetan (10 mL N₂/min).

2.9 Propietate optikoak

2.9.1 Kolore-neurketak

Kolore parametroak (L*, a*, b*) CR-400 Minolta Chroma-Meter kolorimetroa (Konica Minolta) erabiliz zehaztu ziren. Filmak plater zuri estandar baten gainean jarri ziren (kalibrazio plateraren balioak: L* = 97,39, a* = 0,03 eta b* = 1,77) eta kolore parametroak CIELAB kolore eskala erabiliz neurtu ziren: L* = 0-tik (beltza) L* = 100-era (zuria), -a*-tik (berdetasuna) +a*-ra (gorritasuna), eta -b*-tik (urdintasuna) +b*-ra

(horitasuna). Konposizio bakoitzeko laginetan bost neurketa egin ziren. Kolore aldaketa (ΔE^*) ondorengo formula bidez kalkulatu zen erreferentzia gisa kontrol filmak kontuan hartuta:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

2.9.2 Distira-neurketak

Filmen distira neurtzeko Multi Gloss 268 Plus distirametroa (Konica Minolta) erabili zen. Distira balioak 60° -an neurtu ziren, ASTM D523-14 (ASTM, 2014) arauari jarraituz. Konposizio bakoitzeko laginetan hamar neurketa egin ziren.

2.9.3 Ultramore-ikuskor (UV-vis) espektroskopia

Argi xurgapena izpi ultramore eta ikuskorren eremuan neurtu zen (200-800 nm) V-630 UV-vis espektrofotometroa (Jasco) erabiliz. Gardentasun (T) balioak jarraian azaldutako ekuazioarekin kalkulatu ziren:

$$T = \frac{A_{600}}{x}$$

non A_{600} 600 nm-ko xurgapen balioa eta x filmaren lodiera (mm) diren.

2.10 Hesi-propietateak eta hezetasun absortzioa

2.10.1 Ur-ukipen angelua (WCA)

WCA-ren balioak OCA20 kontaktu-angelu sistema (DataPhysics Instruments) erabiliz lortu ziren. Neurketa bakoitzean 3 μL -ko ur destilatu tanta bat filmaren gainazalean ezarri zen. Tantaren irudia SCA20 softwarea erabiliz lortu zen. Konposizio bakoitzeko bost neurketa egin ziren.

2.10.2 Ur lurrunaren iragazkortasuna (WVP)

WVP balioak neurtzeko PERME™ W3/0120 (Labthink instruments Co. Ltd.) hezetasuna kontrolatua zuen ganbera klimatikoa erabili zen. Film diskoak ($\varnothing = 7,4$ cm) ur destilatudun ontzitxoetan ipini ziren, hiru lagin konposizio bakoitzeko. Ontzitxo hauek

ekipoan ipini ziren, ASTM E96-00 arauak (ASTM, 2000) ezartzen zituen baldintza zehatzetan, 38 °C-an eta % 90eko hezetasun erlatiboan. WVP analisi grabimetriko bidez neurtu zen, jarraian adierazi bezala:

$$WVP \left(\frac{g}{s \cdot cm \cdot Pa} \right) = \frac{w \cdot x}{A \cdot t \cdot \Delta P}$$

non w pisu aldaketa (g), x film lodiera (cm), A film azalera (cm²), t denbora (s) eta ΔP filmean zeharreko baporearen presio diferentzia (Pa) diren.

2.10.3 Hezetasun absortzioaren zinetika

Kitinadun laginen hezetasun absortzioa Bovi et al. (2018) laneko metodoan oinarrituz eta zenbait aldaketa eginez gauzatu zen. Konposizio bakoitzeko hiru lagin aztertu ziren. Lehenik, laginak lehorgailu batean lehortu ziren eta jarraian, ganbera batean sartu ziren giro tenperaturaren eta % 100 hezetasun erlatiboan, muturreko hezetasun baldintzak simulatzeko. Hezetasun absortzioa grabimetrikoki zehaztu zen, 31 egunetan zehar masaren hazkuntza bitarte erregularretan neurtuz. Hezetasun absortzioa (MA) jarraian azaldu bezala kalkulatu zen:

$$MA \left(\frac{g \text{ ur}}{g \text{ lagin}} \right) = \frac{w_{tm} - w_i}{w_i}$$

non w_i eta w_{tm} laginen hasierako eta denbora zehatzetako pisuak (g) diren, hurrenez hurren.

MA kalkulatu ondoren, Weibull eredu probabilistikoa erabili zen hezetasun absortzioa versus denbora kurbak osatzeko:

$$MA = M_0 + (M_\infty - M_0) \cdot \left[1 - e^{\left(\frac{-t}{\beta_1} \right)} \right]$$

non M_0 laginen hasierako hezetasun edukia (g ur/g lagin) den, zeinak zero balioa hartzen zuen laginak aurretik lehortuak izan zirelako; M_∞ orekan hezetasuna eusteko gaitasuna (g ur/g lagin) den; eta β_1 hezetasun absortzioaren abiadura definitzen eta absortzio

prozesuaren % 63 ingurua lortzeko beharrezkoa den denbora errepresentatzen duen parametro zinetikoa den. Beraz, Weibull ereduak MA datu esperimentalak izanik M_{∞} estimatzeko aukera eskaintzen du.

2.11 Propietate mekanikoak

2.11.1 Trakzio entsegua

Trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB) 250 N-eko zelula kargadun Insight 10 sistema elektromekanikoarekin (MTS Systems) zehaztu ziren. Erabilitako entsegu abiadura 1 mm/min izan zen eta aztertutako laginak 22,25 mm-tako luzera eta 4,75 mm-tako zabalera zuten probetak izan ziren, ASTM D638-03 (ASTM, 2003) arauari jarraituz. Konposizio bakoitzeko bost lagin aztertu ziren.

2.11.2 Konpresio entsegua

Kitinadun laginen konpresio entseguak 30 kg-ko zelula kargadun TA XT plus Texture Analyser (Stable Micro Systems) ekipoa egin ziren. Entsegua 1017,88 m²-ko ukipen azalera duen 36 mm Dia Aluminium Radiused AACC zundarekin egin zen. Erabilitako entsegu abiadura eta aktibazio indarra 1 mm/s eta 0,01 N izan ziren, hurrenez hurren; softwarea berriz, Exponent. Kitinadun laginak lehenik lehorgailu batean lehortu ziren 24 orduz eta jarraian ganbera batean sartu ziren (% 100 hezetasun erlatiboan eta giro tenperaturan) 6 egunez, hezetasun absortzioaren % 63 inguru xurgatzea lortzeko. Konposizio bakoitzeko hiru lagin hezeren konpresioarekiko erresistentzia aztertu zen giro tenperaturan eta karga, laginak euren jatorrizko altueraren % 80 ingurura konprimatu arte aplikatu zen. Lehen azterketa honen ondoren, laginek euren hasierako tamaina berreskuratzen zuten. Beraz, laginak berriz ganbera batean sartu ziren (% 100 hezetasun erlatiboan eta giro tenperaturan) 11 egunez, hezetasun absortzioaren % 100 inguru xurgatzea lortu eta bigarren saiakuntza bat egiteko. Bi azterketetako emaitzekin tentsioa (MPa) versus deformazioa (%) kurbak lortu ziren.

2.12 Bakterioen aurkako analisisia

Arrain-gelatina/kitosano konposite filmen bakterioen aurkako aktibitatea Gram-negatiboa den *Escherichia coli* DH5 α -ren hazkuntzaren aurka aztertu zen, azido zitrikoaren eta kitosanoaren eragina analizatuz. *E. coli*-ren gaueko hazkuntza Luria Bertani (LB) salda batean (Sambrook et al., 1989) egin zen, 37 °C-an eta irabiatuz (160 bira minutuko abiaduran). Ondoren, LB ingurune berrian inokulatu eta fase erdi-esponentzial arte hazten utzi zen 37 °C-an; hau 0,04 g film zituen 10 mL-ko ingurune batean inokulatu zen, 24 orduz 37 °C-an eta 160 bira minutuko abiaduran inkubatuz. Filmek konposizio bakoitzaren analisirako esperimentuak bi aldiz errepikatu ziren. Kultiboetatik laginak 5 orduan hartu ziren, izan ere, *E. coli* aktiboki hazten zen denbora honen ostean. Diluzio metodoa erabili zen zelulen bideragarritasuna monitorizatzeko, LB agarra zuten platerak 37 °C-an inkubatuz eta emaitzak CFU/mL gisa adieraziz.

2.13 Antozianinen karakterizazioa UHPLC-Q-TOF-MS/MS analisi bidez

Laginak % 0,1 azido trifluoroazetiko ur disoluzioan disolbatu bezain laster, errendimendu ultra-handiko likidoen kromatografia (UHPLC) gauzatu zen ACQUITY UPLC™ sistema (Waters, Milford, MA, AEB) erabiliz. Antozianina bakoitzaren bereizketa egiteko Waters (Milford, AEB) etxeko alderantzizko fase zutabea (Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 mm \times 100 mm) eta aurre-zutabea (Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m VanGuard™) erabili ziren 40 °C-an. Erabilitako fluxu abiadura 0,25 mL/min izan zen eta injekzio bolumena, berriz, 7,5 μ L. Fase mugikorra honela osatua zegoen: % 0,1 azido trifluoroazetiko uretan (A) eta % 0,1 azido trifluoroazetiko azetonitriloan (B). Bereizketa 17 minututan burutu zen, jarraian azaldutako baldintzetan: 0,00-3,17 min, B % 5etik % 15era gradiente lineal batean; 3,17-5,43 min, B % 15; 5,43-6,00 min, B % 15etik % 20ra gradiente lineal batean; 6,00-12,00 min, B % 20tik % 21era gradiente lineal batean; 12,00-13,00 min, B % 21etik % 100era gradiente lineal batean; bukatzeko, zutabearen garbiketa eta berriz orekatzea egin ziren hurrengo injekzioaren aurretik. Lagin guztiak 4 °C-an mantendu ziren analisisian zehar. PDA detektagailuaren uhin-luzera

tartea 210-500 nm-koa zen (20 Hz, 1,2 nm-ko bereizmena). Antozianinak 500 nm-an aztertuak izan ziren.

Masa espektroskopia (MS) SYNAPT™ G2 HDMS erabiliz landu zen Q-TOF konfigurazioarekin (Waters, Milford, MA, AEB) eta elektro-esprai ionizazio (ESI) iturria modu positiboan lan egiten. Kapilar tentsioa 1,0 kV-tan finkatu zen. Nitrogenoa desolbatazio eta kono gas moduan erabili zen 1000 L/h-ko eta 10 L/h-ko fluxu abiaduran, hurrenez hurren. Iturriaren tenperatura 120 °C-koa zen eta desolbatazio tenperatura berriz, 400 °C-koa. Leuzina-enzefalina soluzioa (2 ng/μL) azetonitrilo:ur nahastean (50:50 (v/v) + % 0,1 azido formiko) erabili zen kontrol-masa zuzenketarako, eta soluzio honetan, masa-karga proportzioan (m/z) 556,2771 eta 278,1141 ioiak, ionizazio modu positiboan, aztertu ziren (0,3 s eskaner denbora, 10 s-ko tartea, batezbesteko 3 eskaner, ± 0,5 Da masa leihoa, 30 V kono tentsioa, 10 μL/min fluxu abiadura). Datuak 50-2000 u masa tartean hartu ziren bereizmen moduan (FWHM ≈ 20.000), 0,1 s-ko eskaner denbora eta eskaner arteko 0,024 s-ko atzerapenarekin. Lortutako espektro guztiak automatikoki zuzendu ziren kontrol-masan oinarriturik. Analisisia egin aurretik, masa espektrometroa sodio ioduro soluzioa erabiliz kalibratu zen.

MS^E moduko analisisia egiteko, kono tentsioa 20 V-tan (ESI+) finkatu zen eta lehen tetrapoloak (Q1) RF banda zabal batean bakarrik lan egin zuen. Automatikoki tartekatutako bi eskuratze funtzio ezberdin eta independente sortu ziren. Lehen funtzioak, normalean T-uhinaren tranpa-gelaxkan 6 eV-tan finkatuak, energia baxuak edo ez-zatikaturako datuak biltzen zituen; aldiz, bigarren funtzioak energia altuak edo zatikatutako datuak biltzen zituen, tranpa-gelaxkan 6 eV erabiliz eta transferentzia-gelaxkan 10-40 eV talka gradientea erabiliz. Bi kasuetan, argoi gasa erabili zen talkak eragindako disoziazioan (CID) eta datuak zentroide moduan gorde ziren.

MS² produktu ioi espektroa protonaturako [M]⁺ molekula ioi aitzindari moduan erabiliz lortu zen, 20 V-ko kono tentsioan. Tranpa-gelaxkan talka energia gradientea

10 eV-tik 40 eV-ra erabili zen eta transferentzia-gelaxkan berriz, 6 eV. Horrela, hainbat zatikatze graduko espektroak lor zitezkeen ioi aitzindarian, ahal bezain beste egitura informazio jasoz. MS/MS datuak 50-2000 m/z tartean jaso ziren, zentroide moduan eta aurretik aipatutako baldintza beretan.

Antozianina konposatuen identifikazioa UV-vis espektroa aztertuz eta talde fenolikoaren esleipena eginez burutu zen (Abad-García et al., 2009); talka energia baxuko MS^E espektroa modu positiboan pisu molekularrak zehazteko eta talka energia altuko MS^E eta MS² produktu ioi espektroa aglikona protonatuak [Y₀]⁺ esleitu eta zatikatzeak behatzeko, beste egitura zehaztasun batzuk argitzeko. Zatikaturako ioiak izendatzeko Domon & Costello (1988) lanean proposaturiko glikokonjugatuentzako nomenklatura erabili zen.

2.14 Bioaktiboaren askatzea

Antozianinen askatzea aztertzeko filmak (1,5 cm x 2,0 cm) 4 °C-an 2 egunez % 50 etanol soluzioan (5 mL) murgildu ziren bitartean, THC-aren askatzea analizatzeko liofilizatutako laginak giro tenperaturan 3 egunez % 50 etanol soluzioan (20 mL) murgildu ziren. Konposatu bioaktiboak argitik babesteko, laginak beirazko ontzi ilunetan sartu ziren. V-630 UV-vis espektrofotometroa (Jasco) erabiliz argiarekiko xurgatzea 200-800 nm bitartean neurtu zen. Xurgatze espektroak 2 orduz 15 minuturo neurtu ziren eta ondoren 24 orduko bigarren edo hirugarren egunera iritsi arte, filmen eta liofilizatutako laginen kasuan, hurrenez hurren. Konposizio bakoitzeko hiru lagin aztertu ziren.

2.15 Aktibitate antioxidatzailea: DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea

Hiru pH ezberdinetan antozianinadun soluzio urtsuak (2 mM) prestatu ziren: pH azidoa (2,5), basikoa (10,0) eta aldatu-gabea (6,0), pH-ak antozianinen aktibitatean duen eragina aztertzeko. Aipatutako soluzio bakoitzean eta baita antozianinadun filmetan, DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea Etxabide et al. (2017b) laneko

metodoaren arabera neurtu zen. Hitz gutxitan, antozianina soluzioaren edo antozianinen askatzearen soluzioaren 2 mL, DPPH soluzioaren (75 µM) 2 mL-rekin nahasi ziren. Nahastea sutsuki astindu zen eta ondoren, giro tenperaturan eta iluntasunean 30 minutuz geldi utzi zen. Inhibizio balioak (I) 517 nm-an emandako xurgatze balioen txikitzearekin kalkulatu ziren:

$$I (\%) = \frac{A_c - A_{\text{sample}}}{A_c} \times 100$$

non A_c DPPH soluzioaren xurgatzea eta A_{sample} DPPH-antioxidatzaile soluzioaren xurgatzea diren. Entsegu guztiak hirukoiztuta egin ziren.

2.16 Ingurumen azterketa

Bizi zikloaren azterketa ISO 14040 gidalerroei (ISO 14040, 2006) eta gomendioei jarraituz burutu zen. Analisia SimaPro softwarea (PRé Consultants, Herbehereak) erabiliz egin zen eta datuak Ecoinvent databasetik lortu ziren. Batetik, IPCC 2007 metodoa erabili zen gelatinan oinarrituriko filmen karbono aztarna ezagutzeko eta mundu beroketaren potentzial (GWP) gisa adierazi zen. Azterketa honetan erabilitako unitate funtzionala filmaren 1 m² izan zen eta kontuan hartutako hiru etapak berriz, lehengaien erauzketa, filmen fabrikazio prozesua eta bizi amaiera izan ziren. Bestalde, kitinaren erauzketa prozesuaren ingurumen azterketa egin zen. Prozesu honen inbentarioa egiteko laborategian ibilitako materialak, erauzketa etapako energia kontsumoak eta txibia lumen garraioa (Hondarribia-Donostia) eta erauzketako hondakinen eramatea (Donostia-Legutio) kontuan hartu ziren. Ikerketa honetan erabilitako unitate funtzionala kitinaren 1 g izan zen. Ingurumen inpaktuen ebaluaketa ReCiPe 2016, midpoint, Hierarchist bertsioa erabiliz burutu zen. Jarraian azaldutako inpaktu kategoriak aztertu ziren: berotze globala, estratosferako ozonoaren gutxitzea, erradiazio ionizatzailea, ozono eraketa (gizakion osasuna), materia partikulatu finaren eraketa, ozono eraketa (lur-ekosistema), lur-azidifikazioa, ur gezaren eutrofizazioa, itsas eutrofizazioa, lur-ekotoxizitatea, ur gezaren ekotoxizitatea, itsas ekotoxizitatea, giza

toxizitate kartzinogenoa, giza toxizitate ez-kartzinogenoa, lurraren erabilera, baliabide mineralen eskasia, baliabide fosilen eskasia, eta ur kontsumoa.

2.17 Analisi estatistikoa

Bariantza analisisia (ANOVA) erabili zen laginen arteko diferentzien garrantzia zehazteko. Azterketa SPSS ordenagailu programaren (SPSS Statistic 23,0) laguntzaz egin zen, konparaketa anitzak egiteko Tukey-ren testa erabiliz. Entsegu guztiak gutxienez hiru aldiz burutu ziren. Diferentziak estatistikoki esanguratsuak ziren $P < 0,05$ mailan. Arrain-gelatina/kitosano konposite filmen kasuan, analisi hau modu separatuan aztertu zen sistema bakoitzerako, % 10 eta 20 azido zitrikoko (masa portzentajearen arabera) sistemetarako, ezberdintasun esanguratsuak kitosano kantitatearen baitan adierazteko.

3 Elektrohariatutako arrain-gelatina sareak

3.1 Laburpena

Biobateragarria, biodegradagarria eta prezio baxuko lehengaia delako gelatina hainbat alorretan erabiltzen da, hala nola, elikagai industrian eta aplikazio farmazeutiko zein medikuetan (Dolci et al., 2018; Gómez-Estaca et al., 2015; Khor, 1997; Su & Wang, 2015). Gainera, gelatinak zelulen itsaspen, seinalizazio eta bereizketa burutzeko loturak sortzeko guneak azaltzen ditu, eta beraz, polimero hau ehun-ingeniartzarako, zaurien bendetarako eta farmakoen askapenerako aproposa da (Aduba et al., 2013; Angarano et al., 2013; Li et al., 2005; Mano & Reis, 2007; Panzavolta et al., 2011). Sektore honetan elektroharikatutako zuntzez osatutako sareen eskakizun handia dago, izan ere, hauek matrize extrazelularra imitatzen dute, eta porositate eta gainazal azalera handiak edukita zelulen itsaspen eta hazkundean laguntzen dute.

Halere, gelatinazko sareak uretan disolbagarriak dira, eta urarekin kontaktuan jartzean ez dute euren morfologia mantentzen. Beraz, urarekiko erresistentzia hobetzeko sarete fisikoak (Liguori et al., 2016) eta kimikoak (Gualandi et al., 2016; Ratanavaraporn et al., 2010; Zhang et al., 2006) proposatu izan dira. Kapitulu honetan zehazki erreaktibo natural bat (azido zitrikoa) erabili zen. Bio-oinarritutako lehengai hau, funtzio ugari dituen sustantzia alifatikoa da; bi talde karboxilo primario, esterikoki oztopatua dagoen talde hidroxilo bat eta talde karboxilo tertziario bat, erreaktibotasun txikiagoa duena, ditu (Hazarika & Karak, 2015). Prezio baxuan eskuragarri dago eta izaera ez-toxikoa du, izan ere, gorputzaren produktu metaboliko gisa sortzen da (Krebs-ren edo azido zitrikoaren zikloa) arnaste zelularrerako oxigenoa erabiltzen duten zelula bizi orotan (Rocha-García et al., 2017). Azido hau proteinak sartzeko egokia dela frogatu izan da (Cumming et al., 2018; Jiang et al., 2010, 2013; Reddy et al., 2011). Azido zitrikoaren talde karboxilikoak ordezkapen nukleofilo azilikoa jasan dezakete lisinaren ϵ -amino taldeekin, amida lotura egonkorak sortuz (Cumming et al., 2018). Saito et al. (2004) lanean azido zitrikoaren deribatu bat erabili zen txerri azal (A mota) gelatinaren gelak sartzeko. Deribatuan, azido zitrikoaren karboxilo taldeak aldatuta

zeunden N-hidroxisuzinimidarekin, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida klorhidratoaren presentzian. Berriki, Shafagh et al. (2018) lanean txerri azal gelatina azido zitrikoarekin saretu zen Ag nanopartikulen presentzian. Disolbatzaile modura ura erabiliz gelatina/Ag nanokoposite hidrogelak prestatu ziren, zeinetan puztea eta farmakoaren askapena pH-aren mende zeuden. Bestalde, Jiang et al. (2014) lanean azido zitrikoa saretutako elektroharikatutako gelatina zuntzak prestatzeko erabili zen. Kasu honetan erabilitako disolbatzailea azido azetikoa izan zen eta azido zitrikoaren katalizatzaile modura berriz, sodio hipofosfitoa baliatu zen. Saretzea bultzatzeko, tratamendu termikoa burutu zen 4 orduz 150 °C-an.

Ez dago lanik saretutako arrain-gelatinazko zuntzen elektroharikatzea azido zitrikoaren ur-disoluzioa soilik erabiliz, eta azido azetiko edo bestelako sustantzia kimikoak baztertuz, egiten duenik. Beraz, kapitulu honen helburua, elektrohariketaren bidez disoluzio urtsuan eta errektibo natural eta ez-toxikoa den azido zitrikoa bakarrik erabiliz saretutako arrain-gelatinazko zuntzak prestatzea posible izateko protokolo bat garatzea zen. Soluzioen pH-ak elektroharikatze gaitasunean eta sareen propietate morfologiko eta kimikoetan zuen eragina aztertu zen. Gainera, prozesatze ondoreneko tratamendu termikoak sareen propietate morfologiko eta kimikoetan zuen eragina ebaluatu zen.

3.2 Emaitzak eta eztabaida

3.2.1 Arrain-gelatinaren elektrohariketa

Gelatinaren elektroharikatzea gauzatzeko gelifikazioa saihestu behar da, honek elektroharikatze prozesuan zehar xiringaren orratzaren eta kapilarraren barnean soluzioaren fluxua oztopatzen edota blokeatzen baitu. Horretarako ur soluzioetara azido baten gehitzea edo disolbatzaileen, esaterako 1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol-aren, erabilera beharrezkoa dela askotan azaldu izan da (Djabourov et al., 1988; Erencia et al., 2015). Gehien erabiltzen diren azido edo soluzio organikoen toxizitatea dela eta,

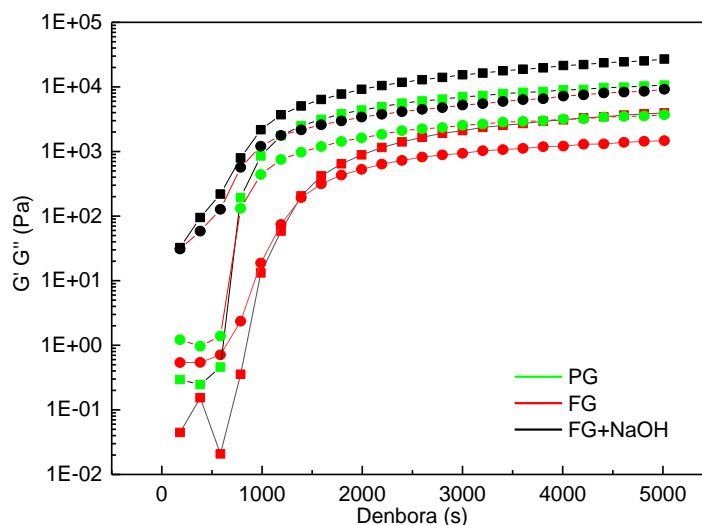
gelatinazko zuntzak onberak diren azido ur-soluzioak erabiliz elektroharikatzeko ahalegina egin izan da. Azido azetiko, azido maliko eta azido zitriko ur-soluzioak, disolbatzaile binario, tertziario eta kuaternario gisa erabili ziren arrain-gelatinan oinarritutako elektroharikatutako sareak sortzeko (Erencia et al., 2015; Mahmood et al., 2019). Nahiz eta ur/azido azetiko soluzioekin prozesuaren emaitza positiboak lortu, azido zitrikoan oinarritutako soluzio binarioak ez ziren zuntzak sortzeko aproposak suertatu (Mahmood et al., 2019).

Azido zitrikoa batetik toxikoa ez dela eta bestetik saretzeko potentziala duela kontuan izanik, lan honetan azido zitriko ur-soluzioa bakarrik erabiliz saretutako arrain-gelatina (FG) elektroharikatzeko prozedura bat identifikatzeko ahalegina egin zen. Gainera, arrain-gelatina/azido zitriko/ur soluzioari NaOH gehituz (FG+NaOH) arrain-gelatina soluzioaren pH-a 1,8tik 3,7ra doitu zen eta soluzioen pH-ak elektroharikatzeko prozesuan, sareen propietateetan eta saretze hedaduran zuen eragina aztertu zen. pH doiketa hau azido zitrikoarekin saretutako kolageno zuntzen elektroharikatzeari aztertzen zuen lan batean oinarrituz burutu zen (Cumming et al., 2018). Aipatutako lan honetan saretze hedadura handiena pH 3,5eko kolageno eta azido zitriko soluzioan gertatzen zen, pH honetan zitriko anhidroaren sortzea eraginkorragoa baitzen (Cumming et al., 2018; Higuchi et al., 1963).

Fluxu propietateek eta portaera biskoelastikoak garrantzia dute soluzioen elektroharikatzeko gaitasunean. Beraz, azterketa erreologikoak oinarri izanik eta erreferentzia gisa aurretik beste egile batzuk (Panzavolta et al., 2011) elektroharikatzeko gai dela erakutsi zuten txerri-gelatina soluzio bat (PG) harturik, FG konposizioa optimizatu zen. Soluzioen biltegitratze modulua (G') eta galera modulua (G'') denboran zehar (ordu 1 eta 40 minutuan) nolakoa zen **3.1 irudian** ikus daiteke. Arrain-gelatinak txerri-gelatinaren antzeko portaera erreologikoa azaldu zuen. Horrela, FG-ren moduluak PG-renak baino zertxobait baxuagoak baziren ere, bi soluzioek likido biskoelastiko gisa ($G' < G''$) jokatzen zuten hasieran (PG 12 minutu arte eta FG 23 minutu arte), eta gero,

molekulen asoziazioaren handitzearekin lotutako gurutzatze puntua, gel puntua modura ezaguna, igarota solido-fase nagusituko portaerara ($G' > G''$) pasatzen ziren. Azkenean, moduluek balio konstanteak lortzen zituzten. NaOH-ren presentziak soluzioen propietate biskoelastikoetan eragina zuen. Hortaz, FG+NaOH soluzioak FG eta PG baino G' eta G'' balio handiagoak zituen, eta solido-fase nagusituko portaera azaltzen zuen hasieratik, gurutzatze punturik izan gabe. Hau ikusita esan zitekeen azido zitrikoarekin sortutako sarete erreakzioa gertatzeko aukera gehiago zegoela pH 3,7ko soluzioan pH 1,8ko soluzioarekin alderatuz.

Orokorrean, nahiz eta kurbetan gel puntuak edota solido-fase nagusituko portaera azaldu, soluzio guztietan G' eta G'' balioen artean zegoen ezberdintasun txikiak gel arin baten sorrera eta elektroharikatzeko gaitasuna mantentzea suposatzen zuen.

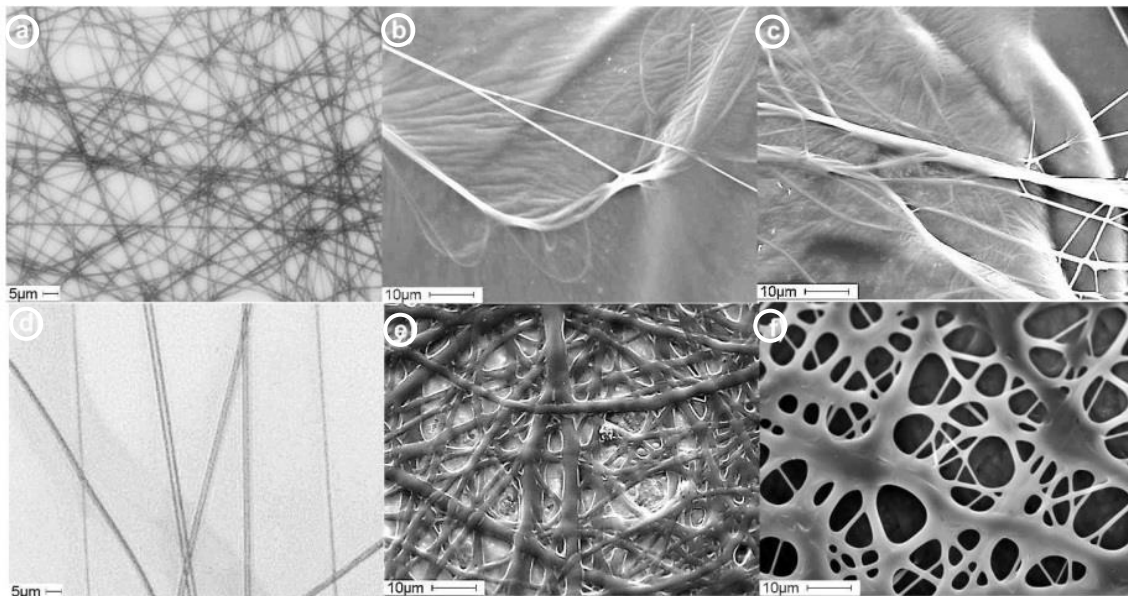


3.1 irudia Biltegitate moduluaren (G') (karratua) eta galera moduluaren (G'') (borobila) denborarekiko dependentsia PG (kurba berdea), FG (kurba gorria) eta FG+NaOH (kurba beltza) soluzioetan.

3.2.2 Elektroharikatutako gelatinazko sareen karakterizazioa

Elektroharikatutako FG eta FG+NaOH sareen OM eta SEM irudiak **3.2 irudian** azaltzen dira. OM irudietan (**3.2a,d irudiak**) ikus daitekeen bezala, FG eta FG+NaOH soluzioetatik lortutako mikrozuñtzek ez zuten “bead” edo tantatxorik eta hauek erregularrak ziren. Aurretik eginiko aurkikuntzetan ez bezala (Mahmood et al., 2019),

arrain-gelatina azido zitriko/ur soluzioa bakarrik erabiliz, azido azetikoa erabili gabe, elektroharikatu eta mikro-zuntzak sortzea posible zela frogatu zen lan honetako emaitzei esker. Halere, erabilitako bi soluzioek elektroharikatzeko gaitasuna bazuten ere, FG-tik lortutako sareen zuntz-morfologia ez zen denboran zehar mantentzen eta ordu gutxiren barruan sareak film izatera pasatzen ziren, nekez identifika zitezkeen zuntz-egiturekin (SEM mikrografiak, **3.2b irudia**). Zuntzen denboran zeharreko egonkortasuna arrain-gelatina soluzioetan NaOH gehituz hobeto zitezkeen. Horrela, nahiz eta kontaktu puntuetan zuntzen fusioak antzeman, lortutako zuntzdun sareak FG-tik lortutakoak baino hobeto mantentzen zezakeen morfologia (alderatu **3.2b,e irudiak**). Gainera, aurreko literaturako aurkikuntzen ildo berean (Cumming et al., 2018; Jiang et al. 2014), sareen fabrikazioaren ondoren eginiko tratamendu termikoak hobekuntzak ekarri zituen morfologian, zuntz-morfologia hobeto mantentzen baitzen tratatutako sare hauetan (**3.2c,f irudia**). Zuntzen arteko fusio puntuek zuntzen diametroen neurketa zailtzen bazuten ere, tratamendu termikoaren ondoren $2,19 \pm 0,07 \mu\text{m}$ eta $4,42 \pm 0,05 \mu\text{m}$ -ko zuntz-diametroak lortu ziren FG eta FG+NaOH sareetan, hurrenez hurren.



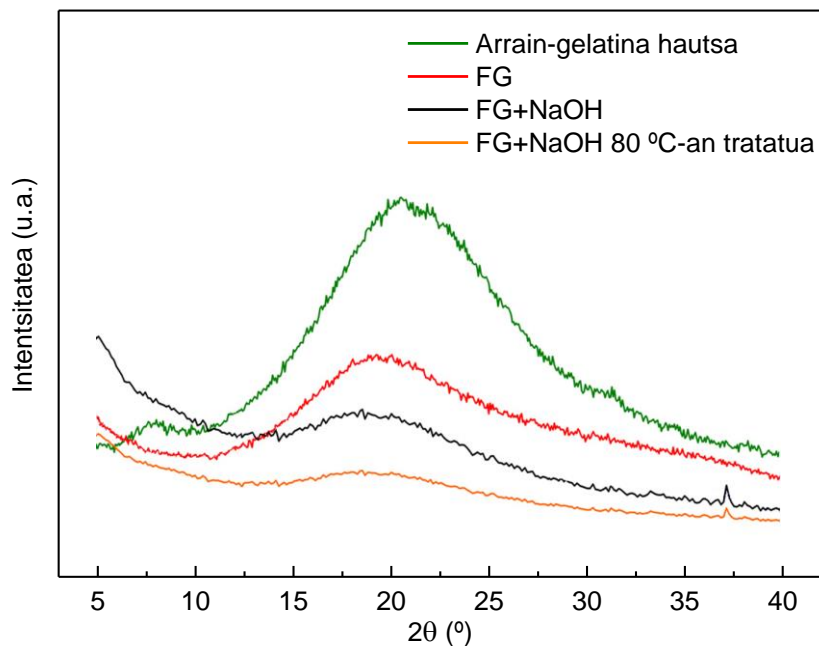
3.2 irudia Elektroharikatutako sareen OM (a, d) eta SEM irudiak (b, c, e, f) FG-tik (a, b, c) eta FG+NaOH-tik (d, e, f) lortutakoak: tratamendugabeak (a, b, d, e) eta tratamendu termikodunak (c, f).

Gelatinaren eta azido zitrikoaren arteko saretze erreakzioaren hedadura ebaluatzeko, azido zitrikoarekin gelatinaren zenbat ϵ -amino talde erreakzionatu ziren kalkulatu zen. Morfologian ikusitakoarekin bat, FG-tik lortutako sareetan ϵ -amino talde gutxi saretu ziren azido zitrikoarekin, % 12ko saretze hedadura lortu zelarik. pH-a 3,7ra igota berriz, FG+NaOH-ren kasuan, % 25 eta % 38ko saretze hedadurak lortu ziren tratatu gabeko eta termikoki tratatutako sareen kasuan, hurrenez hurren. Emaiza hauek aurreko literaturako aurkikuntzekin bat zetozen (Xu et al., 2015) eta gelatina eta azido zitrikoaren arteko saretze erreakzioa giro tenperaturan ere gerta daitekeela azaltzen dute, nahiz eta saretze erreakzioa azkartzeko 80 °C arteko tenperatura igoera bat behar den.

Guztia hobeto azaltzeko, emaitzak elkarrekin erlazionatu behar dira. FG-tik lortutako sareetan zeuden nekez identifika zitezkeen zuntz-egiturak, zuntzen saretze hedadura baxuarekin lotu zitezkeen, izan ere, pH baxu batek (pH 1,8) saretze erreakzioa zailtzen zuen. Proteinen edo amino taldeak dituzten molekulen eta azido zitrikoaren arteko saretze mekanismoa askotan azaldu izan da. Mekanismo honek azido zitrikotik zitriko anhidroa sortzean datza, horrela anhidroaren karboxilo taldeen eta proteina edo molekularen amino taldeen artean ordezkapen nukleofilikoa gertatuz (Cumming et al., 2018; Higuchi et al., 1963; Xu et al., 2015). Lan honetan erabilitako arrain-gelatina A motakoa zenez eta puntu isoelektrikoa pH 6,0-9,5 artean zuenez (Alfaro et al., 2015), FG-ren baldintza azido gogorretan (pH 1,8) amino taldeen protonazioa gertatuko zen, saretze erreakzioa mugatuz. pH-a 3,7ra igotzean, puntu isoelektrikoa baino baxuagoko pH-a izan arren, $-\text{NH}_3^+$ taldeak deprotonatuaz $-\text{NH}_2$ taldeak izatea erraztuko zen, aipatutako ordezkapen nukleofilikoa eta amida taldeen sorrera gertagarriago eginez. Horrela, pH 3,7 balioa amino talde askeen kantitatearen eta azido zitrikoarentzat ezaguna zen saretze erreakzioaren hedadura maximoaren baldintzen (pH 3,5) (Cumming et al., 2018) arteko oreka bat lortzeko aukeratu zen.

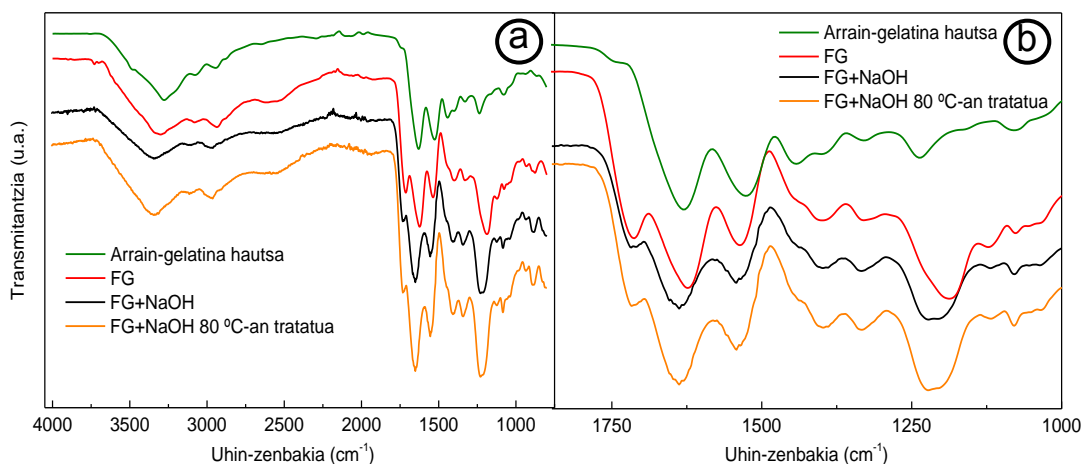
Elektrohariketa prozesuak gelatinaren egitura zuen eragina aztertzeko asmoarekin, lortutako sareetan eta arrain-gelatina hautsean angelu zabalaren X izpien difrakzio (WXR) analisia egin zen. Hortaz, arrain-gelatina materialen helize hirukoitzaren kantitate erlatiboa zehaztasunez aztertu zen (**3.3 irudia**). Jakina den bezala kolagenoak bi difrakzio seinale bereizgarri ditu: bata 8° inguruan kokatua, helize hirukoitzaren diametroarekin lotua, eta bestea 21° inguruan, helizean zehar zeuden amino azido hondarren arteko distantziarekin erlazionatua. Seinale hauek partzialki renaturalizatutako gelatina hautsean eta gelatina filmetan ere azaldu ohi dira (Gioffrè et al., 2012).

Aipatutakoarekin bat eginik eta beste zenbait lanetan azaldu bezala (Etxabide et al., 2016b; Sha et al., 2014), arrain-gelatina hautsak bi seinale azaldu zituen hauek 8° eta 21° inguruan kokatuta (**3.3 irudia**). Halere, FG eta FG+NaOH-ren elektroharikatze prozesuaren ondoren, pH azidoa dela eta, 8° -ko seinalea desagertu zen. Panzavolta et al. (2011) lanean azido azetiko soluzioan disolbatutako gelatinari gertatzen zitzaien bezala, kasu honetan ere azido zitrikoak ur-soluzioaren gelifikazio prozesuan gertatzen den gelatinaren renaturalizazio partziala saihesten zuen eta nahaspilatu egitura edukitzea laguntzen zuen, ezkerretara biratzen den banakako helize kate gutxiago eta helize hirukoitz hondar gutxiago edukiz. Gainera, azido zitrikoak 21° inguruan kokatutako difrakzio seinalean ere eragina zuen, eta honen intentsitatea txikitu egiten zen ezkerretara biratzen den banakako helize kate kantitatea txikitzean. Arrain-gelatina soluzioan NaOH-ren gehitzeak difrakzio seinaleetan eragin nabarmenik ez zuen bitartean, FG+NaOH sareetan eginiko tratamendu termikoak 21° inguruko seinalea gehiago txikitzea suposatu zuen.



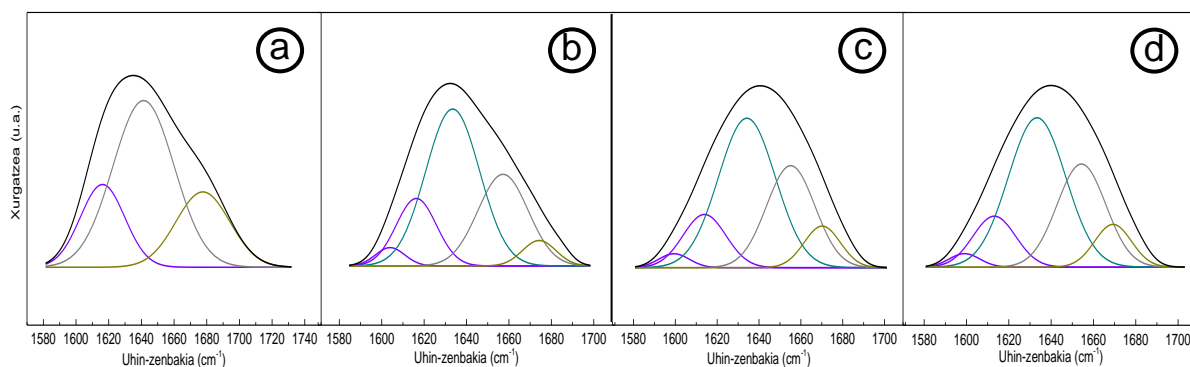
3.3 irudia Arrain-gelatina hautsaren eta elektroharikatutako FG, FG+NaOH eta termikoki tratatutako FG+NaOH sareen WXR D kurbak.

FG eta FG+NaOH erabiliz elektroharikatutako sareen FTIR espektroak tratamendu termiko aurretik eta ondoren bildu ziren (**3.4 irudia**); konparaketa egiteko arrain-gelatina hautsaren emaitzak ere bildu ziren. **3.4a irudiko** espektro guztietan presente dagoen 3000 cm^{-1} baino uhin-zenbaki handiagotan kokatutako banda zabala, hidroxilo eta amino taldeekin zegoen erlazionatua (Baniasadi et al., 2015). FTIR espektroetan zenbait aldaketa nabarmen zitezkeen, zehazki gelatinaren lotura peptidikoekin erlazionatutako seinaleetan: I amida (C=O taldeen luzapena), II amida (N-H taldeen tolestea) eta III amida (C-N taldeen luzapena). **3.4b irudian** ikus daitekeen bezala, FG sareekin alderatuz seinale hauek uhin-zenbaki handiagoetara igarotzen ziren FG+NaOH sareetan. Esan zitezkeen formulaziora gehitutako azido zitrikoak interakzio berriak sortzen zituela gelatinaren amino taldeen eta azido zitrikoaren karboxilo taldeen artean (Cui et al., 2011). Hori horrela, azido zitrikoaren karboxilo taldeen banda bereizgarria 1748 cm^{-1} -tik 1715 cm^{-1} -ra desplazatzen zela ikusi zen (Francisco et al., 2018).



3.4 irudia Arrain-gelatina hautsaren eta elektroharikatutako FG, FG+NaOH eta termikoki tratatutako FG+NaOH sareen FTIR espektroak a) 4000-800 cm^{-1} artean eta b) 1850-1000 cm^{-1} artean.

I amidarekin erlazionatutako seinalea proteinaren ardatz den egitura sekundarioaren menpekoa da eta egitura sekundarioa kuantitatiboki aztertzeko gehien erabiltzen den seinalea da. Jakina da hidrogeno zubizko loturek proteinaren egitura sekundarioaren sortzean eta egonkortasunean eragin handia dutela. Hidrogeno zubizko lotura inter-peptidikoek egitura sekundarioak (hots, α -helize eta β -xafla konformazioak) egonkortzen dituzte, aldiz peptido-ura hidrogeno zubizko loturak, peptido loturen arteko hidrogeno zubizko loturekin lehiatzen dira. Proteinen tolestean hidrogeno zubizko lotura hauek eragina dutenez, seinale honen analisiak garrantzi handia du (**3.5 irudia**).



3.5 irudia I amida kurbaren egokitzea (kurba beltza) a) arrain-gelatina hautsean eta elektroharikatutako b) FG, c) FG+NaOH eta d) termikoki tratatutako FG+NaOH sareetan.

I amida bandaren seinaleen esleipena honakoa da: 1603-1620 cm^{-1} tartean kokatutako bi seinaleak β -xafla konformazioarekin bat datoz, 1634 cm^{-1} -ko seinalea nahaspilatu konformazioari dagokio, 1641-1650 cm^{-1} tarteko banda α -helize konformazioarekin bat dator eta 1670-1678 cm^{-1} erdian azaldutako seinalea tolestutako β -xafla antiparaleloaren β -bira konformazioarekin bat dator (**3.1 taula**).

3.1 taula I amida kurbaren egokitzearen portzentajeak arrain-gelatina hautsean eta elektroharikatutako FG, FG+NaOH eta termikoki tratatutako FG+NaOH sareetan.

I amida azalera	1603-1616 cm^{-1} (%)	1634 cm^{-1} (%)	1641-1650 cm^{-1} (%)	1670-1678 cm^{-1} (%)
Arrain-gelatina hautsa	20,37	-	57,00	22,63
FG	18,75	48,73	26,54	5,98
FG+NaOH	16,94	44,70	29,79	8,57
FG+NaOH 80 °C-an tratatua	16,16	44,29	30,84	8,71

3.5 irudian eta **3.1 taulan** azaldu bezala, elektrohariketak gelatinaren egitura sekundarioan aldaketak sortu zituen. Arrain-gelatina hautsak batez ere α -helize konformazioa zuen bitartean, elektroharikatutako sareetan nahaspilatua zen konformazio nagusia, WXRd emaitzetan ikusitakoarekin bat eginik, zeinetan egitura amorfoak azaltzen ziren eta helize hirukoitzaren egiturak ez zeudela ondorioztatzen zen.

3.3 Ondorioak

Ingurumenarekiko lagunkoia den estrategia kimikoaz baliatuz, hau da, azido zitrikoaren ur-soluzioa soilik erabiliz, arrain-gelatinazko zuntzen elektroharikatzea lor zitekeen. Azido zitrikoa azido onbera gisa erabili zen, gelatina disolbatu eta elektrohariketa ahalbidetzeaz gain, saretze agente modura jokatu zuen. Elektroharikatze soluzioen pH-ak eragin handia zuen soluzioen portaera biskoelastikoan eta saretze hedaduran, zuntzen morfologiaren egonkortasunean eraginez. Ebaluaketa erreologikoak denboran zehar soluzio guztien solido-fase nagusituko portaera azaldu bazuen ere, sortutako gel arinak ez zuen elektroharikatze gaitasuna oztopatu. pH 3,7ko soluzioak, G' eta G'' modulu balio altuagoak erakutsi zituen, eta pH 1,8ko

soluzioak baino sarete hedadura handiagoa zuen. FG eta FG+NaOH bietan mikro-zuntzak sortzen baziren ere, sareen zuntz-morfologia mantentzeko soluzioaren pH-a 1,8tik 3,7ra igotzea beharrezkoa zen. Elektroharikatutako sareei 80 °C-an eginiko tratamendu termikoak egonkortasun morfologikoa nabarmen hobetu zuen. Eraitza morfologiko hauek bat zetozen sareen sarete graduekin (FG sarea = % 12, FG+NaOH sarea = % 25, termikoki tratatutako FG+NaOH sarea = % 38). Elektrohariketa prozesuaren ondoreneko gelatinaren desnaturalizazioa helize hirukoitzaren diametroarekin erlazionatutako difrakzio seinalearen ausentziarekin baieztatu zen; hau esperotako eraitza zen, gelatina soluzio azidoetan disolbatzean gelatinaren renaturalizazio partziala saihesten baita. FTIR bidez eginiko karakterizazioak eraitza hau baieztatu zuen eta erakutsi zuen elektrohariketa prozesuagatik gelatinaren egitura α -helizetik nahaspilatu izatera pasatu zela. Nahiz eta amaierako morfologia eta sarete hedadura optimizatzeko soluzio konposizio egokiena lortzeko azterketa gehiago egitea beharrezkoa den, lan hau azido zitriko/ur soluzioa erabiliz sareteutako arrain-gelatina zuntzak prestatzeko lehen ahalegin arrakastatsua da.

4 Azido zitrikoarekin saretutako arrain-gelatinazko filmak

4.1 Laburpena

Arrain-gelatina purua hauskorra eta hidrofila da, beraz, arrain-gelatinan oinarritutako materialetan aldaketak beharrezkoak dira propietateak hobetu eta produktu lehiakorrek lortu ahal izateko (Zhuang et al., 2015). Hainbat estrategia erabili izan dira bio-oinarritutako filmen propietate funtzionalak hobetzeko. Adibide gisa aipa daitezke biopolimeroen nahastea, geruza anitzen fabrikazioa edota saretze-erreaktiboen erabilera. Aipatutako azken estrategiaren kasuan, biopolimeroekin erreakzionatzeko askotan erabili izan dira aldehidoak. Halere, beraien toxikotasuna dela eta (Farjami et al., 2015; Reddy et al., 2015; Xu et al., 2015), erreaktibo naturalak hobesten dira. Lan honetan, aurreko kapituluari jarraiki, azido zitrikoa aukeratu zen arrain-gelatina saretzeko.

3. kapituluaren pH-a 3,7 arte igotzeak saretze hedadura handitu bazuen ere, saretze gradu baxuak lortu ziren, pH azidoak erreakzio hau oztopatzen baitu. Hori kontuan izanik, azido zitrikoaren eta gelatinaren arteko saretzea bultzatzeko lan honetan pH basikoa erabili zen. Testuinguru honetan, lan honen helburua disoluzio metodoaren bidez prestatutako arrain-gelatinazko filmen propietate optiko, mekaniko eta hesi-propietateetan azido zitriko kantitateak zuen eragina aztertzea zen. Horrez gain, lortutako propietateak azterketa fisiko-kimikoan behatutako aldaketekin erlazionatu ziren. Azkenik, film hauen fabrikazioarekin lotutako ingurumen aspektuak aztertu ziren karbono aztarna analisiaren bidez.

4.2 Emaitzak eta eztabaida

4.2.1 Propietate fisiko-kimikoak

Arrain-gelatinan oinarrituriko filmen propietate fisikoak aztertzeko, MC eta TSM balioak zehaztu ziren (**4.1 taula**). Ikus daitekeen moduan, MC balioak % 12-16 tartean aurkitzen ziren. Balio hauek beste zenbait proteinekin alderatuz, esaterako, literaturan azaldutako isolatutako gazur proteinarekin alderatuz (Azevedo et al., 2015a), balio

baxuak ziren eta onuragarriak izan zitezkeen filmak ontziratzeke aplikazioan erabiltzeko. TSM balioei dagokienez, filmen disolbagarritasuna handitzen zen ($P < 0,05$) azido zitriko kantitatea handitzean. Antzeko emaitzak lortu izan dira beste zenbait polimero naturaletan, xilano (Wang et al., 2014) edo almidoi (Yoon et al., 2006) kasuetan adibidez. Disolbagarritasunaren hazkuntza hau aberasgarria izan zitekeen materialak biomedikuntzako aplikazioetarako, ahoz emateko film gisa erabili nahi direnean (Yoon et al., 2007). Hazkuntza hau gelatinarekin erreakzionatu gabeko azido zitrikoa uretan disolbatzen zelako gerta zitekeen. Erabiltzen diren beste zenbait saretze-erreaktibo, proteinekin erabilienak diren biak forlmadehidoak eta glutaraldehidoak izanik, kantzerigenoak eta ingurumenarekiko kutsakorrek dira. Azido zitrikoaren kasua, ordea, guztiz bestelakoa da, elikagaien gehigarri bezala erabiltzen baita eta beraz, erreakzionatu gabeko azido zitrikoa konposatu segurua dela onartzen da (Azevedo et al., 2015b).

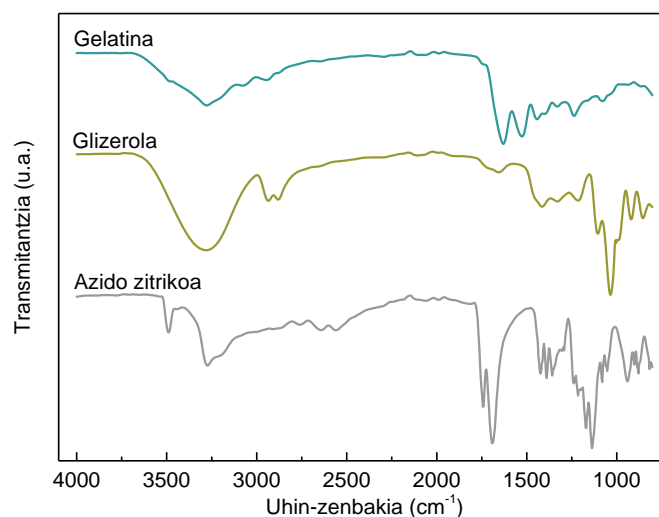
4.1 taula Hezetasun edukia (MC) eta disolbaturiko masa totala (TSM) balioak arrain-gelatinazko filmetan, azido zitriko portzentajearen arabera.

Filma	MC (%)	TSM (%)
0CA	12,5 ± 0,3 ^a	36,8 ± 0,5 ^a
10CA	14,2 ± 0,2 ^b	45,4 ± 0,8 ^a
20CA	16,2 ± 0,2 ^c	50,6 ± 3,2 ^b
30CA	12,5 ± 0,1 ^a	58,9 ± 1,9 ^{bc}
40CA	12,0 ± 0,2 ^a	67,5 ± 7,9 ^c

^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

Aipatutako emaitzak azaltzeko asmoz, FTIR analisia egin zen. Arrain-gelatinazko filmak egiteko erabilitako konposatu puruen FTIR espektroak **4.1 irudian** azaltzen dira. Gelatinak seinale esanguratsu ugari zituen. 1632 cm^{-1} uhin-zenbakian I amidaren seinalea, C=O taldeen luzapenarekin erlazionatuta zegoena. 1527 cm^{-1} uhin-zenbakian, II amidaren seinalea, N-H taldeen tolestearekin erlazionatua, eta 1238 cm^{-1} uhin-zenbakian, III amidaren seinalea, C-N taldeen luzapenarekin erlazionatua. 3000 cm^{-1} baino uhin-zenbaki altuagoetan, xurgapen banda zabal bat azaltzen zen, elkartuta edota

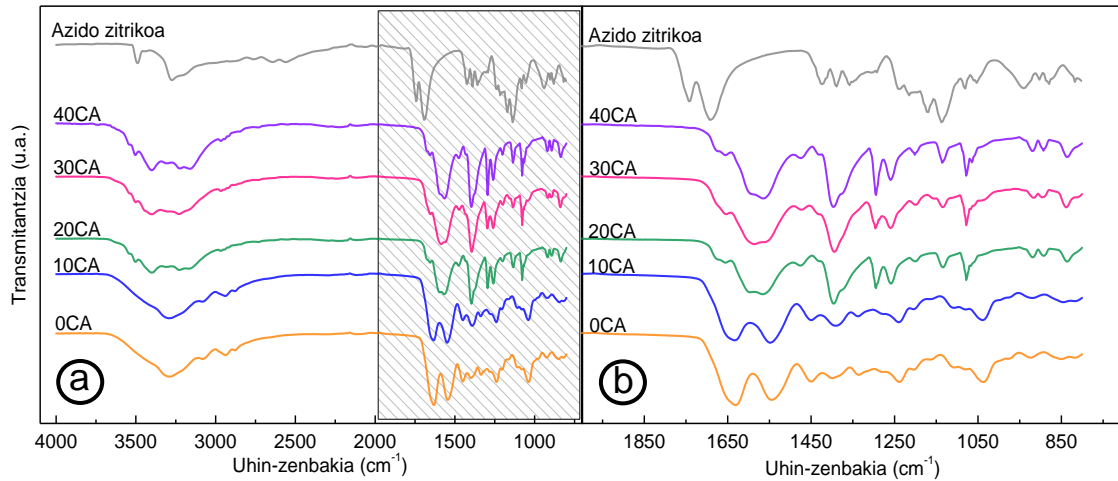
aske zeuden hidroxilo eta amino taldeekin erlazionatua. 1330 cm^{-1} uhin-zenbakian azaldutako xurgapen seinaleak berriz, prolina aminoazidoaren CH_2 mugimenduarekin zuen lotura (Guerrero et al., 2011). Glizerolaren xurgapen seinale esanguratsuenak $800\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ eremuan azaltzen ziren eta C-C eta C-O loturen bibrazioekin zeuden erlazionatuta (Gómez-Siurana et al., 2013; Guerrero & de la Caba, 2010). Azido zitrikoari dagokionez, ohiko absortzio seinaleak 1690 cm^{-1} eta 1743 cm^{-1} uhin-zenbakietan zeuden kokatuta. Hauek, aske edota hidrogeno zubizko loturak osatzen zituzten talde karboxilikoekin erlazionatuta zeuden, hurrenez hurren (Cui et al., 2011).



4.1 irudia Arrain-gelatinazko filmak egiteko erabilitako konposatu puruen FTIR espektroak.

Azido zitrikoz eraldatutako filmen FTIR espektroak **4.2 irudian** azaltzen dira. Ikus daitekeen moduan, 0CA eta 10CA filmek antzeko espektroak zituzten (**4.2a irudia**), nahiz eta I amida eta II amida seinaleen arteko banda-intentsitate erlatiboaren aldaketa aipagarria gertatu. Zehazki, 10CA filmeko I amidaren banda-intentsitate erlatiboa baxuagoa zen, **4.2b irudian** ikus daitekeen bezala. Azidoaren eragina nabarmenagoa zen filmetan, kantitate altuagoak gehitzen zirenean. Hain zuzen, I amida eta II amida absortzio-seinaleak bakar bat bihurtzen ziren, 1390 cm^{-1} -an zegoen seinalea nabarmen

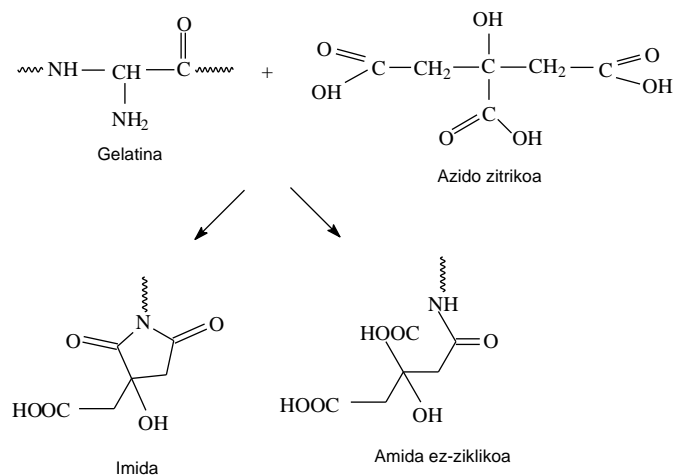
handitzen zen eta 3000 cm^{-1} baino uhin-zenbaki altuagotan azaltzen zen absortzio-banda zabala bi seinale txikiagotan bihurtzen zen.



4.2 irudia Azido zitriko puruaren eta arrain-gelatinazko filmen FTIR espektroak azido zitriko portzentajearen arabera a) $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ eremuan eta b) $2000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ eremuan.

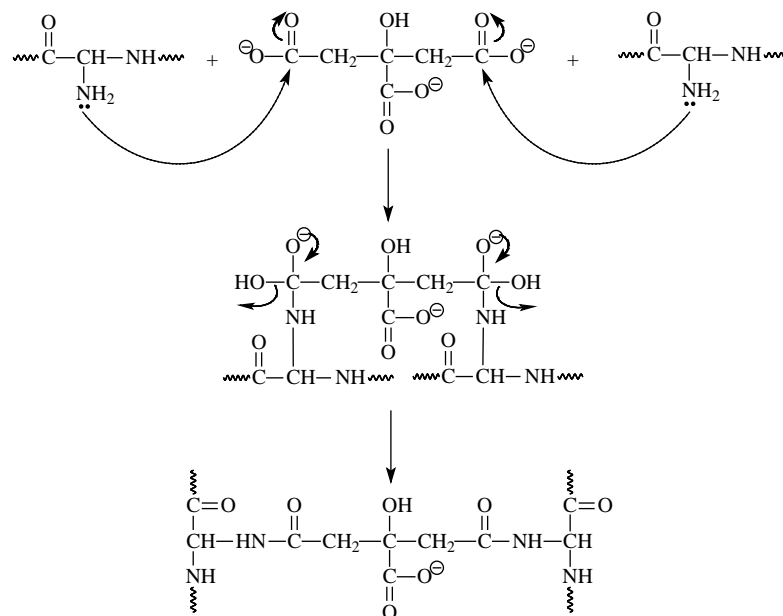
Filmek formulazioan azido zitrikoa gehitzen zenean, 1743 cm^{-1} -eko seinalea desagertzen zen, **4.2b irudian** ikus daitekeen bezala. Honek, azidoaren karboxilo taldeen eta gelatinaren amino taldeen arteko erreakzioa gertatzen zela adierazten zuen.

4.3 irudian azaltzen den bezala, bi talde hauen erreakzioarekin imiden edota amida ez-ziklikoen sorrera gertatzea teorikoki posible da (Cui et al., 2011).



4.3 irudia Gelatina eta azido zitrikoaren arteko erreakzio kimikoa.

Imida sortuko balitz, 1770 cm^{-1} uhin-zenbaki inguruan karbonilo taldearen absortzio seinale bat azalduko litzateke. Aldiz, amida ez-ziklikoa sortuko balitz, 1625 cm^{-1} inguruan karbonilo taldearen seinale bat nabarituko litzateke. Azidoarekin eraldatutako filmen espektroetan ez zen 1770 cm^{-1} uhin-zenbakian seinalerik ageri, beraz, lortutako emaitzek iradokitzen zuten gelatinaren eta azido zitrikoaren arteko erreakzioaren bitartez amidak sortzen zirela. Beste zenbait autorek amida hauen sorreraren berri ere izan dute (Xu et al., 2015). Gliadina (erreakzioa aztertzeko proteina eredu gisa erabilia) eta azido zitrikoaren arteko erreakzioarentzat ordezkapen nukleofiliko bidezko mekanismoa dago proposatuta. Gure lanean, gelatinazko filmak ingurune basikoan ($\text{pH} = 10$) prestatu ziren, azido zitrikoaren talde karboxilikoak karboxilato moduan azalduz. Proteinaren amino taldeak azido zitrikoko karboxilo talde bati erasotzen zion eta amida lotura sortzen zen (Xu et al., 2015). Azidoko karboxilo talde batek baino gehiagok erreakzionatzen bazuten, gelatinan saretze-erreakzioa gertatzen zen, **4.4 irudian** adierazten den moduan.



4.4 irudia Gelatina eta azido zitrikoaren arteko erreakzioaren mekanismoa pH basikoan.

4.2.2 Propietate optikoak

Propietate optikoak, hala nola, distira, kolorea eta gardentasuna, zehaztu ziren (4.2 taula). Ikus daitekeen moduan, distira balioak nabarmen ($P < 0,05$) txikitzen ziren azido zitrikoaren gehikuntzarekin. Distirak gainazaleko zimurtasunarekin lotura duenez (Acosta et al., 2015; Etxabide et al., 2015), emaitzek adierazten zutena zera da, azido zitrikoaren gehitzearekin gainazal zimurragoak sortzen zirela. Gainazal zimurragoen sorrera, gelatina eta azido zitrikoaren erreakzioaren ondorioz gertatzen zen, izan ere, erreakzio honekin proteina kateak berrantolatzen ziren.

4.2 taula Distira, kolore eta gardentasun balioak arrain-gelatinazko filmetan, azido zitriko portzentajearen arabera.

Filma	Distira (DU)	L*	a*	b*	ΔE^*	Gardentasuna
0CA	143 ± 19 ^a	96,0 ± 0,5 ^a	-0,11 ± 0,03 ^a	2,68 ± 0,09 ^a		0,50 ± 0,01 ^a
10CA	49 ± 2 ^b	96,0 ± 0,1 ^a	-0,14 ± 0,03 ^a	2,71 ± 0,08 ^a	0,17 ± 0,12 ^a	0,65 ± 0,01 ^a
20CA	45 ± 1 ^b	96,0 ± 0,1 ^a	-0,17 ± 0,02 ^{ab}	2,87 ± 0,08 ^a	0,22 ± 0,12 ^a	1,56 ± 0,04 ^b
30CA	41 ± 1 ^b	96,2 ± 0,1 ^a	-0,22 ± 0,05 ^b	2,67 ± 0,10 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	6,13 ± 0,07 ^c
40CA	17 ± 1 ^c	96,3 ± 0,3 ^a	-0,20 ± 0,03 ^b	2,69 ± 0,08 ^a	0,30 ± 0,16 ^a	6,38 ± 0,41 ^c

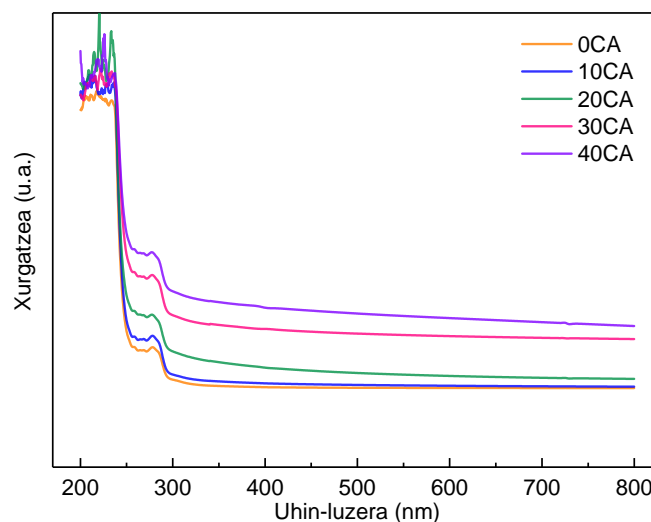
^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

Distiraz gain, kolorea eta gardentasuna aztertu ziren. Koloreari dagokionez, L*, a* eta b* balioak zehaztu ziren. Ikus daitekeen moduan, ez zegoen aldaketa nabarmenik ($P > 0,05$) L* eta b* parametroetan eta bakarrik a* balioak aldatzen ziren zertxobait ($P < 0,05$) azido zitriko kantitate altuetan (30CA eta 40CA). Halere, ΔE^* balioetan ez zen aldaketa nabarmenik ($P > 0,05$) behatu. Honek, aipatu berri den gelatina eta azido zitrikoaren arteko saretze-erreakzioak ez zuela kolore aldaketarik eragiten adierazten zuen; beste zenbait saretze-erreaktibo naturalek, esaterako sakarosak edo laktosak, gelatinazko filmetan horitze edota kolore-iluntzea eragiten dute (Guerrero et al., 2012). Gainera, film guztiak gardenak ziren, nahiz eta gardentasuna txikitzen zen ($P < 0,05$) azido zitriko kantitatea handitzean. Gardentasun txikitze hau gehienbat 30CA eta 40CA filmetan gertatzen zen, TSM balioen azalpenean adierazi bezala gehiegizko azido zitriko

kantitatea zegoela iradokiz. Distira gainazalaren zimurtasunarekin erlazionatuta zegoen bitartean, non zimurtasun hau ez zegoen azido zitrikoaren kantitatearen eraginpean, gardentasunak barneko mikroegiturarekin zuen erlazioa (Acosta et al., 2015). Beraz, emaitzek iradokitzen zuten saretu gabeko azido zitrikoak filmen egituraren eragina zuela eta ondorioz, gardentasun balioetan ere bai.

4.2.3 Hesi-propietateak

UV-vis espektroskopia gardentasuna neurtzeko erabiltzeaz gain, arrain-gelatinazko filmen argiarekiko erresistentzia zehazteko erabili zen. **4.5 irudian** ikus daitekeen moduan, gelatinazko filmek, azido zitriko kantitatea edozein izanda ere, ultramorekiko sekulako hesi-propietateak zituzten 200 eta 250 nm artean. Hau, gelatinan ageri diren talde kromoforoerik esker gertatzen zen, zehazki, tirosina eta fenilalanina aminoazidoengatik (Gómez-Guillén et al., 2009). Gainera, azido zitriko kantitatea handitzean, ultramore xurgapena handitzen zen 250 eta 280 nm artean, azido zitrikoko karboxilo eta hidroxilo taldeek auxokromo gisa jarduten zutelako (Jadhav & Phugare, 2012).



4.5 irudia UV-vis espektroak arrain-gelatinazko filmetan, azido zitriko portzentajearen arabera.

Urarekiko erresistentzia ere aztertu zen. Analisi honetan WCA balioak 90° baino baxuagokoak zirela ikusi zen (**4.3 taula**), beraz, filmek izaera hidrofiloa azaldu zuten (Bharathidasan et al., 2015). Halere, azido zitriko kantitatea handitzeak ez zuen WCA balioetan aldaketa nabarmenik ($P > 0,05$) eragiten % 30 azido zitriko kantitate arte. Eraitza hauek adierazten zutena da % 20 baino azido zitriko gehiago egoteak, erreakzionatzen ez zen azido zitriko kantitate bat egotea suposatzen zuela, hidrofilotasun ($P < 0,05$) eta disolbagarritasun handiagoko filmak izanik, lehendik TSM balioetan ikusi den bezalaxe. Hori horrela, 40CA filmetan ur tantak guztiz xurgatzen ziren. WCA balioetan gertatzen zen antzera, azido zitriko kantitateak ez zituen WVP balioak nabarmenki ($P > 0,05$) aldatzen, eta eragina, azido kantitate handiengan bakarrik antzeman zitekeen.

4.3 taula Ur-ukipen angeluaren (WCA) eta ur lurrunaren iragazkortasunaren (WVP) balioak arrain-gelatinazko filmetan, azido zitriko portzentajearen arabera.

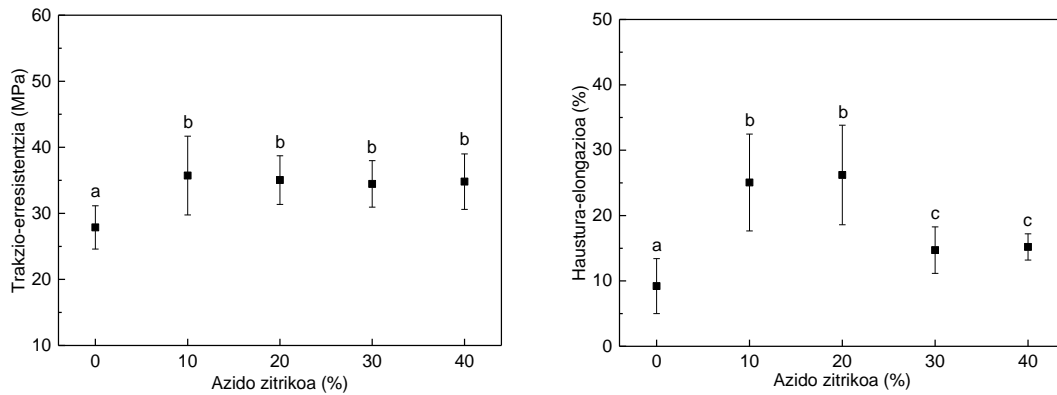
Filma	WCA (°)	WVP 10^{12} (g cm ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
0CA	79 ± 10 ^a	2,22 ± 0,22 ^a
10CA	77 ± 3 ^a	2,53 ± 0,45 ^{ab}
20CA	75 ± 10 ^a	2,53 ± 0,03 ^{ab}
30CA	55 ± 4 ^b	2,56 ± 0,14 ^{ab}
40CA	0	3,21 ± 0,33 ^b

^{a-b}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

4.2.4 Propietate mekanikoak

Arrain-gelatinazko filmetan azido zitrikoaren gehikuntzak propietate mekanikoen hobekuntza zekarren. **4.6 irudian** ikus daitekeen moduan, TS nabarmenki ($P < 0,05$) handitzen zen azido zitrikoa gehitzean, kantitateak eraginik izan gabe. TS igoera honek adierazten zuen, azido zitrikoaren eta gelatinaren arteko erreakzioaren bitartez sortutako interakzioak gelatina kateen arteko interakzioak baino sendoagoak zirela. EB balioetan ere azido zitrikoaren gehikuntzarekin emaitzen igoera ($P < 0,05$) antzematen zen, kasu honetan % 20 azido zitriko balio arte. Eraitza hauek bat datoz TSM eta WCA

emaitzekin, non % 20 azido zitriko baino kantitate handiagoetan erreakzionatu gabe geratzen zen gehiegizko azido zitrikoa zegoela adierazten zen.



4.6 irudia Trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazio (EB) balioak arrain-gelatinazko filmetan, azido zitriko portzentajearen arabera.

^{a-c}Grafiko berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

4.2.5 Ingurumen azterketa

Filmek ontziratzeko aplikaziorako duten potentziala kontuan hartuta, 1 m²-ko unitate funtzionala aukeratu zen ingurumen azterketa burutzeko. Bertan, hiru atal kontuan hartu ziren, zehazki, lehengaien erauzketa, filmen prozesaketa eta bizi amaiera.

Lehengaien erauzketan arreta jarriz, kontuan hartu zen gelatina lortzeko arrain azaletatik, arrain-prozesatzeko industrietatik lortutako hondakinetatik, eginiko erauzketak ingurumenarekiko zuen eragina. Laburki, ingurumen azterketarako aukeratutako erauzketa metodoa puzte arin batean oinarritzen da, lehenik sodio hidroxidoan eta jarraian azido azetikoan. Ondoren, gelatinaren erauzketa ur destilatuan egiten da 70 °C-an 90 minutuz eta azkenik, lagina labean lehortzen da 50 °C-an 18 orduz.

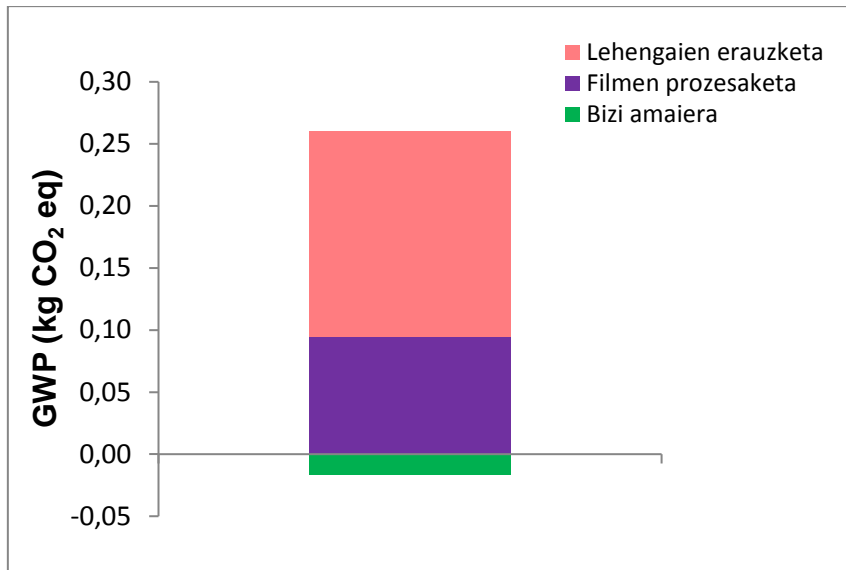
Filmek fabrikazioari dagokionez, arrain-gelatinazko filmek prestaketa gure laborategietan egin zen disoluzio metodoa erabiliz. Filmak sortzeko disoluzioa

2.4.2 atalean azaldu bezala egin zen. Atal honen ingurumen inpaktua ebaluatzean, kontuan hartu ziren erabilitako materialak eta energia (beroa eta elektrizitatea).

Bizi amaierarekin lotuta, konpost-egitea hartu zen filmen erabilera osteko hondakinen ezabaketarako prozesutzat. Zabor honen tratamendua, hondakin organikoen degradazio aerobikoan oinarritua, energetikoki laguntzarik behar ez zuen prozesua zela kontsideratu zen. Hortaz, kontsumo elektrikoa ez zen kontuan hartu.

Hiru atal horiekin erlazionatutako datuak prozesatu eta ingurumen inpaktuarekin lotu ziren Klima Aldaketaren Panel Internazionalak (IPCC) garatutako IPCC 2007 erabiliz. Metodo honek klima aldaketaren faktoreak hiru etorkizun denboratan (20, 100 eta 500 urtetan) zerrendatzen ditu karbono aztarna burutzeko, azterketa honetan 100 urtetan beroketa globalaren potentzial (GWP) gisa adieraziz.

Lehengaien erauzketa zen GWP altuena zuen atala (**4.7 irudia**). Gelatina erauzteko erabilitako energia zen atal honetan karbono aztarnan ekarpen handiena zuen faktorea. Filmek fabrikazioko atalean ere energia kontsumoa zen ingurumen inpaktuan gehien eragiten zuen faktorea. Beste zenbait autorek azaldu bezala (Hervy et al., 2015), material berriztagarrien ingurumen abantailak frogatzeko hobekuntza gehiago behar dira. Halere, aurreko ataletan aipatutakoaren aurka, bizi amaierako atalean GWP balio negatiboak lortu ziren, ingurumen ondorio positiboa indartuz, konposta lortzen baitzen produktu baliagarri gisa.



4.7 irudia Karbono aztarna arrain-gelatinazko filmetan.

4.3 Ondorioak

Azido zitrikoarekin eraldatutako arrain-gelatinazko filmak prestatu eta karakterizatu ziren kapitulu honetan. Film guztiak gardenak eta homogeenak ziren. Filmen propietateetan gertatutako aldaketek saretze-erreakzioak gertatzen zirela iradokitzen zuten, hau filmen sorreran azido zitrikoa gehitzearen eraginez jazo. Saretzea FTIR analisiaren bidez frogatu zen, non gelatina eta azido zitrikoaren arteko erreakzioa gertatzen zela ikusi zen. Erreakzio honen ondorioz, eraldatutako filmek % 20 azido zitriko kantitate arte propietate mekaniko hobetuak azaldu zituzten, TS eta EB balioak handitzen baitziren. Halere, azido kantitate altuagoetan erreakzionatu gabe geratzen zen gehiegizko azido zitriko kantitatea zegoela ikusi zen. Propietate funtzionalak aztertzeaz gain, lehengaien erauzketatik filmen bizi amaierara bitarteko film jasangarritasuna behatu zen. Ingurumenaren ebaluaketa honek ezagutarazi zuen konpost-egitea onuragarria zela film berriztagarri hauen erabilera osteko hondakinen tratamenduan. Hau, karbono aztarnaren neurketako GWP balio negatiboetan ikusi ahal izan zen.

5 Arrain-gelatina/kitosano konposite filmak

5.1 Laburpena

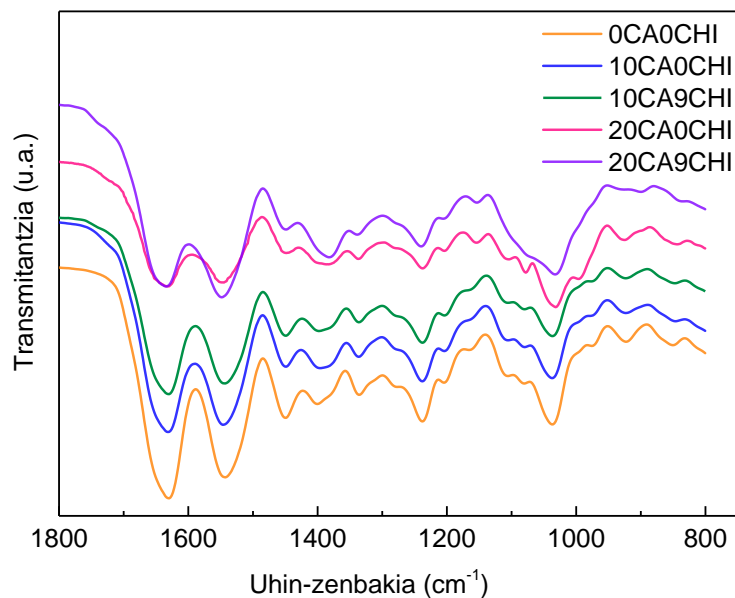
Mikrobioen kutsadura elikagaien hondatzearen eta beraz, elikagaien kalitateak okerrera egitearen arrazoi garrantzitsuenetako bat izanik (Clarke et al., 2017), elikagaien zientzian eta teknologian film aktiboak garatzeko interesa pizten ari da. Aurreko kapituluetan erabilitako azido zitrikoak konposatu aktibo gisa lan egin dezake, izan ere, bere mikrobioen aurkako izaera aurretik zenbait lanetan adierazia izan da (Denghani et al., 2018; Kim & Rhee, 2015; Olaimat et al., 2017). Hori jakinda, kapitulu honetan azido zitrikoa mikrobioen aurkako eragile moduan gehitu zen; zehazki % 10 eta 20 azido zitriko kontzentrazioak hautatu ziren 4. kapituluaren ikusitakoa kontuan hartuz, hau da, % 20 azido zitriko baino gehiago eransteak azido soberakina dakarrela aintzakotzat hartuz. Azido zitrikoak mikrobioen aurkako izaera azaltzeaz gain, ingurune azido arin bat izatea eta kitosanoa, mikrobioen aurkako moduan jardungo zuen biopolimeroa, disolbatzea ahalbidera zezakeen. Azken sustantzia honen bakterioen aurkako jarduera, positiboki kargatutako amino taldeei sor zaie, zeinek negatiboki kargatuta dauden bakterio azalerekin elkarrekintzak dituzten (Bano et al., 2017; Ganesan, 2017).

Gelatina/kitosano filmen prozesatzea (BenBettaïeb et al., 2015; Gómez-Estaca et al., 2011) eta konposatu aktiboen gehitzea, hala nola, filmen formulazioan landare estraktuen (Benbettaïeb et al., 2016; Bonilla & Sobral, 2016) eta olio esentzialen (Hosseini et al., 2015; Kakaie & Shahbazi, 2016) gehitzea, landu izan diren gaiak dira. Halere, dakigunez ez da artikulurik zuzendu azido zitrikoak eta kitosanoak arrain-gelatinan oinarritutako filmen propietate funtzionaletan duten efektua aztertzeraz. Hortaz, kapitulu honetan azido zitrikoaren eta kitosanoaren efektu konbinatua aztertu zen filmen bakterioen aurkako aktibitatean eta baita propietate fisiko-kimiko, termiko, optiko, mekaniko eta hesi-propietateetan.

5.2 Emaitzak eta eztabaida

5.2.1 Propietate fisiko-kimikoak

Arrain-gelatinazko filmetan kitosano eta azido zitrikoaren efektua infragorri espektroskopiaren bidez analizatu zen. **5.1 irudian** ikus daitekeen moduan, aldaketa esanguratsuenak I amida (C=O taldeen luzapena $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$) eta II amida (N-H taldeen tolestea eta C-N taldeen luzapena $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) seinaleen intentsitate erlatiboan gertatu zen (Muyonga et al., 2004). Zehazki, I amida seinalearen intentsitatea, II amidarena baino handiagoa zen kontrol filmetan (0CA0CHI). Banda-intentsitate erlatiboaren ezberdintasuna txikiagoa bilakatu zen % 10 azido zitrikodun (10CA0CHI eta 10CA9CHI) filmetan, bi banden intentsitatea antzekoa zen % 20 azido zitriko eta kitosano gabeko (20CA0CHI) filmetan, eta % 20 azido zitriko eta % 9 kitosanodun filmetan (20CA9CHI) berriz, II amida seinalearen intentsitatea I amidarena baino handiagoa zen.



5.1 irudia Kontrol filmaren (0CA0CHI), kitosano gabeko % 10 edo 20 azido zitrikodun filmen (10CA0CHI eta 20CA0CHI) eta % 9 kitosanodun filmen (10CA9CHI eta 20CA9CHI) FTIR espektroak.

Lagaron et al. (2007) lanaren arabera, $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ seinalea kitosanoaren aktibitate biozidarekin lotura duten protonatutako amino taldeekin erlazionatua egon daiteke. Hortaz, seinale honen handitze erlatiboak bakterioen aurkako aktibitatea handitzea adierazten zuen, behean adierazita dagoen mikrobioen aurkako azterketan baieztatu zen bezala. Gainera, $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ seinalea aktibitate biozidarekin lotura duten talde karboxilikoekin erlazionatu izan da (Lagaron et al., 2007; Leceta et al., 2013).

5.1 irudian ikus daitekeen bezala, seinale honen intentsitate erlatiboa 1450 cm^{-1} seinalearekiko txikiagoa zen azido zitriko eta kitosanorik gabeko filmetan (0CA0CHI), antzekoa zen % 10 azido zitrikodun (10CA0CHI eta 10CA9CHI) filmetan eta handiagoa berriz, % 20 azido zitrikodun filmetan, gehienbat % 9 kitosanodun filmetan (20CA9CHI),

5.7 irudian adierazitako mikrobioen aurkako emaitzekin bat eginik. Gainera, $1100\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ inguruko seinaleak bakar batean bihurtu ziren 20CA9CHI filmetan.

FTIR seinaleen intentsitateen arteko ezberdintasun hauek interakzio ezberdinak iradokitzen zituzten formulazioko sustantzien (arrain-gelatina, azido zitrikoa, kitosanoa eta glizerola) talde polarren artean, kitosano kantitatearen arabera baina, batik bat, azido zitriko kantitatearen arabera. Gelatinaren eta kitosanoaren arteko interakzioak batik bat hidrogeno zubizko loturengatik gertatzen ziren, gelatinaren karboxilo, amino eta hidroxilo taldeen eta kitosanoaren amino eta hidroxilo taldeen artean (Gómez-Estaca et al., 2011). Bazirudien interakzio hauei filmen formulazioan gehitutako azido zitriko kantitateak eragiten ziela; beraz, proteinaren egituran azido zitriko eta kitosanoaren eragina gehiago ezagutu nahian, I amidaren seinalea sakonago aztertu zen espektroaren bigarren deribatua eginez.

Gelatinaren I amida profilak hiru konposatu nagusi ditu, α -helize/nahaspilatua (1650 cm^{-1}) eta β -xafla ($1615\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ eta $1680\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) egiturei elkartuak (Etxabide et al., 2016b; Guerrero et al., 2014). **5.1 taulan** ikus daitekeen moduan, ez ziren ezberdintasunak ikusi kontrol filmen (0CA0CHI) eta % 10 azido zitrikodun (10CA0CHI) filmen artean. Halere, % 20 azido zitrikodun filmetan (20CA0CHI) β -xafla egituraren

gutxitzea eta α -helize/nahaspilatua egituraren handitzea ikus zitekeen, azido zitriko kantitateak proteinaren egituran zuen eragin handia adieraziz. Gainera, β -xafla eta α -helize/nahaspilatua kantitateen artean ezberdintasun handiagoa zegoen % 20 azido zitriko gehitua zuten filmetan, zeinek α -helize/nahaspilatu kantitate altuagoa zuten % 10 azido zitrikodun filmekin alderatuz. Portaera hau baliteke gelatinaren kiribiletik helizerako transformazioa (renaturalizazioa) gertatu izanagatik ematea (Sow & Yang, 2015), azido zitriko kantitate altuek horretan lagun zezaketen azido zitrikoaren plastifikatzaile efektua dela eta, beherago propietate mekanikoetan azaltzen den moduan.

5.1 taula Proteinaren bigarren egiturak arrain-gelatinazko filmetan azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

Proteinaren bigarren egiturak	Filma	Kantitatea (%)	Filma	Kantitatea (%)
β-xafla (1615-1630 cm^{-1})	0CA0CHI	42	0CA0CHI	42
	10CA0CHI	43	20CA0CHI	29
	10CA3CHI	41	20CA3CHI	22
	10CA6CHI	36	20CA6CHI	23
	10CA9CHI	35	20CA9CHI	25
α-helize/nahaspilatua (1650 cm^{-1})	0CA0CHI	54	0CA0CHI	54
	10CA0CHI	53	20CA0CHI	68
	10CA3CHI	55	20CA3CHI	74
	10CA6CHI	60	20CA6CHI	72
	10CA9CHI	61	20CA9CHI	69
β-xafla (1680-1700 cm^{-1})	0CA0CHI	4	0CA0CHI	4
	10CA0CHI	4	20CA0CHI	2
	10CA3CHI	4	20CA3CHI	4
	10CA6CHI	4	20CA6CHI	5
	10CA9CHI	4	20CA9CHI	5

Proteinaren egituran kitosanoaren gehitzeak ere eragina zuen. Zehazki, kitosanoa film formulazioetara gehitzearekin β -xafla kantitatea gutxitu eta α -helize/nahaspilatua kantitatea handitu zen. Halere, kitosano kantitatea handitzean behatutako aldaketak ezberdinak ziren % 10 edo 20 azido zitrikodun filmetan. % 10 azido zitriko zuten filmetan, kitosano kantitatea handitzean β -xafla kantitatea gutxitu eta α -helize/nahaspilatua handitu zen. % 20 azido zitriko zuten filmetan berriz, guztiz kontrakoa pasatu zen, kitosano kantitatea handitzearekin β -xafla kantitatea handitu eta

α -helize/nahaspilatua txikitu zen. Emaitza hauek filmetan hidrogeno zubizko loturen hedapen ezberdinak aurki zitezkeela adierazten dute eta ondorioz, sare ezberdinen sorrera azido zitriko kantitatearen funtzioan.

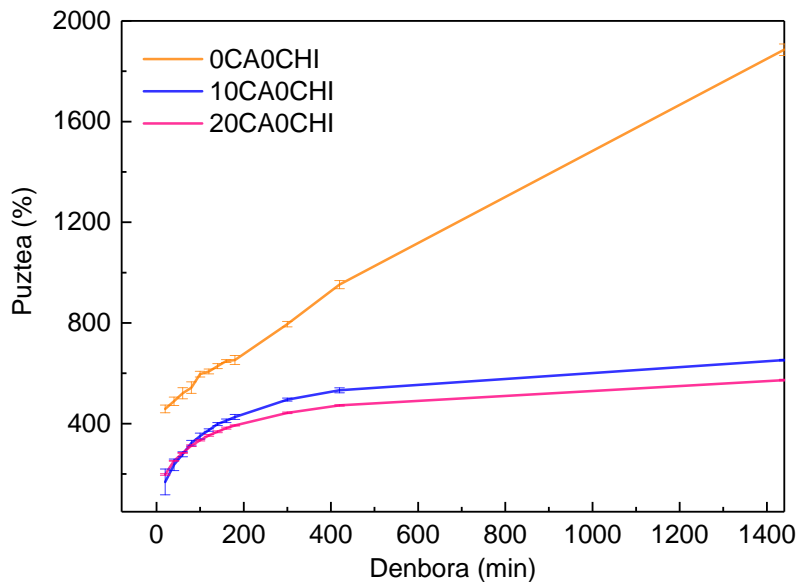
Filmen MC eta TSM ere azertuak izan ziren eta emaitzak **5.2 taulan** daude adierazita. Batetik, film guztiek batezbesteko MC balioak % 11,21 eta 13,41 artean azaldu zituzten, TGA kurbetan azaldutako lehen masa galerarekin bat eginik (**5.5 irudia**). Bestetik, TSM balioak % 40 inguruan zeuden, glizerolaren eta azido zitrikoaren disoluzioagatik ziur aski, izan ere, konposatu hauen eta lan honetan erabilitako biopolimeroen (arrain-gelatina eta kitosanoa) arteko interakzioak hidrogeno zubizko loturen bidez gertatzen ziren, FTIR analisisian azaldu bezala (**5.1 irudia**). Aipatzekoa da film guztiek euren osotasuna mantentzen zutela apurtu gabe. % 10 azido zitrikodun filmetan aldaketa adierazgarririk ikusi ez bazen ere ($P > 0,05$), % 20 azido zitrikodunen kasuan kitosanoa gehitzeak nabarmenki ($P < 0,05$) txikitu zuen filmen disolbagarritasuna, beste zenbait egilek gelatina-kitosano filmentzako adierazi moduan (Gómez-Estaca et al., 2011; Hosseini et al., 2013 ; Matiacevich et al., 2013).

5.2 taula Arrain-gelatinazko filmen hezetasun edukiaren (MC) eta disolbaturiko masa totalaren (TSM) balioak azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

Filma	MC (%)	TSM (%)
0CA0CHI	11,21 \pm 0,33 ^d	37,33 \pm 1,05 ^b
10CA0CHI	12,33 \pm 0,05 ^a	44,96 \pm 1,97 ^a
10CA3CHI	12,15 \pm 0,06 ^b	38,67 \pm 0,87 ^a
10CA6CHI	12,20 \pm 0,06 ^{ab}	45,78 \pm 1,76 ^a
10CA9CHI	11,93 \pm 0,06 ^c	42,71 \pm 4,68 ^a
0CA0CHI	11,21 \pm 0,33 ^c	37,33 \pm 1,05 ^c
20CA0CHI	13,46 \pm 0,09 ^a	44,73 \pm 1,86 ^a
20CA3CHI	13,32 \pm 0,03 ^{ab}	42,99 \pm 2,01 ^{ab}
20CA6CHI	13,41 \pm 0,10 ^a	41,34 \pm 0,82 ^{ab}
20CA9CHI	12,96 \pm 0,24 ^b	40,27 \pm 1,30 ^b

^{a-d}Sekzio eta zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

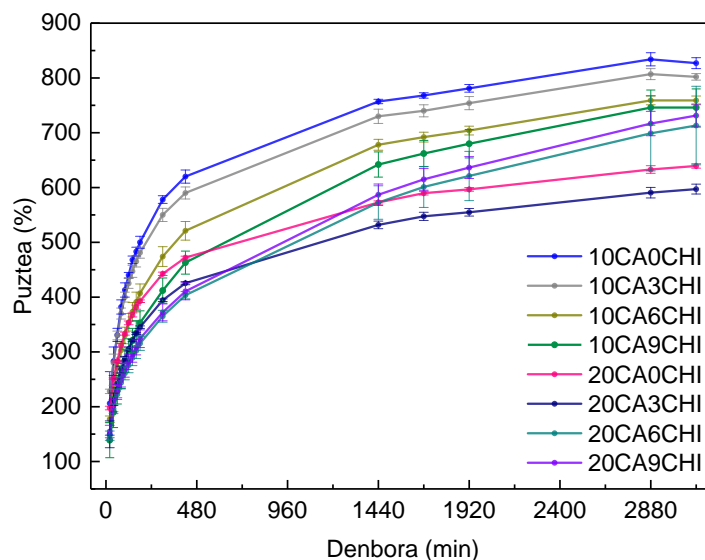
Puzte portaera saretzearen adierazgarri denez, filmen puzte-azterketa burutu zen. Lehenik, azido zitrikoaren efektua aztertu zen eta puzte kurbak **5.2 irudian** azaltzen dira. Orokorrean gelatinazko filmak azkar puzten dira denbora laburrean, baina denbora aurrera doala puzte abiadura mantsotzen da (Gordon et al., 2010). Kontrol (0CA0CHI) filmaren kasuan puztea % 2000 balio inguru arte iritsi zen, aldiz, azido zitrikoa zuten filmen puzte emaitzak 24 orduren ondoren % 600 balioa baino baxuagoak ziren. Azido kantitatea % 10etik 20ra igotzeak puzte balioak txikitzea zekarren. Aipatzekoa da azido zitrikoa zuten filmek euren osotasuna mantendu zutela puzte-azterketaren amaiera arte, film hidratatu eta malguak lortuz.



5.2 irudia Arrain-gelatinazko filmen puzte-balioak, kontrol filmean (0CA0CHI) eta kitosanorik gabeko % 10 azido zitriko (10CA0CHI) edo % 20 azido zitrikodun (20CA0CHI) filmetan.

Kitosanoa gehitzearen eraginari dagokionez, kitosanoa zuten filmen puzte-kurbak **5.3 irudian** azaltzen dira, non bi fase ezberdinu daitezkeen. 420 minutu arte iristen zen lehen etapan, handitze azkar bat ikus zitezkeen, % 460-620 balioetara iritsiz % 10 azido zitrikodun filmetan eta % 400-470 balioetara iritsiz % 20 azido zitrikodun filmetan. Kasu guztietan baliorik handienak kitosanorik gabeko filmetan lortu ziren. Beraz

ondoriozta zitekeen, kitosanoa gehitzeak formulazioko talde polarren artean interakzioak bultzatzen zituela, eta beraz, talde polar gutxiago zeudela eskuragarri ur molekulekin interakzionatzeko, puzte gradu txikiagoak lortuz. Joera hau % 10 azido zitrikodun filmetan puzte-azterketaren amaiera arte mantendu zen, balio konstanteak lortu ziren arte. Azken puzte balio hauek % 825etik 750era txikitu ziren kitosano kantitatea % 0tik % 9ra handitzean. % 20 azido zitrikodun filmetan joera guztiz aurkakoa zen. Emaitza hauek bat datoz % 10 edo 20 azido zitrikodun filmetan zeuden hainbat proteina-egiturekin, lehenik FTIR analisisian **5.1 taulan** adieraziak.



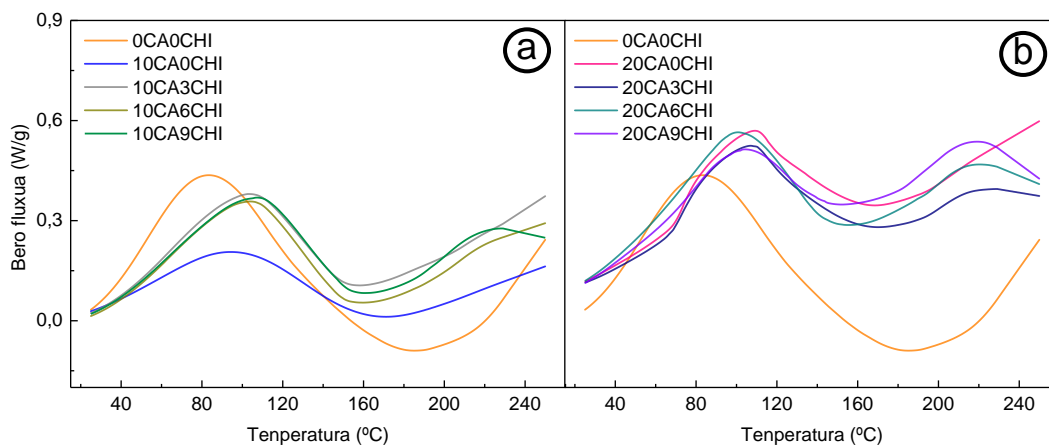
5.3 irudia Arrain-gelatinazko filmen puzte-balioak, azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

5.2.2 Propietate termikoak

Azido zitriko eta kitosano kantitatearen baitan zeuden aldaketa fisiko-kimikoak propietate termikoekin erlazionatzeko, DSC neurketak burutu ziren eta lortutako kurbak

5.4 irudian azaltzen dira. Ikus daitekeen moduan, aldaketa esanguratsuen azido zitrikoa edo kitosanoa gehitzean gertatzen zen, kitosano kantitateak eraginik izan gabe. % 10 azido zitriko zuten film guztiek (**5.4a irudia**), kitosano kantitate altuenekoak izan ezik (10CA9CHI), seinale bakarria azaldu zuten, uraren lurruntzearekin erlazionatua.

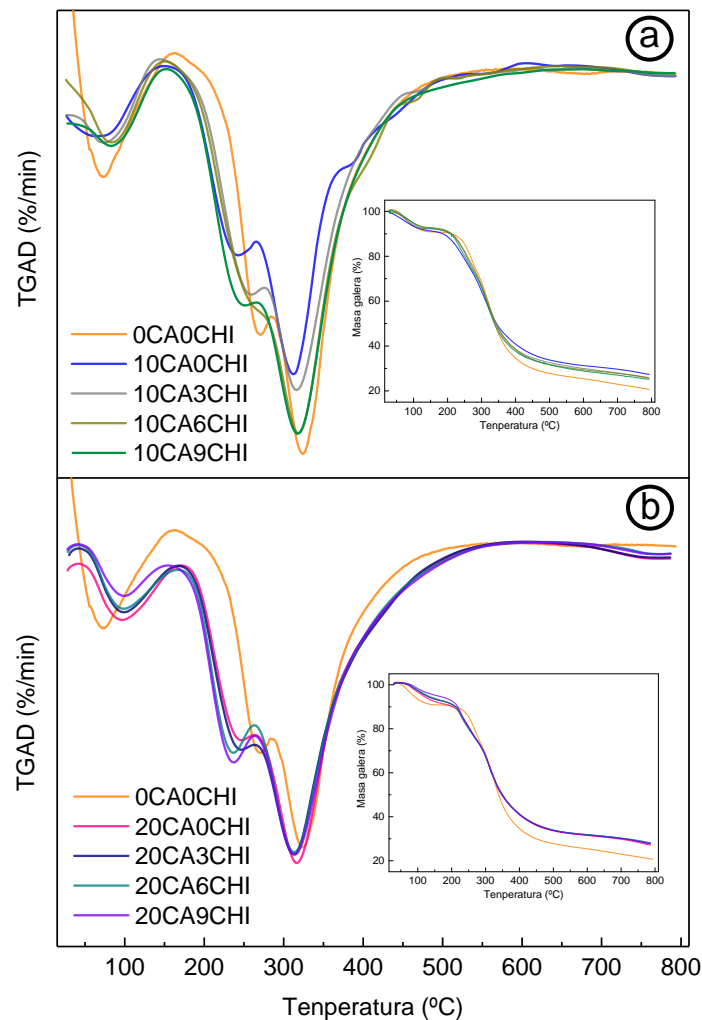
Ikus daitekeen moduan, seinale honen maximoa 83 °C-tik 95 °C-ra mugitu zen formulaziora azido zitrikoa gehitu zenean, eta 95 °C-tik 107 °C-ra kitosano kantitatea % 0tik 9ra handitzean. Emaiza hauek azido zitriko eta kitosanoak gelatinarekin zituzten interakzioen adierazgarri dira, zeinek ur lurrunketa oztopatuko luketen. Gainera, % 9 kitosanodun filmak bigarren seinale bat azaldu zuen 220 °C inguruan, kitosanoaren desazetilazioarekin lotua (Almeida et al., 2010). Bestalde, % 20 azido zitrikorekin prestatutako film guztiek (**5.4b irudia**) bi seinale azaldu zituzten. Gainera, bigarren seinale honen temperatura maximoa kitosano kantitatea handitzean txikitu zen, hau α -helize/nahaspilatua egituraren gutxitzearekin erlazionatua egon zitekeen, **5.1 taulan** erakutsi bezala, % 3 kitosanodun filmetatik % 9 kitosanodun filmetara gutxitzen baitzen egitura mota hau.



5.4 irudia Arrain-gelatinazko filmen DSC termogramak a) % 10 azido zitriko eta b) % 20 azido zitriko eta kitosano kantitate ezberdineko filmak, kontrol filmarekin (0CA0CHI) alderatuz.

TGA-ri dagokionez, deribatu termo-grabimetroaren (TGAD) kurba azaltzen dira **5.5 irudian**, barneko aldean masa galaren grafikoekin. Ikus daitekeen moduan, hiru masa galera nagusi zeuden. Lehena 100 °C-ren inguruan, uraren lurruntzearekin erlazionatua, DSC analisisiko **5.4 irudian** lehendik azaldua. Honen balioak % 10 inguruan zeuden, **5.2 taulan** MC emaitzetan adierazitakoarekin bat eginik. Bigarren masa galera 250 °C inguruan azaldu zen eta hau glizerolaren lurruntzearekin (Castelló et al., 2009)

eta azido zitrikoaren deskonposizioarekin (Choppali & Gorman, 2008) erlazionatua zegoen. % 20 azido zitrikodun filmetan bigarren etapa honen temperatura maximoa balore baxuagotan azaltzen zen, hau azido kantitatearen menpe sortutako sarearen egitura ezberdinekin erlaziona zitekeen, lehendik FTIR emaitzetan azaldua (5.1 taula). Baliorik altuena berriz, kontrol filmean (0CA0CHI) ikus zitekeen. Azkenik, masa galera nagusiena 310-320 °C-an azaldu zen, arrain-gelatina (Mohajer et al., 2017) eta kitosanoaren degradazioarekin (Corazzari et al., 2015) lotua. Filmek % 30 inguruko masa-hondarra azaldu zuten, kontrol filmak izan ezik, honek % 20 inguruko balioa izanik.



5.5 irudia Arrain-gelatinazko filmen TGA-ren emaitzak masa galera kurba moduan eta kurben deribatu moduan (TGAD), a) % 10 azido zitriko eta b) % 20 azido zitriko eta kitosano kantitate ezberdineko filmak, kontrol filmarekin (0CA0CHI) alderatuz.

5.2.3 Propietate optikoak

Propietate fisiko-kimikoez eta portaera termikoaz gain, filmen itxurarekin erlazioa duten propietateak aztertu ziren, zehazki, kolorea, distira eta gardentasuna. **5.3 taulan** ikus daitekeen moduan, CIELab kolore parametroak antzekoak ziren filmetan, azido zitriko eta kitosanoaren kantitateak eraginik izan gabe. Ondorioz, kolore diferentzia totala 1 balioa baino txikiagoa zen film guztientzat, formulazioan gehigarrien txertatzeak sor zezakeen begi-hutsez antzeman zitekeen kolore diferentziarik ez zegoela adieraziz.

5.3 taula Arrain-gelatinazko filmen CIELab kolore parametroak (L^* , a^* , b^*) eta kolore diferentzia totala (ΔE^*), azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

Filma	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0CA0CHI	96,81 ± 0,17 ^a	-0,05 ± 0,02 ^b	2,36 ± 0,03 ^b	-
10CA0CHI	96,48 ± 0,07 ^b	0,00 ± 0,02 ^a	2,26 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,07 ^a
10CA3CHI	96,17 ± 0,22 ^c	-0,05 ± 0,01 ^b	2,42 ± 0,11 ^b	0,64 ± 0,12 ^b
10CA6CHI	96,03 ± 0,14 ^c	-0,12 ± 0,02 ^c	2,52 ± 0,06 ^b	0,80 ± 0,09 ^c
10CA9CHI	96,04 ± 0,05 ^c	-0,20 ± 0,02 ^d	2,77 ± 0,08 ^c	0,88 ± 0,06 ^c
0CA0CHI	96,81 ± 0,17 ^a	-0,05 ± 0,02 ^b	2,36 ± 0,03 ^b	-
20CA0CHI	96,69 ± 0,04 ^a	-0,06 ± 0,01 ^a	2,27 ± 0,05 ^a	0,15 ± 0,05 ^b
20CA3CHI	96,51 ± 0,12 ^{ab}	-0,17 ± 0,01 ^b	2,47 ± 0,05 ^c	0,34 ± 0,11 ^a
20CA6CHI	96,50 ± 0,19 ^{ab}	-0,19 ± 0,01 ^c	2,58 ± 0,05 ^d	0,41 ± 0,09 ^a
20CA9CHI	96,12 ± 0,36 ^b	-0,28 ± 0,02 ^d	2,79 ± 0,02 ^e	0,84 ± 0,06 ^b

^{a-e}Sekzio eta zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

Distira balioei dagokienez (**5.4 taula**), aldaketa nabarmenena kitosanoa formulazioetara gehitzean gertatzen zen, distira balioen txikitze esanguratsua ($P < 0,05$) gertatuz. Distiraren txikitzea eman arren, % 10 azido zitriko zuten filmek azalera distiratsuak, eta beraz leunak, mantendu zituzten 100 DU inguruko balioekin, kitosano kantitateak eragin gabe. % 20 azido zitriko zuten filmetan ordea, azalera leunak izatetik zimurrak izatera pasa ziren kitosanoaren gehitzearekin, nahiz eta honen kantitateak ez eragin aldaketa esanguratsurik ($P > 0,05$). % 10 edo 20 azido zitrikodun filmen arteko ezberdintasun hauek bat zetozen zituzten propietate fisiko-kimiko ezberdinekin, 5.2.1 atalean azaldutakoekin. Azkenik, gardentasunaren aldetik, arrain-gelatinazko

filmek ez zuten argia xurgatzen 600 nm-an, **5.4 taulako** gardentasunaren balio baxuekin ikus daitekeen moduan. Beraz, esan zitekeen azido zitriko eta kitosano kantitateak edozein izanik ere, filmak gardenak zirela.

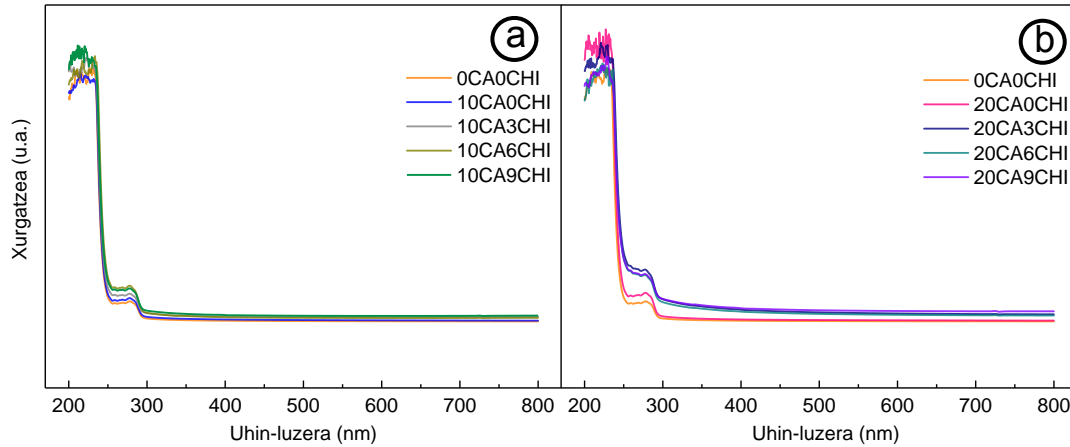
5.4 taula Arrain-gelatinazko filmen distira eta gardentasun balioak, azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

Filma	Distira (DU)	Gardentasuna
0CA0CHI	145,5 ± 5,7 ^a	0,66 ± 0,01 ^a
10CA0CHI	155,0 ± 0,7 ^a	1,18 ± 0,05 ^b
10CA3CHI	100,5 ± 2,3 ^b	1,38 ± 0,05 ^{bc}
10CA6CHI	98,1 ± 3,4 ^{bc}	0,85 ± 0,06 ^a
10CA9CHI	96,3 ± 0,5 ^c	1,63 ± 0,17 ^c
0CA0CHI	145,5 ± 5,7 ^a	0,66 ± 0,01 ^a
20CA0CHI	127,8 ± 3,2 ^b	0,71 ± 0,03 ^a
20CA3CHI	38,5 ± 0,5 ^c	1,63 ± 0,03 ^{bc}
20CA6CHI	26,7 ± 3,7 ^c	1,43 ± 0,16 ^b
20CA9CHI	25,9 ± 1,1 ^c	1,74 ± 0,08 ^c

^{a-c}Sekzio eta zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

5.2.4 Argiarekiko hesi-propietateak eta propietate mekanikoak

Argiarekiko hesi-propietateei dagokienez, UV-vis espektroak **5.6 irudian** azaltzen dira. Ikus daitekeen moduan, filmek UV argiarekiko hesi gisa jokatzen zuten 200 eta 250 nm artean, gelatinako tirosina eta fenilalanina aminoazido hondarrei esker (Gómez-Guillén et al., 2009; Nagarajan et al., 2015). Gainera, UV argiaren xurgatzea 250-280 nm tartean handitzen zen azido zitrikoaren gehitzearekin eta kitosano kantitatearen handitzearekin, hauen talde karboxilo eta hidroxilo auxokromoengatik (Jadhav & Phugare, 2012).



5.6 irudia Arrain-gelatinazko filmen UV-vis espektroak, a) % 10 azido zitriko eta b) % 20 azido zitriko eta kitosano kantitate ezberdineko filmak, kontrol filmarekin (0CA0CHI) alderatuz.

Filmek hidrofobotasuna aztertzeko ur-ukipen angeluaren neurketak egin ziren (Karbowski et al., 2006; Kokoszka et al., 2010; Oymaci & Altinkaya, 2016). **5.5 taulan** azaldu bezala, kontrol filmekin alderatuz WCA balioak azido zitrikoa edo kitosanoa gehitzean handitzen ziren, azalera hidrofoboa lortuz. % 10 azido zitrikodun filmetan balio hauek ez ziren kitosano kantitatearekin nabarmenki ($P > 0,05$) aldatzen, aldiz, WCA balioak nabarmenki ($P < 0,05$) handitzen ziren % 20 azido zitrikodun filmetan kitosano kantitatea % 0tik 9ra igotzean, % 9 kitosanoa duten filmak antzeko balioak izanik azido zitriko kantitatea kontuan hartu gabe. Filmek izaera hidrofoboaren handitze hau FTIR analisian azaldutako talde polarren arteko interakzioekin erlaziona zitekeen, talde polarren orientazioa gainazal aldera izatea oztopa baitezaketen. Azkenik, WVP-tan zentratuz, antzeko balioak lortu ziren film guztientzat, azido zitrikoa eta kitosanoa gehitzeak ez zuela filmek WVP negatiboki eragiten adieraziz. Ur lurrunaren iragazkortasuna bi etapatako prozesua da, ur lurrunaren sortzea eta ur lurrunaren difusioa barne dituen (Roy et al., 2000). Azken etapa hau proteinaren egituraren menpe dago, eta egitura hauek proteinaren talde polarren arteko interakzioen funtzioan aldatzen dira, kapitulu honetako WVP balioekin espero ziren emaitzetatik kanpo geratuz (Su et al., 2010).

5.5 taula Arrain-gelatinazko filmen hesi-propietateak (urarekiko kontaktu angelua, WCA; ur lurrunaren iragazkortasuna, WVP) eta propietate mekanikoak (trakzio-erresistentzia, TS; haustura-elongazioa, EB) azido zitriko eta kitosano kantitatearen arabera.

Filma	WCA (°)	WVP·10 ¹² (g·cm ⁻¹ ·s ⁻¹ ·Pa ⁻¹)	TS (MPa)	EB (%)
0CA0CHI	71 ± 4 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	68 ± 5 ^a	8 ± 2 ^a
10CA0CHI	112 ± 10 ^b	1,8 ± 0,2 ^a	39 ± 2 ^b	23 ± 3 ^b
10CA3CHI	100 ± 14 ^b	2,5 ± 0,5 ^b	35 ± 1 ^b	18 ± 3 ^c
10CA6CHI	125 ± 13 ^b	2,6 ± 0,2 ^b	30 ± 3 ^c	15 ± 3 ^c
10CA9CHI	118 ± 3 ^b	2,6 ± 0,3 ^b	28 ± 2 ^c	5 ± 1 ^a
0CA0CHI	71 ± 4 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	68 ± 5 ^a	8 ± 2 ^a
20CA0CHI	78 ± 5 ^b	2,1 ± 0,3 ^a	29 ± 4 ^b	17 ± 1 ^b
20CA3CHI	64 ± 4 ^a	2,3 ± 0,3 ^a	33 ± 2 ^c	22 ± 3 ^c
20CA6CHI	86 ± 2 ^b	2,5 ± 0,4 ^a	35 ± 3 ^c	18 ± 2 ^b
20CA9CHI	114 ± 1 ^c	2,7 ± 0,5 ^a	39 ± 3 ^d	22 ± 2 ^c

^{a-d}Sekzio eta zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

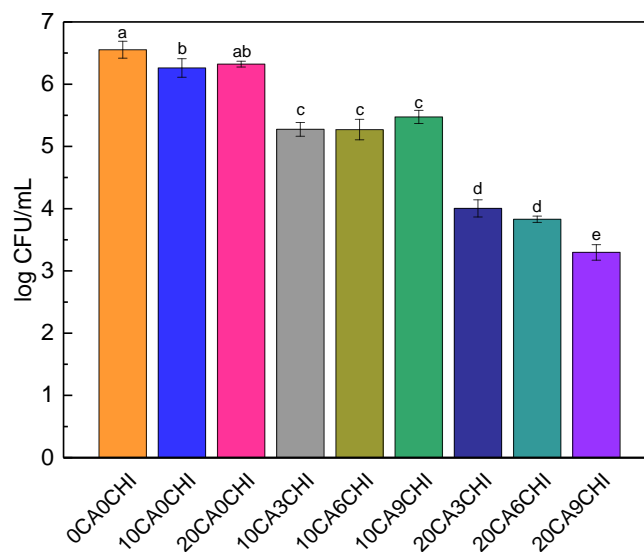
5.5 taulan azaldu bezala, azido zitrikoaren gehitzeak propietate mekanikoetan ere eragina izan zuen. Aske zegoen azido zitriko hondarrak plastifikatzaile gisa joka zezakeenez (Shi et al., 2008), TS nabarmenki ($P < 0,05$) txikitzen zen eta EB nabarmenki ($P < 0,05$) handitzen zen azido zitrikoa gehitzean. Efektu hau handiagoa zen kitosanoa % 10 azido zitrikodun filmetara gehitu zenean. Halere, kitosanoaren efektua bestelakoa zen % 20 azido zitrikodun filmetan, izan ere, bai TS eta baita EB balioak handitu ziren kitosano kantitatea handitzean. Portaera hau bat zetorren 5.2.1 atalean azaldutako hainbat propietate fisiko-kimikorekin. Errendimendu mekanikoa, bereziki % 20 azido zitrikorekin prestatutako filmena, beste zenbait azido organikorekin, hala nola, azido galikoarekin (Rui et al., 2017) edo ferulikoarekin (Benbettaïeb et al., 2015) prestatutako gelatina/kitosano filmena baina hobea zen.

5.2.5 Bakterioen aurkako analisisa

Mikrobioen aurkako aktibitatea *E. coli*-ren aurka aztertu zen eta emaitzak

5.7 irudian azaltzen dira. Nahiz eta azido zitriko askeak zenbait bakterien aurkako aktibitatea duela ikusi izan den (Mahmoud, 2014), *E. coli* barne (Firouzabadi et al.,

2014), azido zitrikoarekin prestatutako filmek hazkuntzaren murrizketa arin bat ($P < 0,05$) baino ez zuten azaltzen, seguruenik azido zitrikoak gelatinarekin interakzionatzen zuelako, FTIR emaitzetan azaldu bezala. Kitosano gehikuntzak nabarmenki ($P < 0,05$) txikitu zuen bakterioen hazkuntza, % 10 azido zitrikodun filmetan, kitosano kantitatea kontuan hartu gabe. Aldiz, % 20 azido zitrikodun filmetan, kitosano kantitatea handitzeak bakterio hazkuntzaren txikitze sendoa ($P < 0,05$) zekarren, FTIR analisisetan lortutakoarekin bat eginik (5.1 irudia).



5.7 irudia Arrain-gelatinazko filmen bakterioen aurkako aktibitatea a) % 10 azido zitriko eta b) % 20 azido zitriko eta kitosano kantitate ezberdineko filmetan.

^{a-e}Grafiko berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Tukey-ren froga anizkoitzaren arabera.

5.3 Ondorioak

Gelatinazko filmak eratzeko soluzioan azido zitrikoaren gehitzeak sortutako filmen puztea txikitu zuen, zeinak malguak eta moldagarriak ziren. Portaera hau azido zitrikoaren eta gelatina eta glizerolaren artean sortutako interakzio berrien bidez azal liteke, FTIR analisisian ikusi bezala, non azido zitriko kantitatearen eragina proteinaren egituraren eta bakterioen aurkako aktibitatean iradokitzen zen. Gainera, *E. coli*-ren hazkuntzan murrizketa ikusi zen, batik bat % 20 azido zitriko eta % 9 kitosano zuten

filmetan; azido zitrikoaren eta kitosanoaren efektu konbinatu honi esker konposatu natural hauek mikrobioen aurkako konposatu natural gisa joka zezaketen. Sortutako filmak gardenak eta kolorerik gabeak ziren eta UV izpiekiko hesi-propietate egokiak eta gainazal hidrofoboak azaldu zituzten, funtsezko propietateak elikagaiak ontziratzekeo aplikaziorako. Beraz, filmak ontziratze aktiborako erabil litezkeela azpimarra daiteke.

6 Konpresio bidez moldatutako antozianinadun arrain-gelatinazko filmak

6.1 Laburpena

Ontziratze aktibo eta adimendunek rol garrantzitsua joka dezakete elikagai hondakinak murrizteko. Hori horrela, mikrobioen aurkako eragileez gain hainbat konposatu antioxidatzaile erabiltzen dira elikagaien ontziratze materialetan (Yildirim et al., 2018). Nahiz eta gehien erabiltzen diren antioxidatzaileak molekula sintetikoak izan, konposatu naturalak ere erabil daitezke, hauen artean, antozianinak, landareetako pigmentu urdin, gorri edo moreak, bereziki, lore, fruitu eta tuberkuluetan aurkitzen direnak (Gómez-Estaca et al., 2014; Khoo et al., 2017; Stoll et al., 2017). Adibide gisa aipa daitezke aza moreko antozianinak; mundu mailako urteko batezbesteko aza produkzioa 3,1 milioi ha-tik lortutako 68 milioi tona ingurukoa da, 130 herrialde baino gehiagotan ekoiztua (Demirbas, 2016), eta eskala handiko ekoizpen honetan antioxidatzaile eduki altuko hondakin kantitate handiak sortzen dira. Aipatzekoa da antioxidatzaile fenolikoek aktibitate antioxidatzailea izateaz gain abantaila terapeutikoak azaltzen dituztela, hala nola, minbiziaren aurkakoak, hanturaren aurkakoak eta efektu bihotz-babesleak, eta beraz, balio-erantsiko bioaktiboak direla esan daiteke (Kim et al., 2009; Yates et al., 2017).

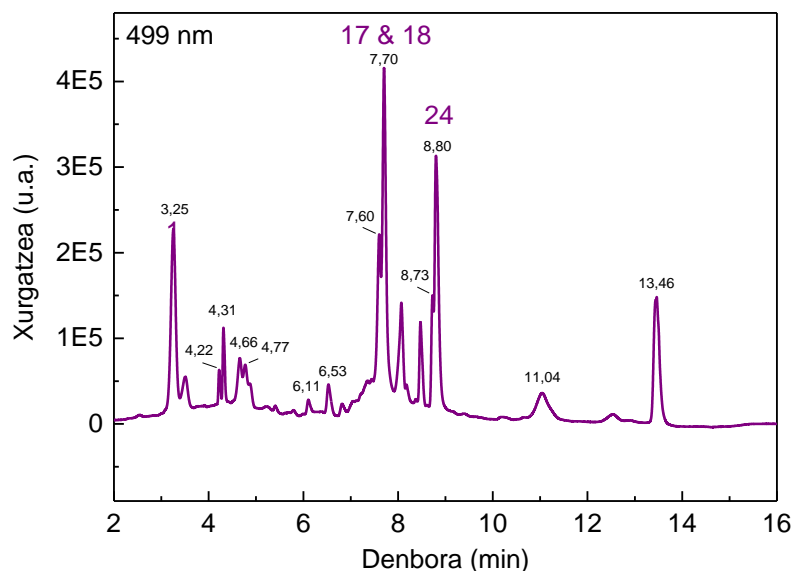
Kapitulu honetan hainbat helburu zeuden, batetik aza moretik antozianinak erauztea eta analizatzea, eta bestetik, aipatutako antozianinak antioxidatzaile gisa gelatinazko filmak eratzeko soluzioan gehitzea. Antioxidatzaileak dituzten ontziratzeen fabrikatzeari dagokionez, azken urteetan hainbat produkzio teknika landu dira (Tatara, 2017); halere, industria mailako produkzio metodoetan ikertzea falta da, esaterako estrusioan edo konpresioan, zeinak disoluzio metodoa baino azkarragoak eta eraginkorragoak diren. Hori kontuan izanik, lan honetan konpresio bidezko moldaketa modu arrakastatsuan erabili zen gelatina filmen produkzio denborak murrizteko asmotan. Gainera, erabilitako prozesatze baldintzek antioxidatzaileen aktibitatean eragin zezaketenez (Lin & Zhou, 2018; Wong & Siow, 2015), prozesatze parametroak arretaz aukeratu ziren.

Orokorrean, aza more estraktuaren identitatea eta pH sentikortasuna aztertu ziren eta baita filmen egitura, propietate mekaniko eta optikoak, eta hesi-propietateak. Gainera, antozianina hautsen eta antozianinadun filmen aktibitate antioxidatzaileak DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea erabiliz aztertu ziren eta emaitzak asko erabiltzen den antioxidatzaile natural batekin, α -tokoferolarekin, alderatu ziren.

6.2 Emaitzak eta eztabaida

6.2.1 Antozianinen karakterizazio kualitatiboa

Aza moretik erauzitako antozianinen identifikazio emaitzak **6.1 irudian** eta **S1 taulan (Datu osagarriak)** ikus daitezke. Antioxidatzaile hauek flabonoideen artean azpitalde bat osatzen dute eta fabilium (2-fenilbenzopirilium) gatzaren glikosido moduan sortzen dira (Azeredo et al., 2016). Konposatuen identifikaziorako kontuan hartu ziren gelditze-denboren analisi eta alderaketak, eta aza moretik erauzitako antozianina estraktuko seinale bakoitzaren espektroak, datu espektralak oinarritzat hartuta (UHPLC-Q-TOF-MS/MS).



6.1 irudia Aza more estraktuaren diodo detekzio aukera (DAD) kromatograma 499 nm-an.

Aza more estraktuan 11 antozianina konposaturekin erlazionatutako 31 seinale identifikatu ziren (**S1-S11 irudiak, Datu osagarriak**). Aza more estraktuko konposatu guztien zatikatzea egin ondoren, emaitzek adierazi zuten estraktua zianidinan (Cy) oinarritutako antozianinetan aberatsa zela, hainbat mono- eta di-azilatze talderekin. Identifikatutako antozianinak banaka eta bitan azilatuta zeuden, batik bat azido feruliko eta sinapikoarekin. 31 azido hidroxiznamiko deribatuek nagusiki azido p-kumarikoaren, ferulikoaren eta sinapikoaren hondarrak edo euren forma hidratatuak zituzten. Azido ferulikoak eta sinapikoak zianidinaren tetraglukosido, triglukosido, (sinapoil)tetraglukosido eta (sinapoil)triglukosidoei lotuta zeuden. Hautemandako antozianina konposatu nagusien artean, Cy-3-(SinSin)-diGlc-5-Glc zen ugariena (**6.1 irudia eta S1 taula, Datu osagarriak**). Wu & Prior (2005a) lanaren arabera, aza morea azilatutako antozianinen iturri garrantzitsua da, eta hauek antozianina guztien gehienez % 85a osatzen dute; aipatutakoa gure lan honetan berretsi ahal izan zen, ez-azilatutako antozianina bakarra, Cy-3-diGlc-5-Glc, lortu baitzen.

Aipatzekoa da gaur egun naturan 150 antozianina ezberdin ezagutzen direla (Ortiz et al., 2011). Zehazki, aza more estraktuen kasuan, beste zenbait autorek 9-36 antozianina artean aurkitu izan dituzte (Mizgier et al., 2016). Aza more estraktu gehientsuenetan antozianina egitura nagusienak zianidina glikosidoak dira, baina beste muin-unitateak, esaterako pelargonidina glukosidoak eta peonidina glukosidoak, dituzten antozianinak ere aurkitu izan dira (Wiczowski et al., 2013). Aipatzekoa da lan honetan identifikatutako antozianinen artean, azido sinapikoak esterifikatutako antozianinak (17 eta 24 seinaleak) zirela nagusi azido hidroxiznamikoak, kafeikoak, edo p-kumarikoak esterifikatutakoen aldean. Era berean, Wu & Prior (2005b) eta Ahmadiani et al. (2016) lanetan azido sinapikoak esterifikatutako antozianinak identifikatu zituzten aza moreko antozianina nagusi moduan.

Antozianinek sentikortasun handia diete degradazio erreakzioei, euren egonkortasunean eta kolorean eraginez (Qiu et al., 2018). Horrela, antozianinek pH-aren

arabera itzulgarria den egitura transformazioa jasaten dute (Lee et al., 2005; Mazza & Miniati, 2018; Pereira et al., 2015) eta **6.2 irudian** ikus daitekeen kolore aldaketa azaltzen dute, antozianinak pH adierazle moduan erabil daitezkeela iradokiz. Gainera, kolore aldaketa hau kontuan hartu beharrekoa da antozianinak pigmentu moduan erabiltzen direnean (Cortez et al., 2017).



6.2 irudia Hainbat pH-tan (estalkietan adierazia) antozianina soluzioaren kolore aldaketa.

pH-aren eragina aztertzeko asmoarekin, antozianina soluzioak hiru pH ezberdinetan prestatu ziren: basikoa (2,5), azidoa (10,0) eta aldatu-gabea (6,0).

6.1 taulan ikus daitekeen bezala, xurgatze maximoak ($\lambda_{\text{vis-max}}$) uhin-luzera altuagoetara aldatu ziren pH balioak altuagoak zirenean. Gainera, antioxidatzailearen efektu inhibitzailea txikitu zen pH balioak handitzean; antozianina soluzioaren inhibizio efektua pH 10,0ean, pH 2,5ekoarekin alderatuz % 15 inguru baxuagoa zen. Beraz, ondoriozta zitekeen pH aldaketengatik gertatutako antozianina molekuletako egitura aldaketak eragina izango zuela aktibitate antioxidatzailean.

6.1 taula Antozianinen $\lambda_{\text{vis-max}}$ eta DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea pH-aren arabera.

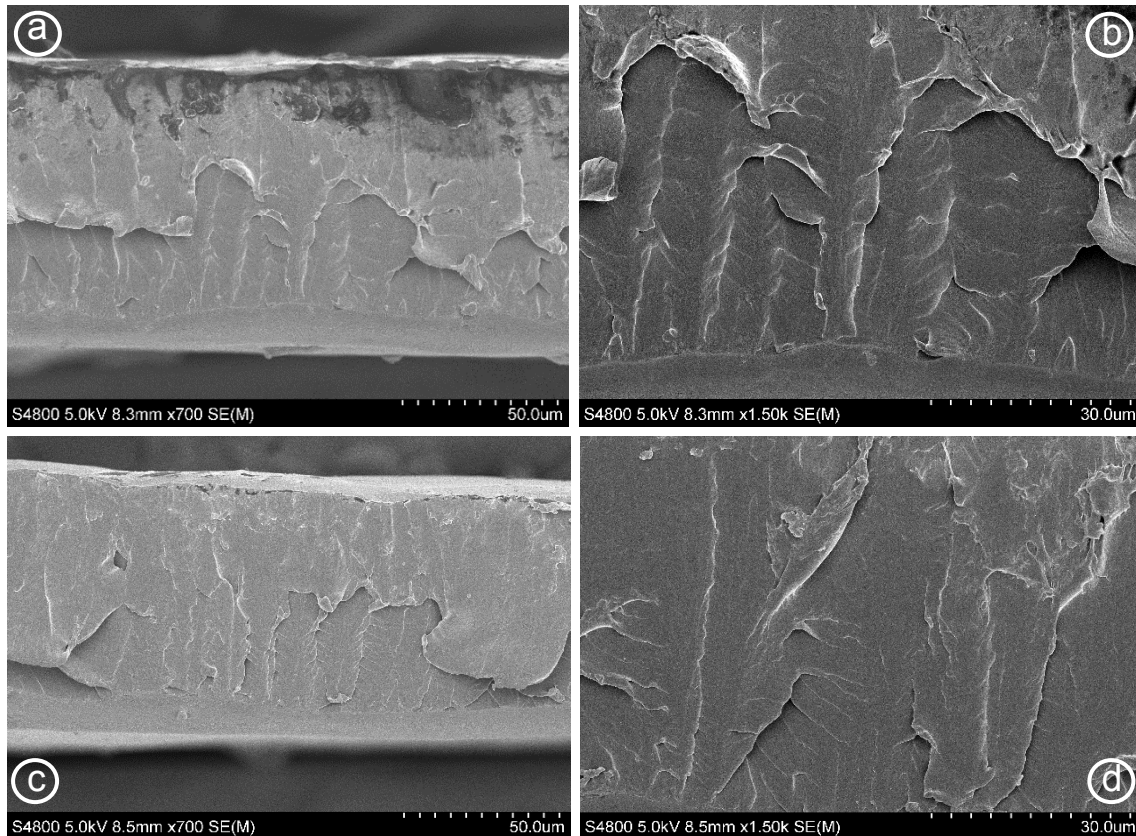
Soluzio pH-a	$\lambda_{\text{vis-max}}$ (nm)	DPPH ezabatzea (%)
2,5	526,3	94,5 ± 0,2
6,0	552,4	92,5 ± 0,4
10,0	605,6	79,2 ± 1,5

pH azidoan antozianinen inhibitzeko potentziala handia dela kontuan hartuta, gelatinazko filmak eratzeko soluzioak pH aldaketarik egin gabe prestatu ziren, izan ere,

gehitutako azido zitrikoak pH azidoa izaten laguntzen zuen, zeinetan aza moretik erauzitako antozianinek aktibitate antioxidatzailea altua zuten **6.1 taulan** erakusten den moduan.

6.2.2 Filmen propietate morfologikoak

Antozianinen gehitzeak filmaren egituraren eragina ezagutzeko, kontrol eta antozianinadun filmak SEM analisiaren bidez alderatu ziren. **6.3 irudian** erakusten den bezala, ez zen ezberdintasunik nabarmentzen bi filmen zeharkako sekzioen artean. Kontrol eta antozianinadun filmak trinko eta homogeneousak ziren, antozianinak filmean zehar ondo banatuta zeudela adieraziz.



6.3 irudia Kontrol filmen (a) x700 eta (b) x1,50k, eta antozianinadun filmen (c) x700 eta (d) x1,50k zeharkako sekzioko SEM irudiak.

6.2.3 Filmen propietate optikoak

Kontrol eta antozianinadun filmen itxura ezberdina zen, filmek antozianin gehitzean hartutako kolore arrosa dela eta (**6.4 irudia**). Kolore azterketan lortutako

emaitzek adierazi zuten antozianinadun filmak ilunagoak, gorrixkagoak eta horixkagoak zirela (**6.2 taula**), antozianinetan presente dauden eta uretan disolbagarriak diren pigmentuei esker (de Moura et al., 2018). Aldaketa hau ez da elikagaiak biltzeko aplikazioetarako desabantaila kontsideratzen, kolorea arina baita eta filmek euren gardentasuna mantentzen baitute.

are intended to be used as oral films for biomedical applications [36]. The increase did not react with gelatin and dissolved in water. In contrast to other chemical cross-linkers, the two most used cross-linkers for proteins but proved carcinogens and food additive, and thus unreacted CA is accepted as a safe component in films [37]. To explain the results shown above, FTIR analysis was carried out. FTIR spectra of the control and fish gelatin films are shown in Fig. 1. The most characteristic bands of gelatin are at 3300 cm⁻¹, N-H bending (amide II) at 1527 cm⁻¹, and C-N stretching (amide III) at 1380 cm⁻¹ corresponding to the free and bounded hydroxyl and amino groups, and the absorption bands corresponding to the C-H₂ wagging of proline [38]. The main absorption bands of glycerol appear at the 3400 cm⁻¹ vibrations of C-C and C-O bonds [39,40]. In relation to citric acid, the typical absorption bands at 1743 cm⁻¹ and are associated to free and hydrogen-bounded carboxylic groups. For citric acid-modified films, FTIR spectra are shown in Fig. 2. As can be seen, control film exhibited similar spectra (Fig. 2a), although it is worth noting that the relative intensity of the bands changed. The relative intensity of the band corresponding to the C=O of CA can be observed in Fig. 2b. The effect of CA on the FTIR spectra of the films with 0% and 10% CA is shown in Fig. 2c. The amide II and amide III bands joined and became one band. The peak at 1743 cm⁻¹ remarkably increased, and the broad band above 3000 cm⁻¹ split into two bands. When CA was incorporated into the film forming solutions, the peak at 1743 cm⁻¹ disappeared. The reaction between the carboxylic groups of CA and the amino groups of gelatin to form amide and amide formation are theoretically possible [41], as shown in Fig. 3. When an amide is formed, a peak at 1770 cm⁻¹, corresponding to the carbonyl group, a peak at 1625 cm⁻¹, corresponding to the carbonyl group in the amide appears at 1625 cm⁻¹. Considering that no peak was observed for the CA-modified films, results suggest that no imide but amide was formed between gelatin and CA, as recently reported by other authors [28]. The proposed mechanism for the reaction between gliadin (used as a protein model to study the reaction) and CA in films were prepared at basic conditions (pH = 10) and thus, carboxylic groups of CA react with the amine group of protein attacks one of the carbonyl groups of CA according to Xu et al. [28], the amine group of protein attacks one of the carbonyl groups of CA.

6.4 irudia Kontrol eta antozianinadun filmen itxura.

Distirari dagokionez ere, kontrol eta antozianinadun filmen artean ezberdintasunak zeuden. **6.2 taulan** erakusten den moduan, antozianinen gehitzearekin distira txikitu zen, azalera latzagoak, inprimatzeko egokiagoak direnak, lortuz (Tišler-Korljan & Gregor-Svetec, 2014). Inprimatzeko gaitasuna izatea beharrezko da filmekin informazio komertziala azaltzeko helburua dagoenean.

6.2 taula Kontrol eta antozianinadun filmen kolore eta distira balioak.

Antozianinak (%)	L*	a*	b*	ΔE*	Distira (DU)
0	94,86 ± 0,25	-0,11 ± 0,04	4,98 ± 0,20	-	31,3 ± 1,0
10	89,44 ± 0,81	4,96 ± 0,52	6,41 ± 0,36	7,56 ± 0,98	23,2 ± 0,6

6.2.4 Hesi-propietateak eta propietate mekanikoak

Gelatinazko filmak urarekiko sentikorrek diren arren antozianinen gehitzeak WCA handitu zuen. Hau antozianinen hidroxilo taldeen eta gelatinaren talde polarren arteko

interakzioengatik gertatu zen, horrela talde polarrak filmen egituraren barruko aldera zuzendu eta film hidrofoboak lortuz (**6.3 taula**). Aurretik aipatutakoa kontuan hartuz eta iragazkortasuna gainazalaren izaeraren eta ur lurrunaren filmean zeharreko difusioaren baitan dagoela gogoan hartuz, badirudi antozianinen izaera polarrak difusioan laguntzen zuela, WVP balioak ez baitziren aldatu antozianinen gehitzearekin. Modu berean, propietate mekanikoak ez ziren bereziki aldatu antozianinen gehitzearekin (**6.3 taula**).

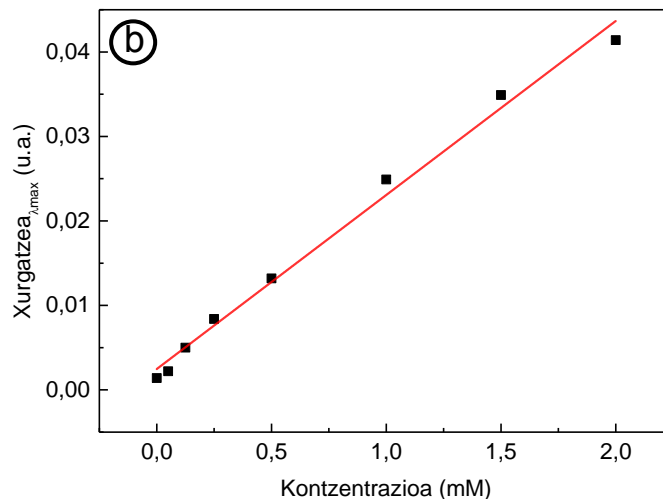
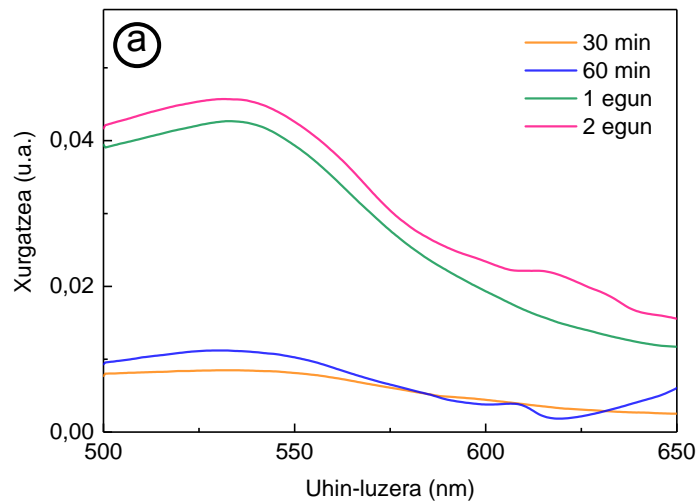
6.3 taula Kontrol eta antozianinadun filmetan ur-ukipen angelua (WCA), ur lurrunaren iragazkortasuna (WVP), trakzioarekiko erresistentzia (TS) eta deformazio (EB) balioak.

Antozianinak (%)	WCA (°)	WVP·10 ¹² (g·cm ⁻¹ ·s ⁻¹ ·Pa ⁻¹)	TS (MPa)	EB (%)
0	76,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	33,4 ± 6,5	3,0 ± 0,8
10	115,9 ± 2,9	2,5 ± 0,1	41,3 ± 2,7	3,9 ± 0,5

6.2.5 Antioxidatzailearen askatzea eta filmen aktibitate antioxidatzailea

Ontziratzekeo filmetatik antioxidatzaileen askatzea egitea antioxidatzaileak zuzenean elikagaien gehitzea baino eraginkorragoa izan daiteke oxidazio inhibiziorako, horrela antioxidatzaileak degradaziotik babes baitaitezke. Gainera, ontziratzekeo antioxidatzailearen askatze kontrolatu bat izateak eraginkortasun galera ekidin dezake, aktibitate antioxidatzailea denbora luzeagoan mantenduz (Chen et al., 2012). Kontuan hartuta lan honetan prestatutako filmak prozesatutako elikagaiak biltzeko ontziratze egokiak izan zitezkeela (Singh et al., 2009), antioxidatzailearen askatzea % 50 etanol, elikagaiak simulatzen dituen disolbatzailea, erabiliz egin zen Erregulazio Komisio No 10/2011 (EU, 2011) jarraituz.

Emaitzek adierazi zuten antioxidatzailearen askatzea azkar eman zela lehen egunean, 552 nm-an 0,038-ko absortzioa azalduz eta beraz, 1,75 mM antozianina askatu zela adieraziz; ondoren, askatzeak jarraitu zuen, bigarren egunaren amaieran 552 nm-an 0,042-ko absortzioa, hots, 1,91 mM antozianinen askatzea, lortuz (**6.5 irudia**). Prestatutako laginek 2 mM antozianina zuten, esan daiteke bi egunetan % 95,5 antozianina aska zitezkeela.



6.5 irudia Filmetatik antioxidatzailearen askatzea denboran zehar (a) eta kalibrazio kurba (b).

Horretaz gain, DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea aztertu zen filmen aktibitate antioxidatzailea ezagutzeko. Análisi honetan zehaztutako inhibizio balioa % 91,45koa ($\pm 1,09$ desbiderapenarekin) izan zen; emaitza hau pH 6,0-ko antozianina soluzioak erakutsi zuenaren antzekoa da (6.1 taula). Hori horrela, filmak eratzeko soluzioan gehitutako antozianinek filmen prozesatzearen ondoren euren aktibitatea mantendu zuten, aplikazio komertzialetarako garrantzi handikoa izanik. Azkenik, lortutako emaitza α -tokoferolaren, asko erabiltzen den antioxidatzaile naturalaren,

balioekin alderatu zen. α -tokoferolarekin eginiko analisisian inhibizio balioak linealki handitu ziren 0,03 mM arte eta kontzentrazio handiagoak erabiliz ez zen antioxidatzaile efektuan aldaketarik eragiten, inhibizio balioak % 96 inguruan mantenduz, beste zenbait autorek ikusi moduan (Byun et al., 2010; Martins et al., 2012). Balio hau antozianinadun gelatinazko filmetan lortutakoaren antzekoa zen.

6.3 Ondorioak

Aza moretik antozianinak prozesu sinple eta ekologiko bat erabiliz lortu ziren. Antioxidatzaile hauek zianidinan aberatsak ziren eta pH-arekiko sentikorrak, zehazki pH-aren arabera kolorean eta aktibitate antioxidatzailean aldaketak azalduz. Gelatinazko filmak eratzeko soluzioan antozianinak gehitzean film hidrofoboak lortu ziren. Film hauek konpresio bidezko moldaketa erabiliz modu arrakastatsuan prestatu ziren, SEM irudietan azaldu bezala, film homogeenak lortuz eta antozianinen gehitzeak honetan eragin gabe. Propietate optikoak aldiz, antozianinen gehitzearekin aldatu ziren. Horrela, azalera latzagoak lortu ziren antozianinadun filmetan. Propietate antioxidatzaileei dagokienez, filmek antioxidatzaileen askapen kontrolatua azaldu zuten elikagaiak simulatzen dituen disolbatzailean, % 92ko inhibizioa agertuz. Gainera, antozianinek α -tokoferolaren, asko erabiltzen den antioxidatzaile naturalaren, antzeko aktibitate antioxidatzailea erakutsi zuten. Beraz, antozianinadun arrain-gelatinazko filmek elikagaien iraungitzea luzatzeko film aktibo gisa erabiltzeko potentziala dutela esan zitekeen.

7 Kitina eta THC gehituta dituzten liofilizatutako arrain-gelatinazko materialak

7.1 Laburpena

Itsas hondakinetatik erauzitako biopolimeroek hainbat erabilera izan ditzakete. Batetik, ontziratze aktiboak prestatzeko erabil daitezke (de la Caba et al., 2019), horrela garapen jasangarrirako helburuekin bat egin eta elikagaien iraungitzea luzatu eta jakien galera gutxitu dezakete. Bestetik, geroz eta gaixo gehiagok produktu natural eta ez-inbaditzaileak eskatzen dituztela kontuan hartuta, biopolimero hauek bioaktiboen eramaile gisa erabil daitezke (Centella et al., 2017). Hortaz, agente antioxidatzaileak edota bakterioen aurkako eragileak zuzenean aplikatu beharrean askapen sistemetan gaineratuz gero, agenteen eraginkortasun iraupena luzatu eta askapen jarraitu bat izatea lortu zitekeen (da Silva et al., 2018; Wang et al., 2019). Horrelako sistemak hainbat helburu lortzeko aztertu izan dira, adibidez hezetasuna kontrolatzeko (Wang et al., 2017b). Ur askea erreakzio kimiko edo biokimikoak gertatzen eta mikrobioak hazten direneko disolbatzailea dela jakinda (Qiu et al., 2019), sistema hauetan hezetasun kondentsazioaren kontrola izateak abantailak dakartza hainbat aplikaziotarako, esaterako elikagaien kontserbaziorako (Jalali et al., 2019) edo zaurien sendatzerako (Etxabide et al., 2017c). Hau horrela, polimero naturalekin, hala nola, gelatinarekin, prestatutako hidrogelek hezetasunaren xurgatzaile gisa joka dezakete, proteina hau ur molekularak adsorbatzeko talde funtzional asko dituen material higroskopikotzat hartzen baita (Batista et al., 2019; Esquerdo et al., 2019; Shankar et al., 2016). Xurgatze propietateei dagokienez, egitura porotsuaren, poro azaleraren eta poro tamainen antolamenduaren mende daude (Offeddu et al., 2016; Saliba et al., 2016; Varley et al., 2016).

Azterketa honen helburua itsasoko biohondakinak, hala nola, arrain azaletik eskuratutako gelatina eta txibia lumetatik erauzitako kitina, balioztatzea eta hauekin bioaktiboen eramaile eta hezetasunaren xurgatzaile gisa erabil zitezkeen material porotsuak prestatzea zen. Zehazki, azido zitrikoarekin saretutako arrain-gelatinazko produktuak prestatu ziren, hauek tetrahidrokurkumina (THC) bioaktiboa zutelarik; azken

eragile hau kurkuminaren (*Curcuma longa* Linn) hidrogenatutako metabolito kolore gabea da (Liu et al., 2017), *Zingiber officinale* eta *Curcuma zedoaria*-n naturalki dagoena (Tsai et al., 2017). Gainera, sendotze eragile gisa txibia lumetatik erauzitako kitina erabili zen eta erauzketa prozesu honen ingurumen azterketa egin zen. Bestalde, propietate fisiko-kimikoak, morfologikoak eta mekanikoak, zein hezetasun absortzioaren gaitasuna eta THC askapena aztertuz liofilizatutako produktuen karakterizazioa burutu zen.

7.2 Emaitzak eta eztabaida

7.2.1 Kitina erauzketaren ingurumen azterketa

Kitina hainbat iturritatik erauz daiteke, esaterako, izkira edo karramarro oskoletatik eta txapiro edo txibia lumetatik. Horrela, kitinaren erauzketarako erabilitako itsas iturriaren arabera kitina kantitatea zeharo aldatzen da. Abdou et al. (2008) lanaren arabera, krustazeoen oskoletatik erauzitako kitina kantitatea % 20 ingurukoa da eta hau, kaltzio karbonatoa, % 50 baino kantitate handiagoan aurki daitekeen konposatua, bereizteko erabilitako desmineralizazio prozesuaren ondoren lortzen da. Txibia lumen kasuan berriz kitina kantitatea % 50 izatera irits daiteke, mineralen edukia % 5 baino baxuagoa baita. Hori horrela, txibia lumak kitina erauzteko lehengai modura erabiltzen direnean ingurumen-abantailak lortuko dira, desmineralizazio eta dekolorazio prozesuak eta eurretan erabiltzen diren kimikoak eta energia saihestu baitaitezke. Beraz, txibia lumak erabiltzean abantaila ekonomikoak egongo dira, batetik, aipatutako prozesu horiek saihestuz erauzketa prozesuan errekurtsio (materialak, energia, denbora) gutxiago erabiliko direlako eta bestetik, txibia lumak erabiltzean krustazeo oskolen kasuan baino kitina gehiago erauztea lortuko delako.

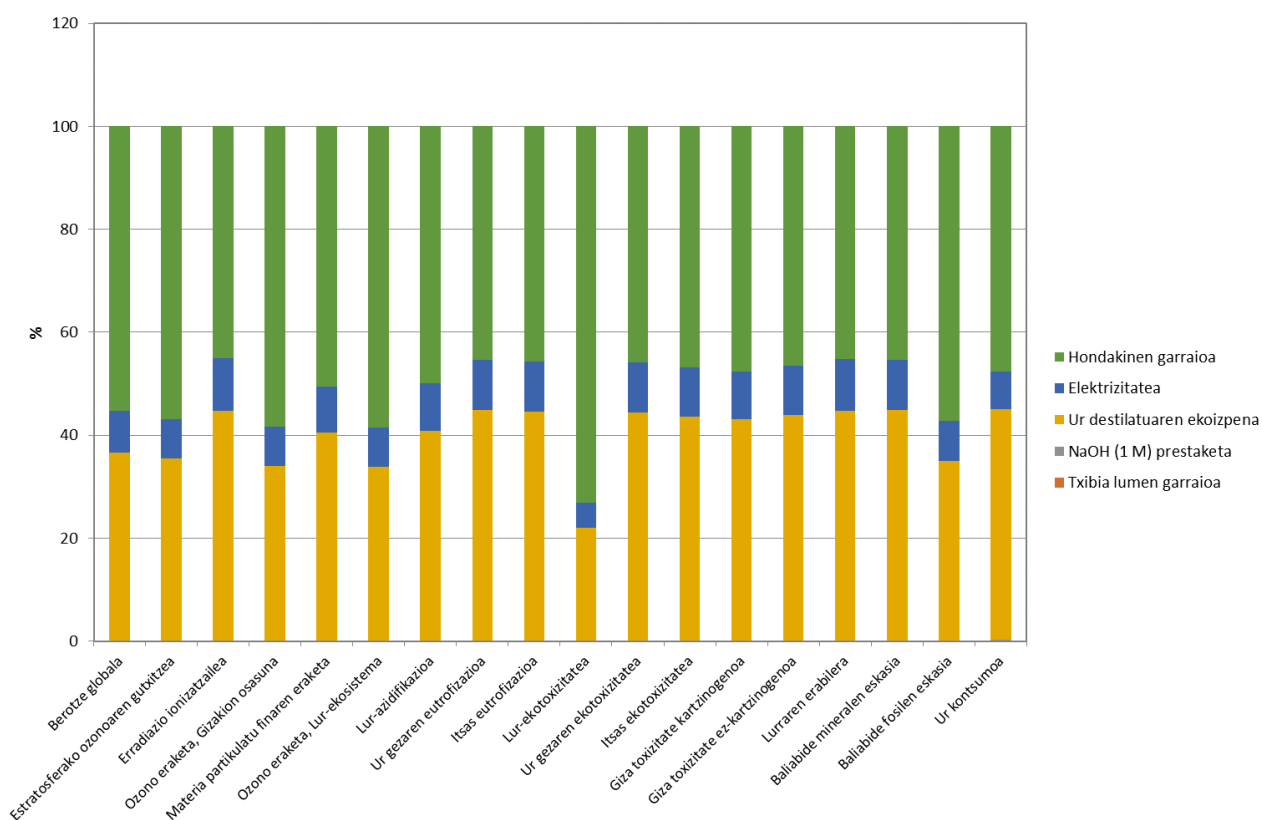
Txibia lumetatik kitina erauzteak ingurumenean zer nolako eragina zuen aztertu zen. Horretarako hainbat etapa kontuan hartu ziren: txibia lumen garraioa, ur destilatuaren ekoizpena, NaOH prestaketa, kitina erauzketa prozesua, eta ur-hondakinen tratamendu plantarainoko garraioa. Ur destilatuaren ekoizpenari

dagokionez, prozesu osoan zehar 3 L ur destilatu ibiltzen zirela kontuan hartu zen. Bestalde, 2.3 atalean azaldu bezala, erauzketa prozesurako NaOH (1 M) 1:20 (w/v) erlazioan erabili zen. Hortaz, NaOH soluzioaren prestaketa kontuan hartu zen. Aipatzekoa da txibia lumen propietateengatik desmineralizazio eta despigmentazio pausuak ez direla behar, konposatu inorganiko gutxiko pigmenturik gabeko lumak baitira (Muxika et al., 2017). Hori horrela, prozesatze denbora, azido kutsatzaileen erabilera eta ur-hondakin kantitate handien sorrera nabarmen txikitzen da eta beraz, disolbatzaile kimiko gutxiago erabiltzen dira eta energia gutxiago kontsumitzen da, inpaktu kategorien balioak murriztuz (7.1 taula).

7.1 taula Kitina erauzketa prozesuaren inpaktu kategorien balioak.

Inpaktu kategoria	Unitatea	Totala
Berotze globala	kg CO ₂ baliokide	0,9150
Estratosferako ozonoaren gutxitzea	kg CFC11 baliokide	4,79·10 ⁻⁷
Erradiazio ionizatzailea	kBq Co-60 baliokide	0,4272
Ozono eraketa, Gizakion osasuna	kg NO _x baliokide	0,0033
Materia partikulatu finaren eraketa	kg PM2,5 baliokide	0,0021
Ozono eraketa, Lur-ekosistema	kg NO _x baliokide	0,0033
Lur-azidifikazioa	kg SO ₂ baliokide	0,0052
Ur gezaren eutrofizazioa	kg P baliokide	0,0003
Itsas eutrofizazioa	kg N baliokide	2,73·10 ⁻⁵
Lur-ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	1,1700
Ur gezaren ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	0,0104
Itsas ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	0,0149
Giza toxizitate kartzinogenoa	kg 1,4-DCB	0,0252
Giza toxizitate ez-kartzinogenoa	kg 1,4-DCB	0,3039
Lurraren erabilera	m ² a uzta baliokide	0,0180
Baliabide mineralen eskasia	kg Cu baliokide	0,0008
Baliabide fosilen eskasia	kg olio baliokide	0,2545
Ur kontsumoa	m ³	0,0097

Erauzketa prozesua sakon aztertzeko, kalkulaturako inpaktu kategorietan etapa bakoitzaren ekarpena ebaluatu zen (**7.1 irudia**). Espero moduan, hondakinen garraioa eta ur destilatuaren ekoizpena ziren inpaktu kategoria balio totaletan gehien eragiten zuten faktoreak (Lopes et al., 2018), inpaktu totalen % 90 inguruaosatuz. Lan honetan erabilitako erauzketa baldintzak beste azterketa batzuekin alderatuz ez dira oso gogorrak, batik bat NaOH kontzentrazioari dagokionez; beraz, pH-aren neutralizatorako ur gutxiagoren erabilera eta ur-hondakin gutxiagoren sorrera aurki zitezkeen prozesu honetan, kitinaren erauzketa prozesuaren ahulguneak nabarmen txikituz. Hau guztia kontuan hartuta, kitinaren erauzketa prozesu honek beste lan batzuekin alderatuz abantaila aipagarriak zituela eta ingurumenean eragin txikiagoa zuela ondorioztatu zen. Beraz, gelatina laginetan gehitzeko kitina erauzteko metodo hau aukeratu zen.



7.1 irudia Inpaktu kategorietan etapa bakoitzaren ekarpena (hondakinen garraioa, elektrizitatea, ur destilatuaren ekoizpena, NaOH (1 M) prestaketa, eta txibia lumen garraioa).

7.2.2 Propietate fisiko-kimikoak

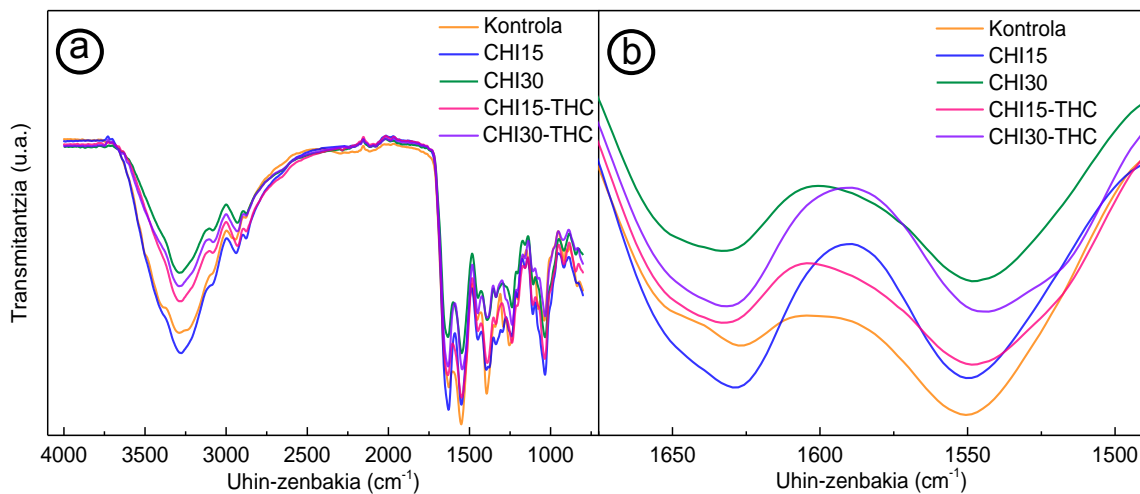
Erantsitako gehigarriengatik gelatina laginetan sortutako elkarrekintzak aztertzeko FTIR analisisia burutu zen. Konposatu puruei dagokienez (**7.2 taula**), gelatinak eta kitinak -OH eta -NH taldeekin ($3500-3000\text{ cm}^{-1}$), I amidarekin (1630 cm^{-1}), II amidarekin (1537 cm^{-1}) eta III amidarekin (gelatinarentzat 1238 cm^{-1} eta kitinarentzat 1304 cm^{-1}) erlazionatutako seinaleak zituzten (Jalaja et al., 2016). Azido zitrikoaren kasuan, 1690 eta 1743 cm^{-1} -eko seina nabarmenak C=O taldeen luzapen moduekin zeuden lotuta (Ramirez et al., 2017), zehazki aske eta hidrogeno zubizko loturak dituzten talde karboxilikoekin erlazionatuta. Glizerol puruak aldiz bost ohiko xurgatze talde zituen $800-1150\text{ cm}^{-1}$ tartean, C-C eta C-O loturen bibrazioekin lotuta (Basiak et al., 2018). Azkenik, THC-aren seinale bereizgarriak bentzeno eraztunaren eskeletoko C-C luzapenekin (1598 cm^{-1}), C-O luzapenekin (1510 cm^{-1}) eta C-H planoko tolesteeekin (1431 cm^{-1}) zeuden lotuta (Etxabide et al., 2017b; Songtipya et al., 2016).

7.2 taula Gelatinazko laginak prestatzeko erabilitako konposatu puruen FTIR seinale esanguratsuenen laburpena.

Konposatu purua	FTIR seinalea (cm^{-1})	Talde funtzionala
Gelatina	3500-3000	Aske eta lotutako -OH eta -NH
	1632	I amida (C=O luzapena)
	1527	II amida (N-H tolestea)
	1238	III amida (C-N luzapena)
Azido zitrikoa	1743	Hidrogeno zubiz lotutako -COOH
	1690	-COOH askeak
Glizerola	800-1150	C-C eta C-O bibrazioak
Kitina	3452	-OH luzapena
	3269	-NH luzapena
	1629	I amida (C=O luzapena)
	1547	II amida (planoan N-H tolestea eta C-N luzapena)
	1304	III amida (CONH taldearen plano modua)
THC	1598	Bentzeno eraztunaren eskeletoko C-C luzapena
	1510	C-O luzapena
	1431	Planoan C-H tolestea

Gelatinazko laginen FTIR espektroetan ikus daitekeen bezala (**7.2a irudia**), kitina eta THC gehitzeak aldaketak zekartzan 3000 cm^{-1} inguruko seinale zabalean. Hidrogeno

zubizko loturengatik seinale honen zabalera eta intentsitatea aldatu egin ziren (Chen et al., 2014). 3500-3000 cm^{-1} inguruan azaldutako seinalearen intentsitate baxuagoak hidrogeno zubizko lotura intermolekular edo intramolekular gehiagoren presentziarekin lotu zitezkeen hain zuzen (Deng et al., 2018). Horrela, kitina kantitate handiko laginek, (% 30 kitina, CHI30) kitina gabeko edo kitina kantitate baxuagoko laginekin (% 15 kitina, CHI15) alderatuz, hidrogeno zubizko lotura gehiago zituzten. β -kitinak antolamendu paraleloa du, xaflen artean hidrogeno zubizko loturak urriak izanik (Cuong et al., 2016); halere, kitinan presente dauden azetilo taldeei esker gelatinarekin hidrogeno zubizko loturak sortu daitezke (Yu & Lau, 2017). Gainera, THC gehitzean % 15 kitinadun laginetan hidrogeno zubizko lotura gehiago sortu ziren, THC-an presente dauden hidroxilo taldeei esker (Etxabide et al., 2018). CHI30 eta CHI30-THC laginek berriz, antzeko intentsitatea zuten, segur aski kitina kantitate handiengatik sortutako eragozpen esterikoagatik (Gutiérrez et al., 2019).



7.2 irudia Gelatinazko laginen FTIR espektroak, kitina eta THC kantitatearen arabera.

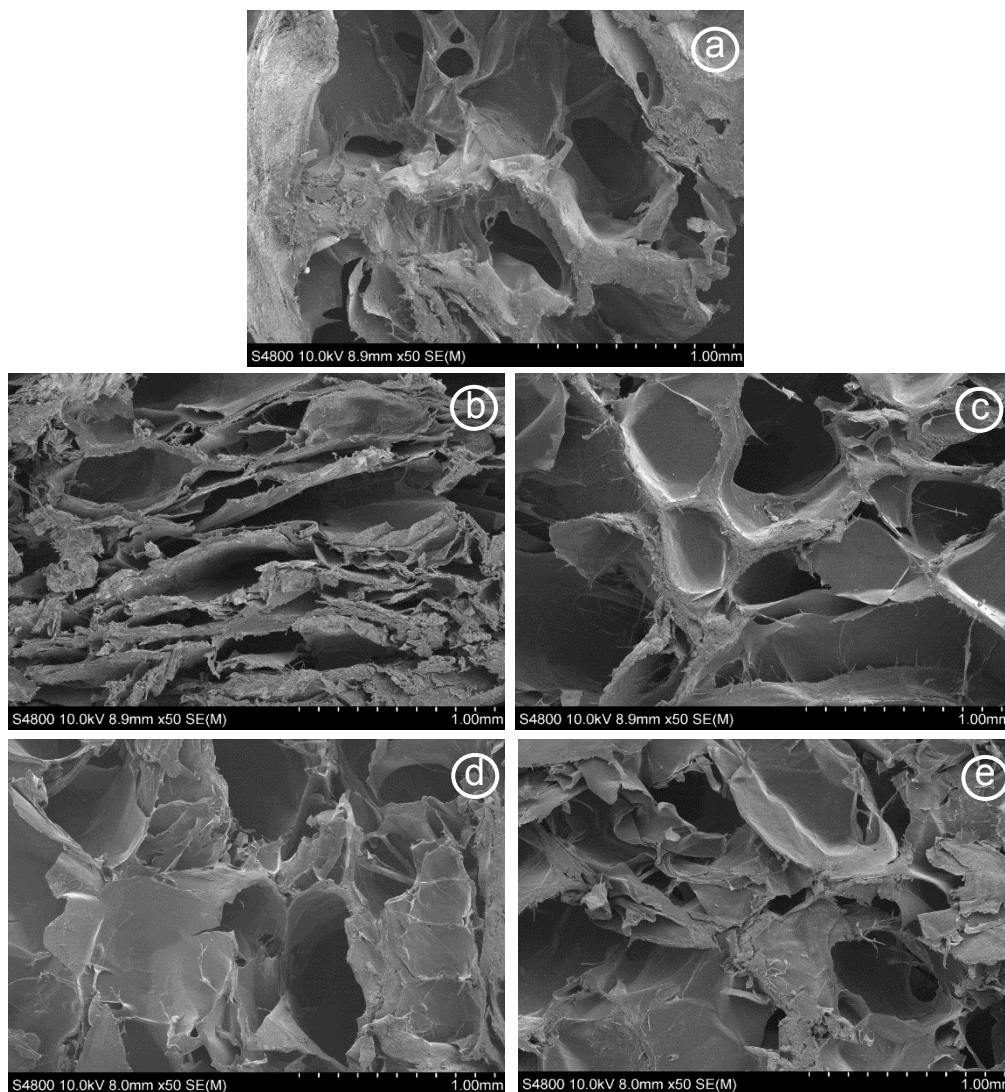
Hidrogeno zubizko loturez gain, azido zitrikoari esker lotura kimikoak sor daitezke, azidoaren talde karboxilikoaren eta gelatinaren amino taldeen artean erreakzioa gertatuz (Zhang et al., 2016). Azido zitrikoaren eta gelatinaren artean gertatutako erreakzio hau 1743 eta 1690 cm^{-1} -ean kokatutako azido zitrikoaren seinale

esanguratsuen desagerpenarekin baiezta daiteke (Zhou et al., 2016). Gainera, **7.2b irudian** ikus daitekeen I amida ($\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$) eta II amidaren ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) arteko intentsitate erlatiboaren aldaketak, erreakzioaren inguruko informazio baliagarria ematen zuen. THC edota kitina zuten laginetan bi seinale hauen arteko intentsitate erlatiboa antzekoa zen bitartean, kontrol laginetan II amida seinaleak I amidak baino intentsitate handiagoa zuen. Aurreko kapituluetan erakutsi den bezala, honek azido zitrikoaren eragina kontrol filmetan nabarmenagoa zela iradokitzen zuen, eta beraz, gehigarrien gaineratzeak erreakzioa oztopatzen zuela esan zitekeen.

7.2.3 Laginen morfologia eta porositatea

Hezetasunaren absortzioa bultzatzeko material porotsuak prestatu ziren. SEM irudietan ikus daitekeen moduan (**7.3 irudia**), lagin guztiek egitura porotsua zuten, ausaz banatutako hainbat tamaina eta formatako poroak erakutsiz. Orokorrean, kitinadun laginek kontrolak baino poro definituagoak zituztela esan zitekeen. Gainera, gelatinaren eta kitinaren arteko bateragarritasun ona ikusi zen, izan ere, ez zen kitina metaketarik erreparatu.

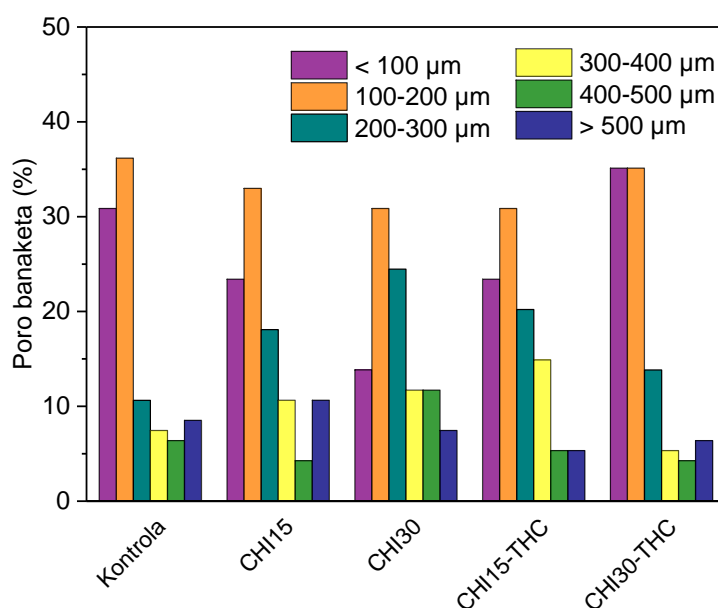
Kitina eta THC-aren gehitzeak ez zuen poroen batezbesteko tamainan eragin eta balio hau $200 \mu\text{m}$ inguruan mantendu zen. Halere, desbiderapen balio handiek poro tamaina tarte handia zegoela ezagutarazi zuten (**7.3 taula**). Beraz, gelatinazko laginen barne morfologia sakonago aztertzeke, poro tamainen banaketa aztertu zen eta emaitzak **7.4 irudian** azaltzen dira. Kontrol laginekin alderatuz, $100\text{-}200 \mu\text{m}$ tamainako poroen portzentajea kasu guztietan antzekoa zen eta poro txikien ($< 100 \mu\text{m}$) kantitatea berriz, THC edota kitinaren gehitzearekin gutxitzen zen, CHI30-THC laginetan salbu, hauek poro txiki gehien zituzten laginak baitziren, segur aski FTIR emaitzetan azaldu bezala hidrogeno zubizko loturen eragozpenagatik. Bestalde, poro handien ($> 500 \mu\text{m}$) portzentajerik handiena THC-rik gabeko laginetan ikusi zen; kasu guztietan portzentaje honen balioa % 10 ingurukoa edo txikiagoa zen.



7.3 irudia (a) Kontrol, (b) CHI15, (c) CHI30, (d) CHI15-THC eta (e) CHI30-THC laginen SEM mikrografiak.

7.3 taula Gelatinazko laginen poro tamainen tartea kitina eta THC kantitatearen arabera.

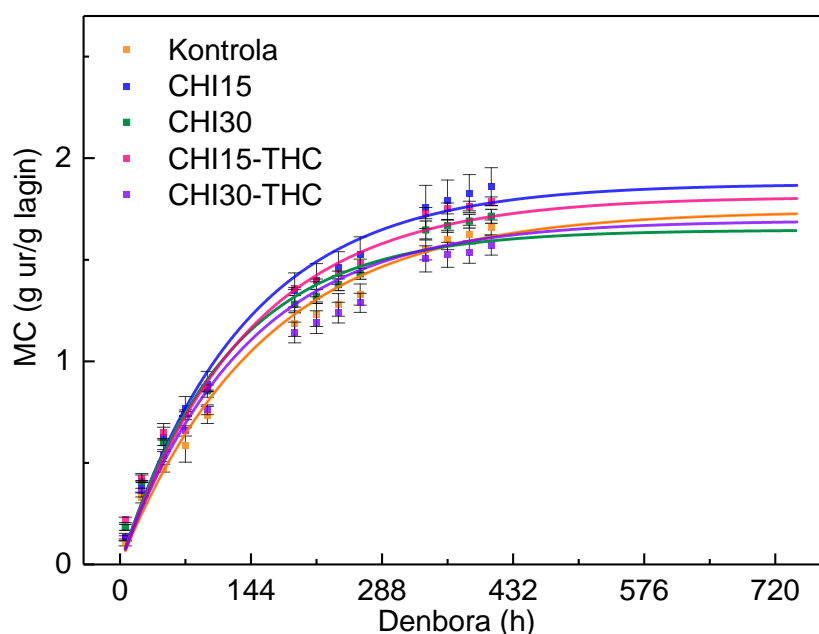
Lagina	Poro tamainen tartea (μm)
Kontrola	21-1027
CHI15	29-2129
CHI30	33-1315
CHI15-THC	10-889
CHI30-THC	22-816



7.4 irudia Gelatinazko laginen poro tamainen banaketa kitina eta THC kantitatearen arabera.

7.2.4 Hezetasun absortzioa

Gelatinazko laginetan hezetasunaren xurgatzea denboran zehar nabarmen handitu zen (**7.5 irudia**); lehen egunetan absortzioa azkarra zen eta ondoren, dezente mantsotu zen. 18 egunen ostean lortutako balioek (erakusten ez diren balioak) ziurgabetasun handia azaltzen zuten, xurgatutako hezetasun kantitate handiek laginen narriadura zekartelako. Weibull ereduak hezetasun absortzioa denboran zehar modu egokian deskribatu zuen, determinazio koefizientearen (R^2) balioa 0,9 baino altuagoa izanik (**7.4 taula**). Orekako hezetasun edukiera (M_∞) lagin ezberdinen artean pittin bat aldatu zen, aurretik aipaturiko poroen batezbesteko tamaina antzekotasunaren arabera, eta lortutako balioak 1,65-1,87 g ur/g lagin inguruan zeuden. Ura absorbatzeko antzeko gaitasuna ikusi izan da beste egile batzuen esku (Zhang et al., 2019), zeinek *Rosa rugosa* petaloetatik bi polisakarido ezberdin isolatu zituzten eta hauek % 81eko hezetasun erlatiboan 96 ordu egon ondoren 0,337 eta 0,668 g ur/g polisakarido xurgatzen zuten. Bestalde, gelatinazko lagin guztiek 6 egun inguru behar zituzten hezetasun absortzioaren % 63 ingurua (β_1) lortzeko.



7.5 irudia Gelatinazko laginen hezetasun absortzioa kitina eta THC kantitatearen arabera.

7.4 taula Gelatinazko laginen M_∞ , β_1 eta R^2 emaitzak kitina eta THC kantitatearen arabera.

Lagina	M_∞ (g ur/g lagin)	β_1 (ordu)	R^2
Kontrola	1,74	156,23	0,99
CHI15	1,87	136,18	0,97
CHI30	1,65	119,27	0,91
CHI15-THC	1,81	139,92	0,98
CHI30-THC	1,69	136,29	0,95

M_∞ eta β_1 balio hauek tenperatura eta hezetasun erlatiboarekiko sentikorak dira eta ontziratzearen inguruneak eragin egiten die (Gaona-Forero et al., 2018): tenperatura igotzen bada bai abiadura eta baita absortzio edukiera handituko dira; hezetasun erlatiboa txikitzen bada berriz, absortzio edukiera txikituko da. Aipatzekoa da hezetasun xurgatzaileak kontu handiz erabili behar direla ur-aktibitate handia duten produktuetan, fruitu freskoak eta barazkiak kasu, hauetan hezetasun gehiegi galtzea saihestu behar baita (Rux et al., 2015). Beraz, lan honetan prestatutako gelatinazko laginek zenbait

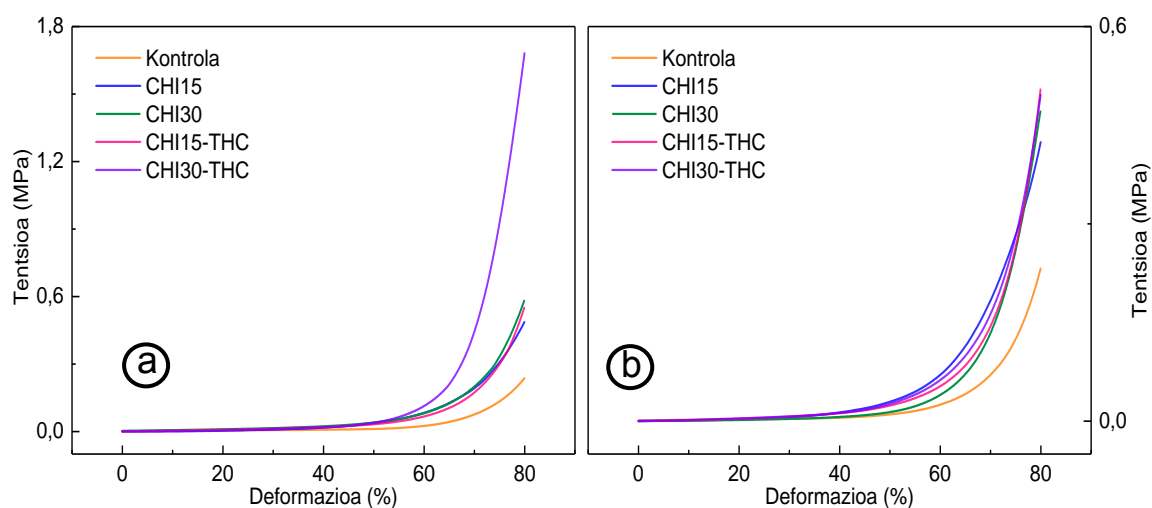
egunetan hezetasuna xurgatzeko gaitasuna erakusten badute eta hezetasun xurgatzaile egokitzat eduki badaitezke ere, elikagaien ontziratzeke aplikaziorako egokiak diren jakiteko analisi sakonagoa egitea beharrezkoa da. Gainera, mota honetako materialek osasun eta higiene-zaintzarekin lotutako beste zenbait aplikazio izan ditzakete (Álvarez-Castillo et al., 2018).

7.2.5 Portaera mekanikoa

Laginen konpresioarekiko erresistentzia aztertu zen euren bizialdian zuten portaera mekanikoa ebaluatzeko eta hezetasun absortzioak propietate mekanikoetan zuten eragina ezagutzeko. **7.6 irudian** ikus daitekeen moduan, dentsitate baxuko zelda irekiko aparren kurba karakteristikoak lortu ziren, lautada eta dentsifikazio erregimenekin; zaila da hasierako zona lineal elastikoa identifikatzea (Grover et al., 2012). Beraz, tentsio balio arinak erabili ziren % 40rainoko deformazioak lortzeko. Ondoren, laginek tentsio handiagoak jasan zitzaizketen eta horrela, % 80ko deformaziora arte konprimatu. Dentsifikazio prozesu honetan lagin porotsuak oso konprimatuta gelditzen dira eta deformazio baxuak bakarrik onartzen dituzte (Tonda-Turo et al., 2011). Azkenik, aplikatutako indarra kenduta laginek euren hasierako forma errekuperatu zuten, 6 egunez ganberan gordeta (**7.6a irudia**) xurgatutako hezetasunarengatik lortutako elastikotasunari esker (Duconseille et al., 2017). Antzeko erantzun elastiko ez-lineala lortu zen Czerner et al. (2016) lanean, kasu honetan behi eta txerri geletan. Aipatzekoa da, kitina eta THC gehitzean tentsioarekiko erresistentzia nabarmen handitzen zela. Zehazki, kitina eranstea tentsioarekiko erresistentzia 0,24 MPa-etatik (kontrola) 0,58 MPa-etara (CHI30) handitzen zen, eta handitze hau nabarmenagoa zen formulaziora kitina eta THC biak gehitzen zirenean, CHI30-THC laginak % 80ko deformazioan 1,68 MPa jasanez.

Laginak beste 11 egunez ganberan gordeta egon ostean bigarren analisia egin zen eta antzeko tentsio-deformazio emaitzak lortu ziren (**7.6b irudia**). Halere, CHI30-THC laginaren tentsioarekiko erresistentzia txikitu egin zen eta lagin guztiek

euren hasierako forma errekupezeko gaitasuna galdu zuten. Hau laginetan gertatutako egitura kimikoaren narriadurarekin lotuta zegoela ondorioztatu zen; aipatutako narriadura laginak muturreko hezetasun erlatibodun (% 100 hezetasun erlatibo) ganbera batetan 17 egun gordeta egon ondoren hezetasun asko xurgatzen zutelako gertatzen zen.



7.6 irudia Kontrolatutako ganbera batean (% 100 hezetasun erlatiboan eta giro tenperaturan) a) 6 egunez eta b) 17 egunez gordetako gelatinazko laginen konpresio entsegua, kitina eta THC kantitatearen arabera.

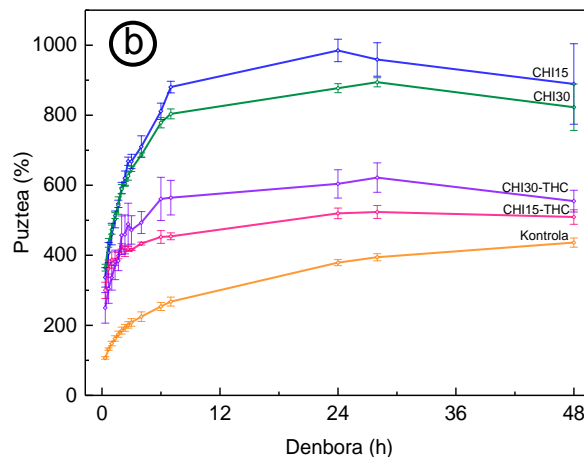
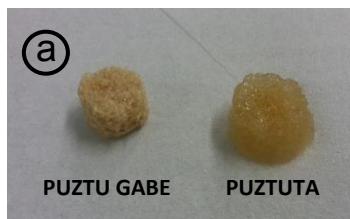
7.2.6 Puzte portaera

Lagin lehor eta puztuen itxura, zehazki CHI30-THC laginen imajina, ikus daiteke

7.7a irudian. Bestalde, **7.7b irudian** kitinadun laginek, CHI15 eta CHI30 laginek, puzte azkarra erakutsi zuten. Ziurrenik puzte azkar hau elikagai-simulatzailan presente zeuden etanol eta ur molekulen, eta formulazioan erabilitako polimero (gelatina eta kitina) eta gehigarrien (THC, azido zitrikoa eta glizerola) artean sortutako hidrogeno zubizko lotura berriengatik gertatu zen, horrela kateen mugikortasuna areagotu eta puzte abiadura azkartzen baitzen (Madera-Santana et al., 2014).

Lortutako emaitzen konparaketa eginik, ezberdintasun nabarmenak antzeman zitezkeen. Baliorik baxuenak kontrol laginei egokitu zitzaizkien, zeinek bigarren egunean % 440ko puztea zuten. Beraz, FTIR analisisian erakutsi bezala, kontrol laginek saretze

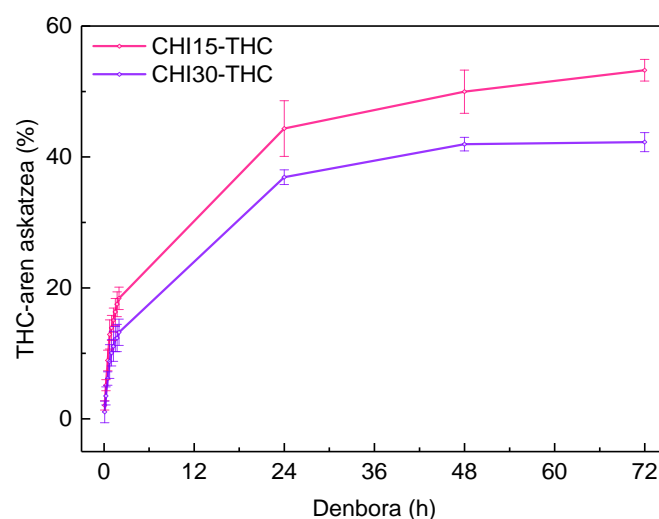
hedadura handiena zutela ondorioztatu zen. Bestalde, puzte balio altuenak, % 985 eta % 894, CHI15 eta CHI30 laginetan lortu ziren, hurrenez hurren. Lagin hauetako tamaina handiagoko poroek ur eta etanol molekulen sarrera errazten zuten eta beraz, puzte gaitasuna handitzen zen. THC-dun laginek berriz, balio maximo baxuagoak azaldu zituzten, % 524 CHI15-THC laginean eta % 622 CHI30-THC kasuan, seguruenik jarraian azaltzen den THC-aren askapenagatik.



7.7 irudia Puztu gabeko eta puztutako CHI30-THC laginen itxura (a) eta gelatinazko laginen puzte portaera kitina eta THC kantitatearen arabera (b).

7.2.7 THC-aren askatzea

THC-aren askatzea analizatu zen eta emaitzak **7.8 irudian** azaltzen dira. Hasieran, THC azkar askatu zen eta egun batean THC-aren % 44 eta % 37a askatua zegoen CHI15-THC eta CHI30-THC laginetatik, hurrenez hurren. CHI30-THC laginetan zegoen eragozpen esteriko handia lagin hauetan THC askapen baxuagoa izatearen arrazoia izan zitekeen (Kamalipour et al., 2016). Lehen egunaren ondoren, THC askatze abiadura mantsoagoa zen, hirugarren egunean lautada batetara iritsiz % 53 balioarekin CHI15-THC laginean eta % 42rekin CHI30-THC kasuan. Portaera honek FTIR analisisan erakutsitako THC-aren eta formulazioko konposatuen talde polarren arteko interakzioak zeudela baieztatzen zuen. Beraz, formulazioetan gehitutako THC guztia ez zen askatu, baina gelatinako laginen egitura eta osotasuna mantentzeko balioko zuen.



7.8 irudia CHI15-THC eta CHI30-THC laginetatik THC-aren askatzea denboran zehar.

7.3 Ondorioak

Material porotsuak, batezbesteko 200 μm -ko poro tamainekin, bioaktiboaren askapen eta hezetasunaren absortziorako prestatu ziren. Kitina, metodo jasangarri bat erabiliz erauzia, eta THC gehitzeak formulazioko konposatuaren artean hidrogeno zubizko loturak sortzea zekarren. Halere, kitina gehien zuten laginetan eragozpen esterikoek interakzio hauek gutxitzen zituzten. Gainera, erabilitako gehigarriekin azido zitrikoaren talde karboxilikoaren eta gelatinaren amino taldeen arteko erreakzioa oztopatzen zen. Honek kitina eta THC-dun laginen putze portaeran eragiten zuen, zeinek kontrol laginek baino putze balio handiagoak erakusten zituzten. Hezetasun absortzioa nabarmen handitu zen denboran zehar eta hezetasun edukiera balioak 1,65-1,87 g ur/g lagin inguruan zeuden. Hezetasun absortzioaz gain, THC-dun kitinaz sendotutako gelatinazko laginak konposatu bioaktiboaren askapen jarraitu bat erakutsi zuten.

8 Ondorio orokorrak

Doktorego-tesi honen ondorio orokorrak jarraian deskribatutakoak dira:

- ◆ Azido zitrikoa gehitua zuten arrain-gelatinan oinarritutako soluzioak arrakastaz elektroharikatu ziren, eta prozesatze ondoren 80 °C-ra eginiko tratamendu termikoak sareen egonkortasun morfologikoa hobetzen zuen.
- ◆ Elektroharikatze soluzioen pH-ak eragin handia zuen soluzio berauen portaera biskoelastikoan, zuntzen morfologiaren egonkortasunean eta sarete hedaduran.
- ◆ pH basikoak gelatina eta azido zitrikoaren arteko erreakzioa faboratzen zuen, erreakzio honi esker filmetan propietate mekanikoak hobetuz.
- ◆ Gelatinazko filmen ingurumen azterketan karbono aztarnaren analisiak ezagutarazi zuen konpost-egitea filmen erabilera ondorenerako hondakinen lanketa onuragarria zela.
- ◆ Arrain-gelatina/kitosano konposite filmetan *E. coli*-ren hazkuntza murriztu zen, azido zitriko eta kitosanoak efektu bateratuan mikrobioen aurkako konposatu natural gisa joka zezaketela azalduz.
- ◆ Ingurumenarekiko lagunkoia den prozesu sinple bat erabiliz aza moretik antozianinak erauzi ahal izan ziren; antozianina hauek pH-arekiko sentikorrek ziren, pH-aren funtzioan ontziratze adimendunetarako egokia izan zitekeen kolore aldaketa gertatuz.
- ◆ Arrain-gelatinan oinarritutako filmetan txertatutako antozianinek konpresio bidezko moldaketa erabili ondoren ere euren aktibitate antioxidatzailea mantentzen zuten.
- ◆ Liofilizatutako laginek egitura porotsuak, hezetasunaren absortzio gradualak eta THC-ren askatzea erakutsi zuten, bioaktiboaren eramaile eta hezetasun xurgatzaile egokiak kontsideratuz.

9 Erreferentziak

- Abad-García B., Berrueta L.A., Garmón-Lobato S., Gallo B., Vicente F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5398-5415.
- Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.
- Aceituno-Medina M., Mendoza S., Lagaron J.M., López-Rubio A. (2015). Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate - Pullulan electrospun fibers. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 970-975.
- Acosta S., Jiménez A., Cháfer M., González-Martínez C., Chiralt A. (2015). Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 49, 135-143.
- Adilah A.N., Jamilah B., Noranizan M.A., Hanani Z.A.N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1-7.
- Aduba J, Hammer J.A., Yuan Q., Yeudall W.A., Bowlin G.L., Yang H. (2013). Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6576-6584.
- Ahmadiani N., Robbins R.J., Collins T.M., Giusti M.M. (2016). Molar absorptivity (ϵ) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage. *Food Chemistry*, 197, 900-906.

Alfaro A.T., Balbinot E., Weber C.I., Tonial I.B., Machado-Lunkes A. (2015). Fish Gelatin: Characteristics, functional properties, applications and future potentials. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 33-44.

Ali A.M.M., Kishimura H., Benjakul S. (2018). Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of Golden carp (*Probarbus Jullieni*) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 82, 164-172.

Almeida E.V.R., Frollini E., Castellan A., Coma, V. (2010). Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 655-664.

Altan A., Aytac Z., Uyar T. (2018). Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 81, 48-59.

Álvarez-Castillo E., Del Toro A., Aguilar J.M., Guerrero A., Bengoechea, C. (2018). Optimization of a thermal process for the production of superabsorbent materials based on a soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 125, 573-581.

Angarano M, Schulz S., Fabritius M., Vogt R., Steinberg T., Tomakidi P., Friedrich C., Mülhaupt R. (2013). Layered gradient nonwovens of in situ crosslinked electrospun collagenous nanofibers used as modular scaffold systems for soft tissue regeneration. *Advanced Functional Materials*, 23(26), 3277-3285.

Arrieta M.P., Peltzer M.A., Garrigós M.C., Jiménez A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486-494.

Arya S.K., Manohar M., Singh G., Siddiqui W.A. (2017). Chitin and chitosan-complexes and their applications. In: Ahmed S., & Ikram S. (eds.). *Chitosan: Derivatives, composites and applications*. Wiley, AEB, pp. 151-165.

ASTM D523-14. (2014). Standard test method for specular gloss. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Filadelfia.

ASTM D638-03. (2003). Standard test method for tensile properties of plastics. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Filadelfia.

ASTM E96-00. (2000). Standard test methods for water vapour transmission of material. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Filadelfia.

Aytac Z., Ipek S., Durgun E., Tekinay T., Uyar T. (2017). Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. *Food Chemistry*, 233, 117-124.

Azeredo H.M.C., & Waldron K.W. (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 109-122.

Azeredo H.M.C., Morrugares-Carmona R., Wellner N., Cross K., Bajka B., Waldron K.W. (2016). Development of pectin films with pomegranate juice and citric acid. *Food Chemistry*, 198, 101-106.

Azevedo V.M., Dias M.V., Borges S.V., Costa A.L.R., Silva E.K., Medeiros E.A.A., Soares N.F.F. (2015b). Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 179-188.

Azevedo V.M., Silva E.K., Pereira C.F.G., da Costa J.M.G., Borges S.V. (2015a). Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. *Food Hydrocolloids*, 43, 252-258.

Balakrishnan P., Geethamma V.G., Sreekala M.S., Thomas S. (2018). Polymeric biomaterials: State-of-the-art and new challenges. In: Thomas S., Balakrishnan P.,

Sreekala M.S. (eds.). *Fundamental biomaterials: Polymers*. Woodhead Publishing, Ingalaterra, pp. 1-20.

Balcão V.M., & Vila M.M.D.C. (2015). Structural and functional stabilization of protein entities: *State-of-the-art*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93, 25-41.

Baniasadi H., Ramazani S.A.A., Mashayekhan S. (2015). Fabrication and characterization of conductive chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 360-366.

Bano I., Arshad M., Yasin T., Ghauri M.A., Younus M. (2017). Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 380-383.

Barbosa M., & Martins M.C.L. (2018). *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*. Woodhead Publishing, Ingalaterra.

Basiak E., Lenart A., Debeaufort F. (2018). How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, 10(4), 412-429.

Batista R.A., Espitia P.J.P., Quintans J.S.S., Freitas M.M., Cerqueira M.Â., Teixeira J.A., Cardoso J.C. (2019). Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems. *Carbohydrate Polymers*, 205, 106-116.

Benbettaieb N., Chambin O., Assifaoui A., Al-Assaf S., Karbowski T., Debeaufort F. (2016). Release of coumarin incorporated into chitosan-gelatin irradiated films. *Food Hydrocolloids*, 56, 266-276.

BenBettaieb N., Karbowski T., Bornaz S., Debeaufort F. (2015). Spectroscopic analyses of the influence of electron beam irradiation doses on mechanical, transport properties and microstructure of chitosan-fish gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 46, 37-51.

Benbettaïeb N., Karbowski T., Brachais C.H., Debeaufort F. (2015). Coupling tyrosol, quercetin or ferulic acid and electron beam irradiation to cross-link chitosan-gelatin films: A structure-function approach. *European Polymer Journal*, 67, 113-127.

Benbettaïeb N., Tanner C., Cayot P., Karbowski T., Debeaufort F. (2018). Impact of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings. *Food Chemistry*, 242, 369-377.

Berkowitz S.A., & Houde D.J. (2015). The complexity of protein structure and the challenges it poses in developing biopharmaceuticals. In: Houde D.J., & Berkowitz S.A. (eds.). *Biophysical characterisation of proteins in developing biopharmaceuticals* (1st edition). Elsevier, Herbehereak, pp. 1-21.

Bermúdez-Oria A., Rodríguez-Gutiérrez G., Vioque B., Rubio-Senent F., Fernández-Bolaños J. (2017). Physical and functional properties of pectin-fish gelatin films containing the olive phenols hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol. *Carbohydrate Polymers*, 178, 368-377.

Bharathidasan T., Narayanan T.N., Sathyanaryanan S., Sreejakumari S.S. (2015). Above 170° water contact angle and oleophobicity of fluorinated graphene oxide based transparent polymeric films. *Carbon*, 84, 207-213.

Bhattacharyya I., Molaro M.C., Braatz R.D., Rutledge G.C. (2016). Free surface electrospinning of aqueous polymer solutions from a wire electrode. *Chemical Engineering Journal*, 289, 203-211.

Bhushani J.A., & Anandharamakrishnan C. (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology*, 38(1), 21-33.

Bitencourt C.M., Fávaro-Trindade C.S., Sobral P.J.A., Cavalho R.A. (2014). Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids*, 40, 145-152.

Bonilla J., & Sobral P.J.A. (2016). Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*, 16, 17-25.

Bovi G.G., Caleb O.J., Klaus E., Tintchev F., Rauh C., Mahajan, P.V. (2018). Moisture absorption kinetics of FruitPad for packaging of fresh strawberry. *Journal of Food Engineering*, 223, 248-254.

Bracaglia L.G., Smith B.T., Watson E., Arumugasaamy N., Mikos A.G., Fisher J.P. (2017). 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 56, 3-13.

Byler D.M., & Susi H. (1986). Examination of the secondary structure 457 of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25(3), 469-487.

Byun Y., Kim Y.T., Whiteside S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 239-244.

Castelló M.L., Dweck J., Aranda D.A.G. (2009). Thermal stability and water content determination of glycerol by thermogravimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 97, 627-630.

Castillo L.A., Farenzena S., Pintos E., Rodríguez M.S., Villar M.A., García M.A., López O.V. (2017). Active films based on thermoplastic corn starch and chitosan oligomer for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 14, 128-136.

Centella M.H., Arévalo-Gallegos A., Parra-Saldivar R., Iqbal H.M.N. (2017). Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio- and non-bio sectors. *Journal of Cleaner Production*, 168, 1559-1565.

Cerqueira M.A.P.R., Pereira R.N.C., Ramos O.L.S., Teixeira J.A.C., Vicente A.A. (2016). *Edible food packaging: Materials and processing technologies*. CRC Press, AEB.

Chen J., Li L., Yi R., Xu N., Gao R., Hong B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*, 66, 453-459.

Chen M., Liu F., Chiou B.S., Sharif H.R., Xu J., Zhong F. (2017). Characterization of film-forming solutions and films incorporating free and nanoencapsulated tea polyphenol prepared by gelatins with different Bloom values. *Food Hydrocolloids*, 72, 381-388.

Chen X., Chew S.L., Kerton F.M., Yan N. (2014). Direct conversion of chitin into a N-containing furan derivative. *Green Chemistry*, 16(4), 2204-2212.

Chen X., Lee D.S., Zhu X., Yam K.L. (2012). Release kinetics of tocopherol and quercetin from binary antioxidant controlled-release packaging films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3492-3497.

Chin S.S., Lyn F.H., Hanani Z.A.N. (2017). Effect of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis Miller*) gel on the physical and functional properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 128-134.

Chiralt A., González-Martínez C., Vargas M., Atarés L. (2018). Edible films and coatings from proteins. In: Yada R.Y. (ed.). *Proteins in food processing* (2nd edition). Woodhead Publishing, Ingalaterra, pp. 477-500.

Choppali U, & Gorman B.P. (2008). Structural and optical properties of nanocrystalline ZnO thin films synthesized by the citrate precursor route. *Journal of Luminescence*, 128(10), 1641-1648.

Ciannamea E.M., Stefani P.M., Ruseckaite R.A. (2016). Properties and antioxidant activity of soy protein concentrate films incorporated with red grape extract processed by casting and compression molding. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 353-362.

Clarke D., Tyuftin A.A., Cruz-Romero M.C., Bolton D., Fanning S., Pankaj S.K., Bueno-Ferrer C., Cullen P.J., Kerry J.P. (2017). Surface attachment of active antimicrobial coatings onto conventional plastic-based laminates and performance assessment of these materials on the storage life of vacuum packaged beef sub-primals. *Food Microbiology*, 62, 196-201.

Corazzari I., Nisticò R., Turci F., Faga M.G., Franzoso F., Tabasso S., Magnacca G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9.

Córdoba L.J.P., & Sobral P.J.A. (2017). Physical and antioxidant properties of films based on gelatin, gelatin-chitosan or gelatin-sodium caseinate blends loaded with nanoemulsified active compounds. *Journal of Food Engineering*, 213, 47-53.

Cortez R., Luna-Vital D.A., Margulis D., de Mejia E.G. (2017). Natural pigments: Stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198.

Costa F., Silva R., Boccaccini A. (2018). Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. In: Barbosa M.A., & Martins M.C.L. (eds.). *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*. Woodhead publishing, Inglaterra, pp. 175-204.

Cui Z., Beach E.S., Anastas P.T. (2011). Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 4(1), 35-40.

Cumming M.H., Leonard A.R., Le Corre-Bordes D.S., Hofman K. (2018). Intra-fibrillar citric acid crosslinking of marine collagen electrospun nanofibres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 874-881.

Cuong H.N., Minh N.C., Hoa N.V., Trung T.S. (2016). Preparation and characterization of high purity β -chitin from squid pens (*Loligo chensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 442-447.

Czerner M., Fasce L.A., Martucci J.F., Ruseckaite R., Frontini P.M. (2016). Deformation and fracture behavior of physical gelatin gel systems. *Food Hydrocolloids*, 60, 299-307.

da Silva F.T., da Cunha K.F., Fonseca L.M., Antunes M.D., El Halal S.L.M., Fiorentin Â.M., Zavareze E.R., Dias A.R.G. (2018). Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control *in situ*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 107-115.

de la Caba K., Guerrero P., Trung T.S., Cruz-Romero M., Kerry J.P., Fluhr J., Maurer M., Kruijssen F., Albalat A., Bunting S., Burt S., Little D., Newton R. (2019). From seafood waste to active seafood packaging: An emerging opportunity of the circular economy. *Journal of Cleaner Production*, 208, 86-98.

de Moraes J.O., Scheibe A.S., Augusto B., Carciofi M., Laurindo J.B. (2015). Conductive drying of starch-fiber films prepared by tape casting: Drying rates and film properties. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 356-366.

de Moura S.C.S.R., Berling C.L., Germer S.P.M., Alvim I.D., Hubinger M.D. (2018). Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241, 317-327.

Demirbas A. (2016). Red cabbage extract as a natural antioxidant with application to packaged fresh tilapia and enhancement of silver and iron nanoparticles. *Doktorego tesia, Floridako Unibertsitatea*.

Deng L., Kang X., Liu Y., Feng F., Zhang H. (2017). Effects of surfactants on the formation of gelatin nanofibres for controlled release of curcumin. *Food Chemistry*, 231, 70-77.

Deng L., Zhang X., Li Y., Que F., Kang X., Liu Y., Feng F., Zhang H. (2018). Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 75, 72-80.

Deng Y., & Kuiper J. (2017). *Functional 3D tissue engineering scaffolds: Materials, technologies, and applications*. Woodhead Publishing, Ingalaterra.

Denghani S., Hosseini S.V., Regenstein J.M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505-513.

Djabourov M., Leblond J., Papon P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal de Physique*, 49, 319-332.

Dolci L.S., Liguori A., Panzavolta S., Miserocchi A., Passerini N., Gherardi M., Colombo V., Bigi A., Albertini B. (2018). Non-equilibrium atmospheric pressure plasma as innovative method to crosslink and enhance mucoadhesion of econazole-loaded gelatin films for buccal drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 73-82.

Domon B., & Costello C.E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4), 397-409.

Drosou C., Krokida M., Biliaderis C.G. (2018). Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. *Food Hydrocolloids*, 77, 726-735.

Duan B., Hockaday L.A., Kang K.H., Butcher J.T. (2013). 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101(5), 1255-1264.

Duconseille A., Wien F., Audonnet F., Traore A., Refregiers M., Astruc T., Santé-Lhoutellier V. (2017). The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. *Food Hydrocolloids*, 66, 378-388.

Ebnesajjad S. (2012). *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: Properties, processing and applications*. William Andrew, AEB.

Erencia M., Cano F., Tornero J.A., Fernandes M.M., Tzanov T., Macanás J., Carrillo F. (2015). Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(25), 42115-42125.

Esquerdo V.M., Monte M.L., Pinto L.A.A. (2019). Microstructures containing nanocapsules of unsaturated fatty acids with biopolymers: Characterization and thermodynamic properties. *Journal of Food Engineering*, 248, 28-35.

Etxabide A., Coma V., Guerrero P., Gardrat C., de la Caba K. (2017b). Effect of cross-linking in surface properties and antioxidant activity of gelatin films incorporated with a curcumin derivative. *Food Hydrocolloids*, 66, 168-175.

Etxabide A., Leceta I., Cabezudo S., Guerrero P., de la Caba K. (2016b). Sustainable fish gelatin films: From food processing waste to compost. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(9), 4626-4634.

Etxabide A., Ribeiro R.D.C., Guerrero P., Ferreira A.M., Stafford G.P., Dalgarno K., de la Caba K., Gentile P. (2018). Lactose-crosslinked fish gelatin-based porous scaffolds embedded with tetrahydrocurcumin for cartilage regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 199-208.

Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. (2015). Improvement of barrier properties of fish gelatins promoted by gelatin glycation with lactose at high temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 315-321.

Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. (2017a). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 192-198.

Etxabide A., Urdanpilleta M., de la Caba K., Guerrero P. (2016a). Control of cross-linking reaction to tailor the properties of thin films based on gelatin. *Materials Letters*, 185, 366-369.

Etxabide A., Vairo C., Santos-Vizcaino E., Guerrero P., Pedraz J.L., Igartua M., de la Caba K., Hernandez R.M. (2017c). Ultra thin hydro-films based on lactose-crosslinked fish gelatin for wound healing applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1-2), 455-467.

European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, 12, 1-89.

Fabra M.J., López-Rubio A., Lagaron J.M. (2016). Use of the electrohydrodynamic process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 55, 11-18.

Farjami T., Madadlou A., Labbafi M. (2015). Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. *Food Hydrocolloids*, 50, 159-165.

Feng X., Bansal N., Yang H. (2016). Fish gelatin combined with chitosan coating inhibits myofibril degradation of golden pomfret (*Trachinotus blochii*) fillet during cold storage. *Food Chemistry*, 200, 283-292.

Feng X., Ng V.K., Mikš-Krajnik M., Yang H. (2017). Effects of fish gelatin and tea polyphenol coating on the spoilage and degradation of myofibril in fish fillet during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 89-102.

Ferraro V., Gaillard-Martinie B., Sayd T., Chambon C., Anton M., Santé-Lhoutellier V. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 55-66.

Firouzabadi F.B., Noori M., Edalatpanah Y., Mirhosseini M. (2014). ZnO nanoparticle suspensions containing citric acid as antimicrobial to control *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in mango juice. *Food Control*, 42, 310-314.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). The state of world fisheries and aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. Erroma.

Francisco C.R.L., Heleno S.A., Fernandes I.P.M., Barreira J.C.M., Calheta R.C., Barros L., Gonçalves O.H., Ferreira I.C.F.R., Barreiro M.F. (2018). Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry*, 245, 845-853.

Ganesan P. (2017). Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications. *Wound Medicine*, 18, 33-40.

Gaona-Forero A., Agudelo-Rodríguez G., Herrera A.O., Castellanos D.A. (2018). Modeling and simulation of an active packaging system with moisture adsorption for fresh produce. Application in 'Hass' avocado. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 187-195.

García-Moreno P.J., Stephansen K., van der Kruijs J., Guadix A., Guadix E.M., Chronakis I.S., Jacobsen C. (2016). Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability. *Journal of Food Engineering*, 183, 39-49.

Garrido T., Etxabide A., de la Caba K., Guerrero P. (2017). Versatile soy protein films and hydrogels by the incorporation of β -chitin from squid pens (*Loligo* sp.). *Green Chemistry*, 19(24), 5923-5931.

Garrido T., Etxabide A., Guerrero P., de la Caba K. (2016b). Characterization of agar/soy protein biocomposite films: Effect of agar on the extruded pellets and compression moulded films. *Carbohydrate Polymers*, 151, 408-416.

Garrido T., Leceta I., Cabezudo S., Guerrero P., de la Caba K. (2016a). Tailoring soy protein film properties by selecting casting or compression as processing methods. *European Polymer Journal*, 85, 499-507.

Giofrè M., Torricelli P., Panzavolta S., Rubini K., Bigi A. (2012). Role of pH on stability and mechanical properties of gelatin films. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 27(1), 67-77.

Gómez-Estaca J., Gavara R., Hernández-Muñoz P. (2015). Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 302-307.

Gómez-Estaca J., Gómez-Guillén M.C., Fernández-Martín F., Montero P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1461-1469.

Gómez-Estaca J., López-de-Dicastillo C., Hernández-Muñoz P., Catalá R., Gavara R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.

Gómez-Guillén M.C., Giménez B., Lopez-Caballero M.E., Montero M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.

Gómez-Guillén M.C., Pérez-Mateos M., Gómez-Estaca J., López-Caballero E., Giménez B., Montero P. (2009). Fish gelatin: A renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 20(1), 3-16.

Gómez-Siurana A., Marcilla A., Beltrán M., Berenguer D., Martínez-Castellanos I., Menargues S. (2013). TGA/FTIR study of tobacco and glycerol-tobacco mixtures. *Thermochimica Acta*, 573, 146-157.

Gordon P.W., Brooker A.D.M., Chew Y.M.J., Wilson D.I., York D.W. (2010). Studies into the swelling of gelatine films using a scanning fluid dynamic gauge. *Food and Bioproducts Processing*, 88(4), 357-364.

Grover C.N., Cameron R.E., Best S.M. (2012). Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10, 62-74.

Grumezescu A.M., & Holban A.M. (2017). *Food packaging and preservation*. Academic Press, Ingalaterra.

Gualandi C., Torricelli P., Panzavolta S., Pagani S., Focarete M.L., Bigi A. (2016). An innovative co-axial system to electrospin *in situ* crosslinked gelatin nanofibers. *Biomedical Materials*, 11(2), 025007-025018.

Gudipati V. (2013). Fish gelatin: A versatile ingredient for the food and pharmaceutical industries. In: Kim S.K. (ed.). *Marine proteins and peptides: Biological activities and applications*. John Wiley & Sons, Ingalaterra, pp. 271-295.

Guerrero P., & de la Caba K. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 261-269.

Guerrero P., Arana P., O'Grady M.N., Kerry J.P., de la Caba K. (2015). Valorization of industrial by-products: Development of active coatings to reduce food losses. *Journal of Cleaner Production*, 100, 179-184.

Guerrero P., Beatty E., Kerry J.P., de la Caba K. (2012). Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 53-59.

Guerrero P., Kerry J.P., de la Caba K. (2014). FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111, 598-605.

Guerrero P., Stefani P.M., Ruseckaite R.A., de la Caba K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 65-72.

Gutiérrez T.J., Toro-Márquez L.A., Merino D., Mendieta J.R. (2019). Hydrogen-bonding interactions and compostability of bionanocomposite films prepared from corn starch and nano-fillers with and without added Jamaica flower extract. *Food Hydrocolloids*, 89, 283-293.

Hamed I., Özogul F., Regenstein J.M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.

Hamann F., & Schmid M. (2014). Determination and quantification of molecular interactions in protein films: A review. *Materials*, 7(12), 7975-7996.

Han Y., Yu M., Wang L. (2018). Preparation and characterization of antioxidant soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. *Food Hydrocolloids*, 75, 13-21.

Hashim P., Ridzwan M.S.M., Bakar J., Hashim D.M. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1-8.

Hassan B., Chatha S.A.S., Hussain A.I., Zia K.M., Akhtar N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095-1107.

Hattrem M.N., Molnes S., Haug I.J., Draget K.I. (2015). Interfacial and rheological properties of gelatin based solid emulsions prepared with acid or alkali pretreated gelatins. *Food Hydrocolloids*, 43, 700-707.

Hazarika D., & Karak N. (2015). Waterborne sustainable tough hyperbranched aliphatic polyester thermosets. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(10), 2458-2468.

Hervy M., Evangelisti S., Lettieri P., Lee K.Y. (2015). Life cycle assessment of nanocellulose-reinforced advanced fibre composites. *Composites Science and Technology*, 118, 154-162.

Higuchi T., Miki T., Shah A.C., Herd A.K (1963). Facilitated reversible formation of amides from carboxylic acids in aqueous solutions. Intermediate production of acid anhydride. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3655-3660.

Horn J., Schanda J., Friess W. (2018). Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 342-354.

Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M., Farahmandghavi F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403-413.

Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M., Farahmandghavi F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 194, 1266-1274.

Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M., Ghavi F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490-1495.

Hou Y., Shavandi A., Carne A., Bekhit A.A., Ng T.B., Cheung R.C.F., Bekhit A.E.A. (2016). Marine shells: Potential opportunities for extraction of functional and health-promoting materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(11-12), 1047-1116.

Huang T., Tu Z., Wang H., Shanguan X., Zhang L., Zhang N., Bansal N. (2017). Pectin and enzyme complex modified fish scales gelatin: Rheological behavior, gel properties and nanostructure. *Carbohydrate Polymers*, 156, 294-302.

Iahnke A.O.S., Costa T.M.H., Rios A.O., Flôres S.H. (2015). Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. *Industrial Crops and Products*, 76, 1071-1078.

Isik B.S., Altay F., Capanoglu E. (2018). The uniaxial and coaxial encapsulations of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate by electrospinning and their *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry*, 265, 260-273.

ISO 14040 (2006). Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principals and Framework.

Jadhav J.P., & Phugare S.S. (2012). Textile dyes: General information and environmental aspects. In: El Nemr A. (ed.). *Non-conventional textile waste water treatment*. Nova Science Publisher, Inc., New York, AEB, pp. 1-29.

Jalaja K., Naskar D., Kundu S.C., James N.R. (2016). Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1098-1107.

Jalali A., Rux G., Linke M., Geyer M., Pant A., Saengerlaub S., Mahajan P. (2019). Application of humidity absorbing trays to fresh produce packaging: Mathematical modeling and experimental validation. *Journal of Food Engineering*, 244, 115-125.

Jiang Q., Reddy N., Yang Y. (2010). Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 4042-4051.

Jiang Q., Reddy N., Zhang S., Roscioli N., Yang Y. (2013). Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system. *Journal of Biomedical Materials Research*, 101(5), 1237-1247.

Jiang Q., Xu H., Cai S., Yang Y. (2014). Ultrafine fibrous gelatin scaffolds with deep cell infiltration mimicking 3D ECMs for soft tissue repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(7), 1789-1800.

Jiang T., Carbone E.J., Lo K.W.H., Laurencin C.T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1-24.

Jridi M., Mora L., Souissi N., Aristoy M.C., Nasri M., Toldrá F. (2018). Effects of active gelatin coated with henna (*L. inermis*) extract on beef meat quality during chilled storage. *Food Control*, 84, 238-245.

Kadam S.U., Pankaj S.K., Tiwari B.K., Cullen P.J., O'Donnell C.P. (2015). Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 68-74.

Kaewprachu P., Osako K., Benjakul S., Suthiluk P., Rawdkuen S. (2017). Shelf life extension for Bluefin tuna slices (*Thunnus thynnus*) wrapped with myofibrillar protein film incorporated with catechin-Kradon extract. *Food Control*, 79, 333-343.

Kaewprachu P., Osako K., Rungraeng N., Rawdkuen S. (2018). Characterization of fish myofibrillar protein film incorporated with catechin-Kradon extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1463-1473.

Kafle G.K., Kim S.H., Sung, K.I. (2013). Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics. *Bioresource Technology*, 127, 326-336.

Kakaei S., & Shahbazi Y. (2016). Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 432-438.

Kamalipour J., Masoomi M., Khonakdar H.A., Razavi S.M.R. (2016). Preparation and release study of Triclosan in polyethylene/Triclosan anti-bacterial blend. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 891-898.

Karbowiak T., Debeaufort F., Voilley A. (2006). Importance of surface tension characterization for food, pharmaceutical and packaging products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 391-407.

Kchaou H., Jridi M., Abdelhedi O., Nasreddine B., Karbowiak T., Nasri M., Debeaufort, F. (2017). Development and characterization of cuttlefish (*Sepia officinalis*) skin gelatin-protein isolate blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1491-1500.

Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779-1361799.

Khor E. (1997). Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*, 18(2), 95-105.

Kim H., Beak S.E., Song K.B. (2018). Development of a hagfish skin gelatin film containing cinnamon bark essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 96, 583-588.

Kim S.A., & Rhee M.S. (2015). Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiology*, 49, 166-172.

Kim S.H., Joo M.H., Yoo S.H. (2009). Structural identification and antioxidant properties of major anthocyanin extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) fruit. *Journal of Food Science*, 74(2), 134-140.

Kokoszka S., Debeaufort F., Lenart A., Voilley A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53-60.

Kowalczyk D. (2016). Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 52, 543-553.

Kowalczyk D., & Biendl M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 60, 384-392.

Lacroix M., & Vu K.D. (2014). Edible coating and film materials: Proteins. In: Han J.H. (ed.). *Innovations in food packaging* (2nd edition). Academic Press, Ingalaterra, pp. 277-304.

Lagaron J.M., Fernandez-Saiz P., Ocio M.J. (2007). Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2554-2562.

Lau H.H., Murney R., Yakovlev N.L., Novoselova M.V., Lim S.H., Roy N., Singh H., Sukhorukov G.B., Haigh B., Kiryukhin M.V. (2017). Protein-tannic acid multilayer films:

A multifunctional material for microencapsulation of food-derived bioactives. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 332-340.

Leceta I., Guerrero P., Ibarburu I., Dueñas M.T., de la Caba K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116(4), 889-899.

Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

Lee K.Y., Lee J.H., Yang H.J., Song K.B. (2016). Production and characterisation of skate skin gelatin films incorporated with thyme essential oil and their application in chicken tenderloin packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1465-1472.

Li M., Mondrinos M.J., Gandhi M.R., Ko F.K., Weiss A.S., Lelkes P.I. (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5999-6008.

Li M., Ngadi M.O., Ma Y. (2014). Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*, 165, 29-34.

Liang C., Jia M., Tian D., Tang Y., Ju W., Ding S., Tian L., Ren X., Wang X. (2017). Edible sturgeon skin gelatine films: Tensile strength and UV light-barrier as enhanced by blending with esculine. *Journal of Functional Foods*, 37, 219-228.

Liguori A., Bigi A., Colombo V., Focarete M.L., Gherardi M., Gualandi C., Oleari M.C., Panzavolta S. (2016). Atmospheric pressure non-equilibrium plasma as a green tool to crosslink gelatin nanofibers. *Scientific Reports*, 6, 38542.

Lille M., Nurmela A., Nordlund E., Metsä-Kortelainen S., Sozer N. (2018). Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *Journal of Food Engineering*, 220, 20-27.

Lin J., & Zhou W. (2018). Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread. *Journal of Functional Foods*, 40, 299-306.

Lin L., Regenstein J.M., Lv S., Lu J., Jiang S. (2017). An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 102-112.

Lin Y.M., Nierop K.G.J., Girbal-Neuhauser E., Adriaanse M., van Loosdrecht M.C.M. (2015). Sustainable polysaccharide-based biomaterial recovered from waste aerobic granular sludge as a surface coating material. *Sustainable Materials and Technologies*, 4, 24-29.

Liu W., Zhang Z., Lin G., Luo D., Chen H., Yang H., Liang J., Liu Y., Xie J., Su Z., Cao H. (2017). Tetrahydrocurcumin is more effective than curcumin in inducing the apoptosis of H22 cells *via* regulation of a mitochondrial apoptosis pathway in ascites tumor-bearing mice. *Food & Function*, 8(9), 3120-3129.

Lopes C., Antelo L.T., Franco-Uría A., Alonso A.A., Pérez-Martín R. (2018). Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production*, 172, 4140-4151.

López D., Márquez A., Gutiérrez-Cutiño M., Venegas-Yazigi D., Bustos R., Matiacevich S. (2017). Edible film with antioxidant capacity based on salmon gelatin and boldine. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 160-169.

Luo X., Guo Z., He P., Chen T., Li L., Ding S., Li H. (2018a). Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers

crosslinked by common agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 476-486.

Luo Y., Li Y., Qin X., Wa Q. (2018b). 3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering. *Materials & Design*, 146, 12-19.

Madera-Santana T.J., Freile-Peigrín Y., Azamar-Barrios J.A. (2014). Physicochemical and morphological properties of plasticized poly (vinyl alcohol)-agar biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 176-184.

Mahmood K., Kamilah H., Sudesh K., Karim A.A., Ariffin F. (2019). Study of electrospun fish gelatin nanofilms from benign organic acids as solvents. *Food Packaging and Shelf Life*, 19 66-75.

Mahmoud B.S.M. (2014). The efficacy of grape seed extract, citric acid and lactic acid on the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked oysters. *Food Control*, 41, 13-16.

Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D.H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422-434.

Mano J.F., & Reis R.L. (2007). Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4), 261-273.

Martins J.T., Cerqueira M.A., Vicente A.A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220-227.

Martucci J.F., Gende L.B., Neira L.M., Ruseckaite R.A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205-213.

Matiacevich S., Cofré D.C., Schebor C., Enrione J. (2013). Physicochemical and antimicrobial properties of bovine and salmon gelatin-chitosan films. *CyTA-Journal of Food*, 11(4), 366-378.

Mazza G., & Miniati E. (2018). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC press, AEB.

Mendes A.C., Stephansen K., Chronakis I.S. (2017). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 68, 53-68.

Mirabella N., Castellani V., Sala S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.

Mizgier P., Kucharska A.Z., Sokół-Łętowska A., Kolniak-Ostek J., Kidoń M., Fecka I. (2016). Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *Journal of Functional Foods*, 21, 133-146.

Moaddab M., Nourmohammadi J., Rezayan A.H. (2018). Bioactive composite scaffolds of carboxymethyl chitosan-silk fibroin containing chitosan nanoparticles for sustained release of ascorbic acid. *European Polymer Journal*, 103, 40-50.

Mohajer S., Rezaei M., Hosseini S.F. (2017). Physico-chemical and microstructural properties of fish gelatin/agar bio-based blend films. *Carbohydrate Polymers*, 157, 784-793.

Moheman A., Alam M.S., Mohammad A. (2016). Recent trends in electrospinning of polymer nanofibers and their applications in ultra thin layer chromatography. *Advances in Colloid and Interface Science*, 229, 1-24.

Moomand K., & Lim L.T. (2015). Properties of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres under simulated in vitro conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 431-444.

Moreira J.B., Lim L.T., Zavareze E.R., Dias A.R.G., Costa J.A.V., de Morais M.G. (2018). Microalgae protein heating in acid/basic solution for nanofibers production by free surface electrospinning. *Journal of Food Engineering*, 230, 49-54.

Moreno O., Atarés L., Chiralt A., Cruz-Romero M.C., Kerry J. (2018). Starch-gelatin antimicrobial packaging materials to extend the shelf life of chicken breast fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 483-490.

Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358-1368.

Muyonga J.H., Cole C.G.B., Duodu K.G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86(3), 325-332.

Na K., Shin S., Lee H., Shin D., Baek J., Kwak H., Park M., Shin J., Hyun J. (2018). Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 61, 340-347.

Nagarajan M., Benjakul S., Prodpran T., Songtipya P. (2015). Properties and characteristics of nanocomposite films from tilapia skin gelatin incorporated with ethanolic extract from coconut husk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7669-7682.

Nilsuwan K., Benjakul S., Prodpran T. (2018). Properties and antioxidative activity of fish gelatin-based film incorporated with epigallocatechin gallate. *Food Hydrocolloids*, 80, 212-221.

Offeddu G.S., Ashworth J.C., Cameron R.E., Oyen M.L. (2016). Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 41, 193-203.

Olaimat A.N., Al-Nabulsi A.A., Osaili T.M., Al-Holy M., Ayyash M.M., Mehyar G.F., Jaradat Z.W., Ghoush M.A. (2017). Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids. *Food Control*, 77, 179-186.

Ortiz C.M., de Moraes J.O., Vicente A.R., Laurindo J.B., Mauri A.N. (2017). Scale-up of the production of soy (*Glycine max* L.) protein films using tape casting: Formulation of film-forming suspension and drying conditions. *Food Hydrocolloids*, 66, 110-117.

Ortíz M.A., Vargas M.C.R., Madinaveitia R.G.C., Velázquez J.A.M. (2011). Functional properties of anthocyanins. *BIOTecnia*, 13(2), 16-22.

Oymaci P., & Altinkaya S.A. (2016). Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. *Food Hydrocolloids*, 54, 1-9.

Pallottino F., Hakola L., Costa C., Antonucci F., Figorilli S., Seisto A., Menesatti P. (2016). Printing on food or food printing: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 9(5), 725-733.

Panzavolta S., Giofrè M., Focarete M.L., Gualandi C., Foroni L., Bigi A. (2011). Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1702-1709.

Patel S., Srivastava S., Singh M.R., Singh D. (2018). Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1888-1897.

Pereira V.A., de Arruda I.N.Q., Stefani R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (red cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188.

Perumal R.K., Perumal S., Thangam R., Gopinath A., Ramadass S.K., Madhan B., Sivasubramanian S. (2018). Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1032-1040.

Pezeshki-Modaress M., Rajabi-Zeleti S., Zandi M., Mirzadeh H., Sodeifi N., Nekookar A., Aghdami N. (2014). Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: In vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 102(11), 3908-3917.

Posati T., Giuri D., Nocchetti M., Sagnella A., Gariboldi M., Ferroni C., Sotgiu G., Varchi G., Zamboni R., Aluigi A. (2018). Keratin-hydroxycalcites hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 105, 177-185.

Pourchet L.J., Thepot A., Albouy M., Courtial E.J., Boher A., Blum L.J., Marquette C.A. (2017). Human skin 3D bioprinting using scaffold-free approach. *Advanced Healthcare Materials*, 6(4), 1601101-1601108.

Qiu G., Wang D., Song X., Deng Y., Zhao Y. (2018). Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. *Food Research International*, 105, 121-128.

Qiu L., Zhang M., Tang J., Adhikari B., Cao P. (2019). Innovative technologies for producing and preserving intermediate moisture foods: A review. *Food Research International*, 116, 90-102.

Raja I.S., & Fathima N.N. (2015). A gelatin based antioxidant enriched biomaterial by grafting and saturation: Towards sustained drug delivery from antioxidant matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 537-543.

Ramirez D.O.S., Carletto R.A., Tonetti C., Giachet F.T., Varesano A., Vineis C. (2017). Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 100-106.

Ratanavaraporn J., Rangkupan R., Jeeratawatchai K., Kanokpanont S., Damrongsakkul S. (2010). Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 431-438.

Reddy N., Reddy R., Jiang Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 362-369.

Reddy N., Warner K., Yang Y. (2011). Low-temperature wet-cross-linking of silk with citric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(8), 4458-4463.

Ribeiro V.P., Morais A.S., Maia F.R., Canadas R.F., Costa J.B., Oliveira A.L., Oliveira J.M., Reis R.L. (2018). Combinatory approach for developing silk fibroin scaffolds for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, 72, 167-181.

Rocha M.A.M., Coimbra M.A., Nunes C. (2017). Applications of chitosan and their derivatives in beverages: A critical review. *Current Opinion in Food Science*, 15, 61-69.

Rocha-García D., Guerra-Contreras A., Reyes-Hernández J., Palestino G. (2017). Thermal and kinetic evaluation of biodegradable thermo-sensitive gelatin/poly(ethylene glycol) diamine crosslinked citric acid hydrogels for controlled release of tramadol. *European Polymer Journal*, 89, 42-56.

Rodriguez M.J., Brown J., Giordano J., Lin S.J., Omenetto F.G., Kaplan D.L. (2017). Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with *in vitro* and *in vivo* assessments. *Biomaterials*, 117, 105-115.

Roy B.C., Das C., Hong H., Betti M., Bruce H.L. (2017). Extraction and characterization of gelatin from bovine heart. *Food Bioscience*, 20, 116-124.

Roy S., Gennadios A., Weller C.L., Testin R.F. (2000). Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *Industrial Crops and Products*, 11(1), 43-50.

Rui L., Xie M., Hu B., Zhou L. Yin D., Zeng X. (2017). A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid. *Carbohydrate Polymers*, 173, 473-481.

Ruiz-Ruiz F., Mancera-Andrade E.I., Iqbal H.M.N. (2017). Marine-derived bioactive peptides for biomedical sectors: A review. *Protein & Peptide Letters*, 24(2), 109-117.

Rux G., Mahajan P.V., Geyer M., Linke M., Pant A., Saengerlaub S., Caleb, O.J. (2015). Application of humidity-regulating tray for packaging of mushrooms. *Postharvest Biology and Technology*, 108, 102-110.

Shafagh N., Sabzi M., Afshari M.J. (2018). Development of pH-sensitive and antibacterial gelatin/citric acid/Ag nanocomposite hydrogels with potential for biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, 25, 259-266.

Saito H., Taguchi T., Kobayashi H., Kataoka K., Tanaka J., Murabayashi S., Mitamura Y. (2004). Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. *Materials Science and Engineering: C*, 24(6-8), 781-785.

Saliba S., Ruch P., Volksen W., Magbitang T.P., Dubois G., Michel B. (2016). Combined influence of pore size distribution and surface hydrophilicity on the water adsorption characteristics of micro-and mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 226, 221-228.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, AEB.

Santoro M., Tataru A.M., Mikos A.G. (2014). Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 190, 210-218.

Santos J.P.F., Arjmand M., Melo G.H.F., Chizari K., Bretas R.E.S., Sundararaj U. (2018). Electrical conductivity of electrospun nanofiber mats of polyamide 6/polyaniline coated with nitrogen-doped carbon nanotubes. *Materials & Design*, 141, 333-341.

Sayari N., Sila A., Abdelmalek B.E., Abdallah R.B., Ellouz-Chaabouni S., Bougatef A., Balti R. (2016). Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 163-171.

Sha X.M., Tu Z.C., Liu W., Wang H., Shi Y., Huang T., Man Z.Z. (2014). Effect of ammonium sulfate fractional precipitation on gel strength and characteristics of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scale. *Food Hydrocolloids*, 36, 173-180.

Shahbazarab Z., Teimouri A., Chermahini A.N., Azadi M. (2017). Fabrication and characterization of nanobiocomposite scaffold of zein/chitosan/nanohydroxyapatite prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1017-1027.

Shankar S., Jaiswal L., Rhim J.W. (2016). Gelatin-based nanocomposite films: Potential use in antimicrobial active packaging. In: Barros-Velázquez J. (ed.). *Antimicrobial food packaging*. Academic press, Inglaterra, pp. 339-348.

Shi R., Bi J., Zhang Z., Zhu A., Chen D., Zhou X., Zhang L., Tian W. (2008). The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 763-770.

Singh H., Ye A., Horne D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92-100.

Sinthusamran S., Benjakul S., Kishimura H. (2014). Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry*, 152, 276-284.

Siqueira N.M., Paiva B., Camassola M., Rosenthal-Kim E.Q., Garcia K.C., dos Santos F.P., Soares R.M.D. (2015). Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 133, 8-18.

Soares N.M., Fernandes T.A., Vicente A.A. (2016). Effect of variables on the thickness of an edible coating applied on frozen fish - Establishment of the concept of safe dipping time. *Journal of Food Engineering*, 171, 111-118.

Songtipya L., Thies M.C., Sane A. (2016). Effect of rapid expansion of subcritical solutions processing conditions on loading capacity of tetrahydrocurcumin encapsulated in poly(L-lactide) particles. *The Journal of Supercritical Fluids*, 113, 119-127.

Sow L.C., & Yang H. (2015). Effects of salt and sugar addition on the physicochemical properties and nanostructure of fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, 45, 72-82.

Stoll L., da Silva A.M., Iahnke A.O.S., Costa T.M.H., Flôres S.H., Rios A.O. (2017). Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), 13218-13225.

Su J.F., Huang Z., Zhao Y.H, Yuan X.Y., Wang X.Y, Li M. (2010). Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 266-276.

Su K., & Wang C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*, 37(11), 2139-4215.

Sun J., Zhou W., Huang D., Fuh J.Y.H., Hong G.S. (2015). An overview of 3D printing technologies for food fabrication. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1605-1615.

Sun X., Guo X., Ji M., Wu J., Zhu W., Wang J., Cheng C., Chen L., Zhang Q. (2019). Preservative effects of fish gelatin coating enriched with CUR/ β CD emulsion on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 272, 643-652.

Taghizadeh M., Mohammadifar M.A., Sadeghi E., Rouhi M., Mohammadi R., Askari F., Mortazavian A.M., Kariminejad M. (2018). Photosensitizer-induced cross-linking: A novel approach for improvement of physicochemical and structural properties of gelatin edible films. *Food Research International*, 112, 90-97.

Tatara R.A. (2017). Compression molding. In: Kutz M. (ed.). *Applied plastics engineering handbook: Processing, materials, and applications* (2nd edition). William Andrew, AEB, pp. 291-320.

Teimouri A., Azadi M., Emadi R., Lari J., Chermahini A.N. (2015). Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application. *Polymer Degradation and Stability*, 121, 18-29.

Tišler-Korljan B., & Gregor-Svetec D. (2014). Properties and printability of compression moulded recycled polyethylene. *Materials & Design*, 55, 583-590.

Tonda-Turo C., Gentile P., Saracino S., Chiono V., Nandagiri V.K., Muzio G., Canuto R.A., Ciardelli G. (2011). Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), 700-706.

Tsai M.L., Tsai S.P., Ho C.T. (2017). Tetrahydrocurcumin attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis by inhibiting the activation and autophagy of hepatic stellate cells. *Journal of Functional Foods*, 36, 418-428.

Uranga J., Etxabide A., Guerrero P., de la Caba K. (2018). Development of active fish gelatin films with anthocyanins by compression molding. *Food Hydrocolloids*, 84, 313-320.

Uranga J., Leceta I., Etxabide A., Guerrero P., de la Caba K. (2016). Cross-linking of fish gelatins to develop sustainable films with enhanced properties. *European Polymer Journal*, 78, 82-90.

Varley M.C., Neelakantan S., Clyne T.W., Dean J., Brooks R.A., Markaki A.E. (2016). Cell structure, stiffness and permeability of freeze-dried collagen scaffolds in dry and hydrated states. *Acta Biomaterialia*, 33, 166-175.

Venkatesan J., Anil S., Kim S.K., Shim M.S. (2017). Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. *Marine Drugs*, 15(5), 143-160.

Wang H., Gong X., Guo X., Liu C., Fan Y.Y., Zhang J., Niu B., Li W. (2019). Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1118-1125.

Wang H., Hao L., Niu B., Jiang S., Cheng J., Jiang S. (2016). Kinetics and antioxidant capacity of proanthocyanidins encapsulated in zein electrospun fibers by cyclic voltammetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(15), 3083-3090.

Wang H., Hao L., Wang P., Chen M., Jiang S., Jiang S. (2017a). Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. *Food Hydrocolloids*, 63, 437-446.

Wang H.J., An D.S., Rhim J.W., Lee D.S. (2017b). Shiitake mushroom packages tuned in active CO₂ and moisture absorption requirements. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 10-15.

Wang L., Zhang M., Bhandari B., Yang C. (2018). Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *Journal of Food Engineering*, 220, 101-108.

Wang S., Ren J., Li W., Sun R., Liu S. (2014). Properties of polyvinyl alcohol/xylan composite films with citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 103, 94-99.

Wiczowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 51(1), 303-309.

Włodarczyk-Biegun M.K., & del Campo A. (2017). 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials*, 134, 180-201.

Wong Y.M., & Siow L.F. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3086-3092.

Wu J., Sun X., Guo X., Ji M., Wang J., Cheng C., Chen L., Wen C., Zhang Q. (2018). Physicochemical, antioxidant, in vitro release, and heat sealing properties of fish gelatin films incorporated with β -cyclodextrin/curcumin complexes for apple juice preservation. *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), 447-461.

Wu X., & Prior R.L. (2005a). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599.

Wu X., & Prior R.L. (2005b). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization- tandem mass spectrometry

in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3101-3113.

Xiao J., Shi C., Zheng H., Shi Z., Jiang D., Li Y., Huang Q. (2016). Kafirin protein based electrospun fibers with tunable mechanical property, wettability, and release profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(16), 3226-3233.

Xu H., Shen L., Xu L., Yang Y. (2015). Low-temperature crosslinking of proteins using non-toxic citric acid in neutral aqueous medium: Mechanism and kinetic study. *Industrial Crops and Products*, 74, 234-240.

Yanwong S., & Threepopnatkul P. (2015). Effect of peppermint and citronella essential oils on properties of fish skin gelatin edible films. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 87(1), 012064-012072.

Yao Z.C., Chang M.W., Ahmad Z., Li J.S. (2016). Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. *Journal of Food Engineering*, 191, 115-123.

Yates M., Gomez M.R., Martin-Luengo M.A., Ibañez V.Z., Serrano A.M.M. (2017). MultivalORIZATION of apple pomace towards materials and chemical. Waste to wealth. *Journal of Cleaner Production*, 143, 847-853.

Yildirim S., Röcker B., Pettersen M.K., Nilsen-Nygaard J., Ayhan Z., Rutkaite R., Radusin T., Suminska P., Marcos B., Coma V. (2018). Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165-199.

Yoon S.D., Chough S.H., Park H.R. (2006). Properties of starch-based blend films using citric acid as additive. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(3), 2554-2560.

Yoon S.D., Chough S.H., Park H.R. (2007). Preparation of resistant starch/poly(vinyl alcohol) blend films with added plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(4), 2485-2493.

Yu Z., & Lau D. (2017). Flexibility of backbone fibrils in α -chitin crystals with different degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 174, 941-947.

Yu Z., Sun L., Wang W., Zeng W., Mustapha A., Lin M. (2018). Soy protein-based films incorporated with cellulose nanocrystals and pine needle extract for active packaging. *Industrial Crops and Products*, 112, 412-419.

Zhang C., Zhao F., Li R., Wu Y., Liu S., Liang Q. (2019). Purification, characterization, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from *Rosa rugosa* petals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 938-945.

Zhang L.L., Li H.H., Shi Y.H., Fan C.Y., Wu X.L., Wang H.F., Sun H.Z., Zhang J.P. (2016). A novel layered sedimentary rocks structure of the oxygen-enriched carbon for ultrahigh-rate-performance supercapacitors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(6), 4233-4241.

Zhang Y.Z, Venugopal J., Huang Z.M., Lim C.T., Ramakrishna S. (2006). Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*, 47(8), 2911-2917.

Zhou J., Tong J., Su X., Ren L. (2016). Hydrophobic starch nanocrystals preparations through crosslinking modification using citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1186-1193.

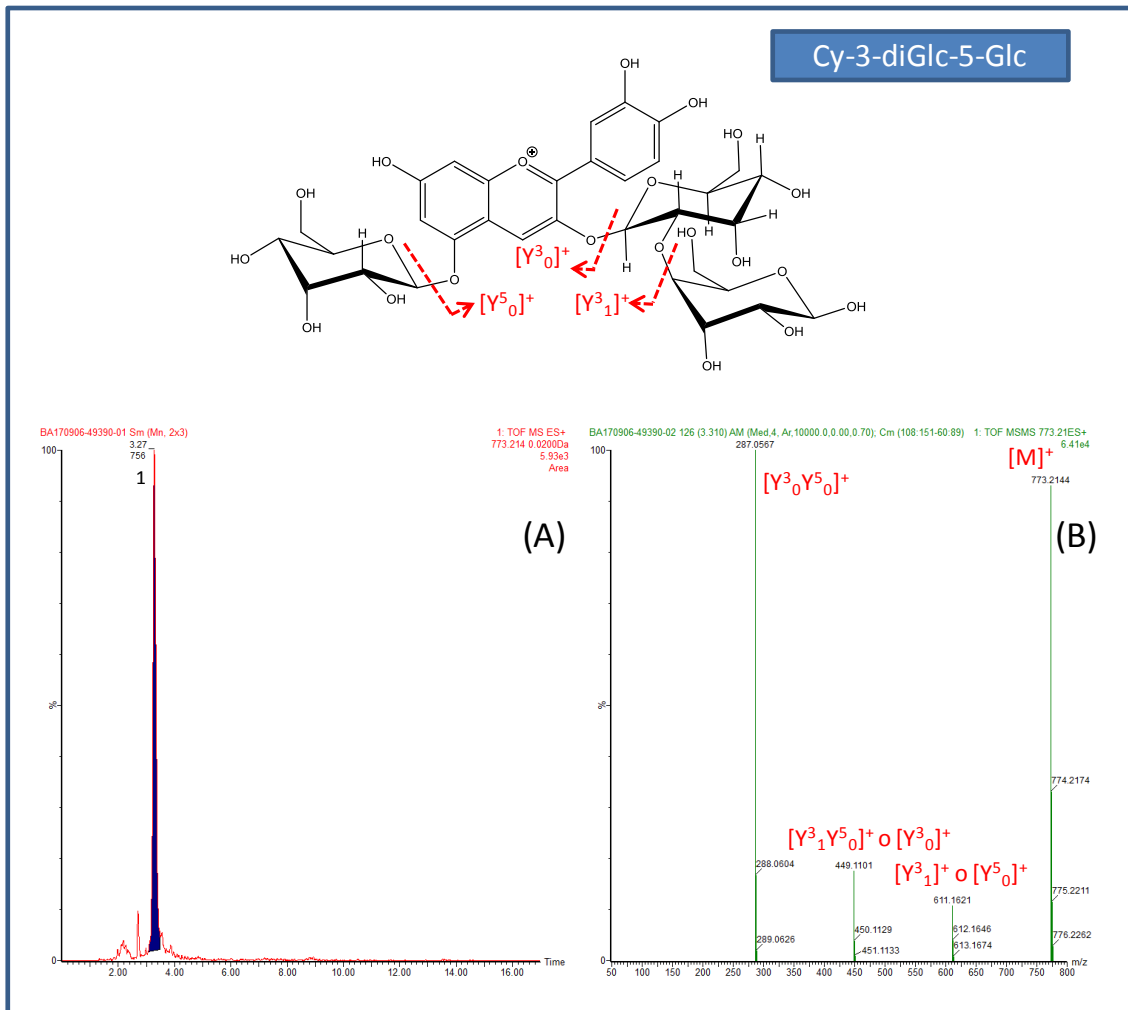
Zhuang C., Tao F., Cui Y. (2015). Anti-degradation gelatin films crosslinked by active ester based on cellulose. *RSC Advances*, 5(64), 52183-52193.

Datu osagarriak

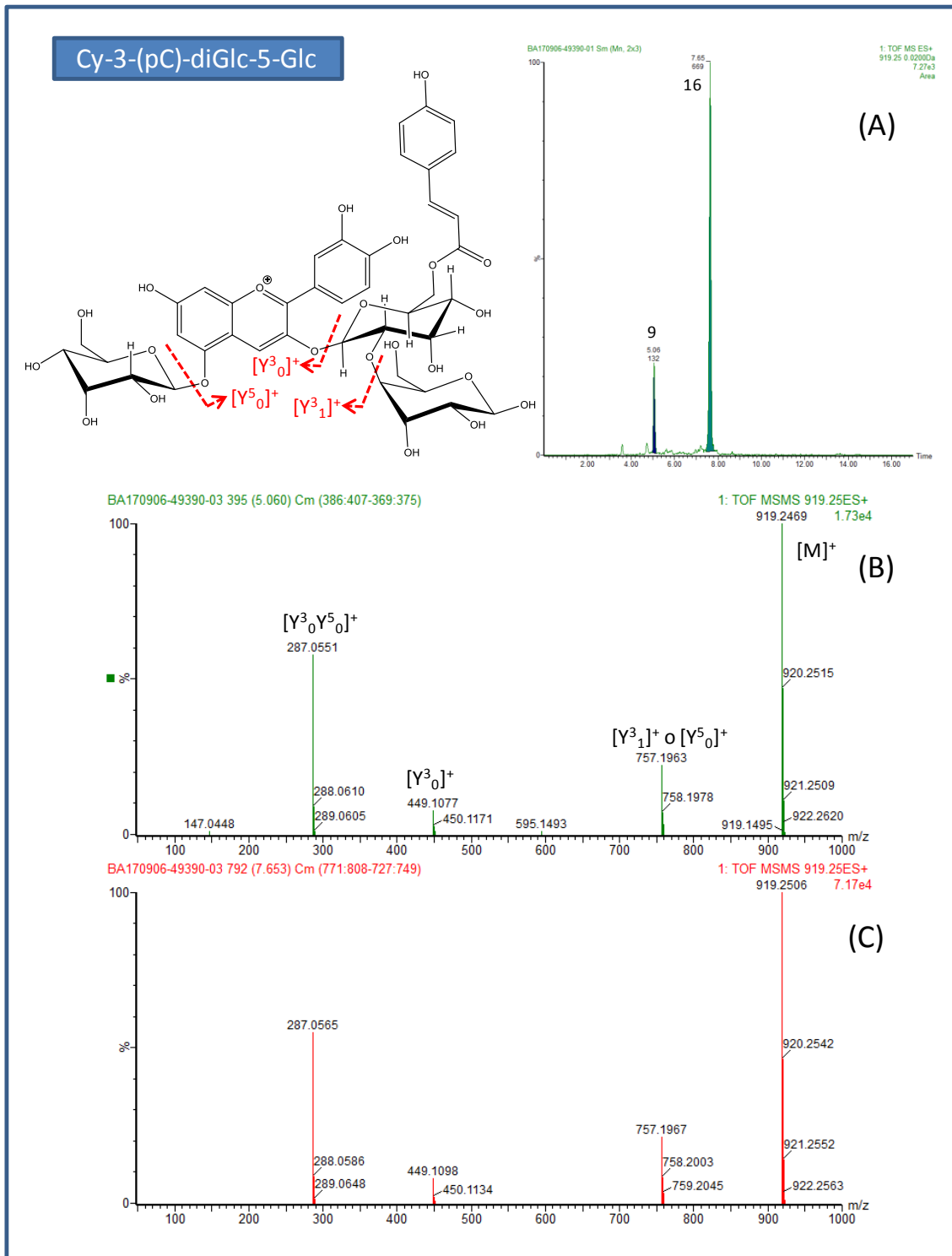
S1 taula Aza moretik erazutako antozianinen karakterizazioa UHPLC-Q-TOF-MS/MS analisia erabiliz zehaztua.

Seinalea	t _r (min)	Esp. Acc. Masa [M] ⁺ Errorea (mDa)	Teor. Acc. Masa [M] ⁺	Formula	[M] ⁺ zatikatzeak	Behin-behineko identifikazioa
1	3,27	773,2144 0,9	773,2135	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₁ ⁺	611,1660 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1139 [Y ³ ₁ Y ⁵ ₀] ⁺ edo [Y ³ ₀] ⁺ 287,0564 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-diGlc-5-Glc
2	3,77	1111,3091 -4,6	1111,3137	C ₄₉ H ₅₉ O ₂₉ ⁺	949,2684 [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1093 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0562 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Glcfer)- diGlc-5-Glc
3	3,91	1141,3226 -1,6	1141,3242	C ₅₀ H ₆₁ O ₃₀ ⁺	979,2687 [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1119 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0546 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Glcsin)- diGlc-5-Glc
4	4,03	935,2411 -4,1	935,2452	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄ ⁺	773,1953 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1084 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0571 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Caff)-diGlc- 5-Glc
5	4,28	1141,3235 -0,7	1141,3242	C ₅₀ H ₆₁ O ₃₀ ⁺	979,2664 [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1124 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0561 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Glcsin)- diGlc-5-Glc
6	4,36	979,2722 0,8	979,2714	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅ ⁺	817,2207 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1093 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0556 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Sin)-diGlc- 5-Glc
7	4,83	1111,3118 -1,9	1111,3137	C ₄₉ H ₅₉ O ₂₉ ⁺	949,2596 [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1093 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0562 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Glcfer)- diGlc-5-Glc
8	4,91	1141,3185 -5,7	1141,3242	C ₅₀ H ₆₁ O ₃₀ ⁺	979,2748 [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1042 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0569 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Glcsin)- diGlc-5-Glc
9	5,06	919,2469 -3,4	919,2503	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₃ ⁺	757,1963 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1077 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0551 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(pC)-diGlc- 5-Glc
10	5,50	949,2593 -1,5	949,2608	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄ ⁺	787,2090 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1101 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0569 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Fer)-diGlc- 5-Glc
11	5,54	979,2709 -0,5	979,2714	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅ ⁺	817,2166 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1089 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0568 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Sin)-diGlc- 5-Glc
12	6,13	1287,3589 -2,1	1287,3610	C ₅₉ H ₆₇ O ₃₂ ⁺	1125,3154 [Y ³ ₂] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1075 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0556 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(FerFer)- triGlc-5-Glc
13	6,56	1317,3705 -1,1	1317,3716	C ₆₀ H ₆₉ O ₃₃ ⁺	1155,3214 [Y ³ ₂] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1079 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0552 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(SinFer)- triGlc-5-Glc
14	6,86	1347,3826 0,5	1347,3821	C ₆₁ H ₇₁ O ₃₄ ⁺	1317,3705 [Y ³ ₂] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1052 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0561 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(SinSin)- triGlc-5-Glc
15	7,08	935,2413 -3,9	935,2452	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄ ⁺	773,1977 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1087 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0561 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(Caff)-diGlc- 5-Glc
16	7,65	919,2508 0,5	919,2503	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₃ ⁺	757,1967 [Y ³ ₁] ⁺ edo [Y ⁵ ₀] ⁺ 449,1098 [Y ³ ₀] ⁺ 287,0565 [Y ³ ₀ Y ⁵ ₀] ⁺	Cy-3-(pC)-diGlc- 5-Glc

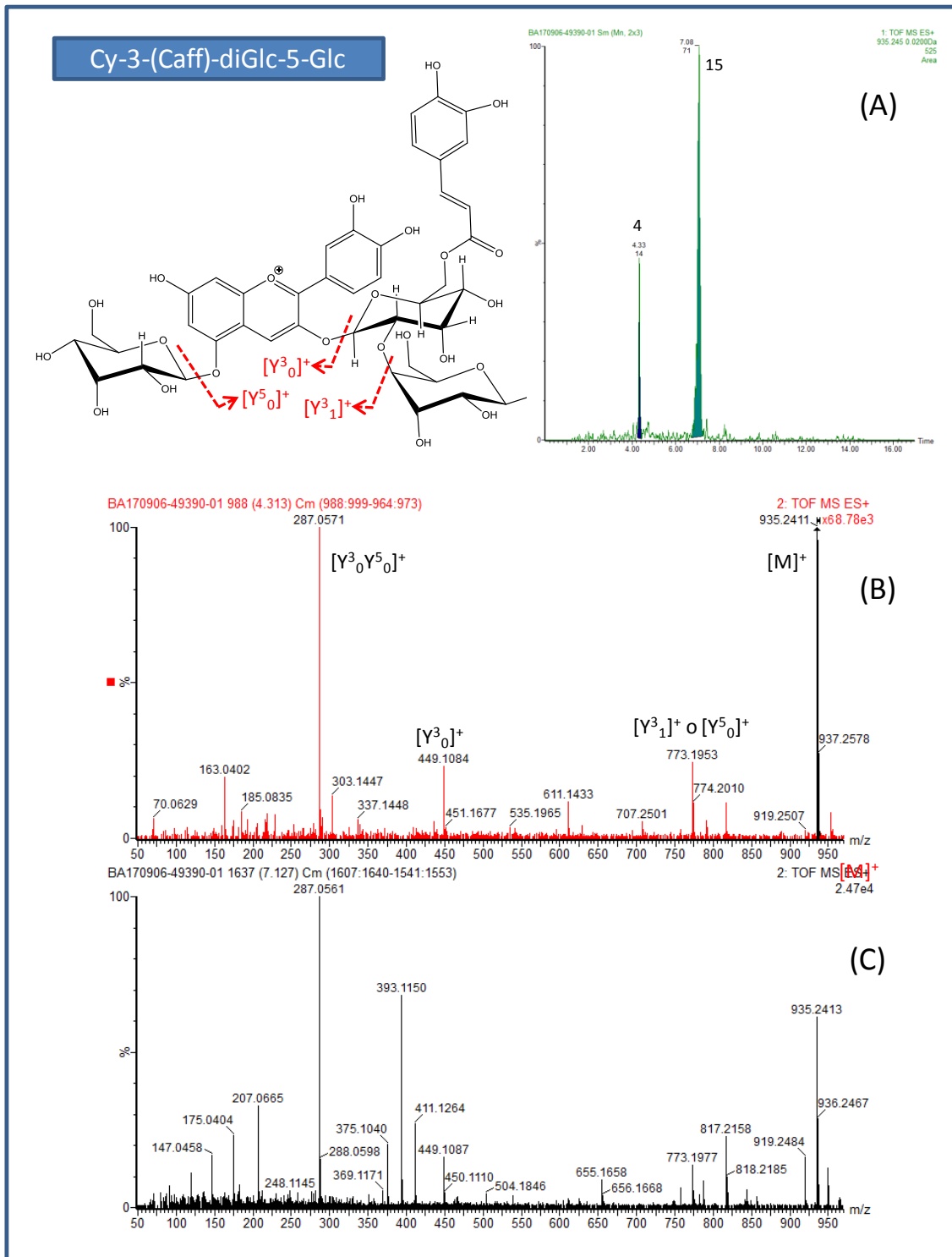
17	7,75	979,2704 -1	979,2714	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅ ⁺	817,2170 [Y ^{3,1}] ⁺ edo [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1088 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0565 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(Sin)-diGlc- 5-Glc
18	7,76	949,2604 -0,4	949,2608	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄ ⁺	787,2070 [Y ^{3,1}] ⁺ edo [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1084 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0565 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(Fer)-diGlc- 5-Glc
19	7,84	1125,3065 -1,7	1125,3082	C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇ ⁺	963,2619 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1095 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0571 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerFer)- diGlc-5-Glc
20	8,13	1185,3282 -1,1	1185,3293	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉ ⁺	1023,2699 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1090 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0565 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(SinSin)- diGlc-5-Glc
21	8,22	1155,3162 -2,5	1155,3187	C ₅₄ H ₅₉ O ₂₈ ⁺	993,2650 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1105 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0567 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerSin)- diGlc-5-Glc
22	8,52	1125,3066 -1,6	1125,3082	C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇ ⁺	963,2545 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1105 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0567 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerFer)- diGlc-5-Glc
23	8,76	1155,3179 -0,8	1155,3187	C ₅₄ H ₅₉ O ₂₈ ⁺	993,2670 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1086 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0567 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerSin)- diGlc-5-Glc
24	8,86	1185,3279 -1,4	1185,3293	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉ ⁺	1023,2749 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1093 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0565 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(SinSin)- diGlc-5-Glc
25	8,99	1125,3037 -4,5	1125,3082	C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇ ⁺	963,2572 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1090 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0563 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerFer)- diGlc-5-Glc
26	9,30	1185,3282 -1,1	1185,3293	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉ ⁺	1023,2786 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1053 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0575 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(SinSin)- diGlc-5-Glc
27	9,50	1155,3173 -1,4	1155,3187	C ₅₄ H ₅₉ O ₂₈ ⁺	993,2668 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1137 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0568 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerSin)- diGlc-5-Glc
28	10,98	1125,3081 -0,1	1125,3082	C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇ ⁺	963,2639 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1097 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0656 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerFer)- diGlc-5-Glc
29	11,08	1185,3282 -1,1	1185,3293	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉ ⁺	1023,2736 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1088 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0569 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(SinSin)- diGlc-5-Glc
30	11,27	1155,3171 -1,6	1155,3187	C ₅₄ H ₅₉ O ₂₈ ⁺	993,2573 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1090 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0565 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(FerSin)- diGlc-5-Glc
31	12,55	1185,3282 -1,1	1185,3293	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉ ⁺	1023,2736 [Y ^{5,0}] ⁺ 449,1088 [Y ^{3,0}] ⁺ 287,0569 [Y ^{3,0} Y ^{5,0}] ⁺	Cy-3-(SinSin)- diGlc-5-Glc



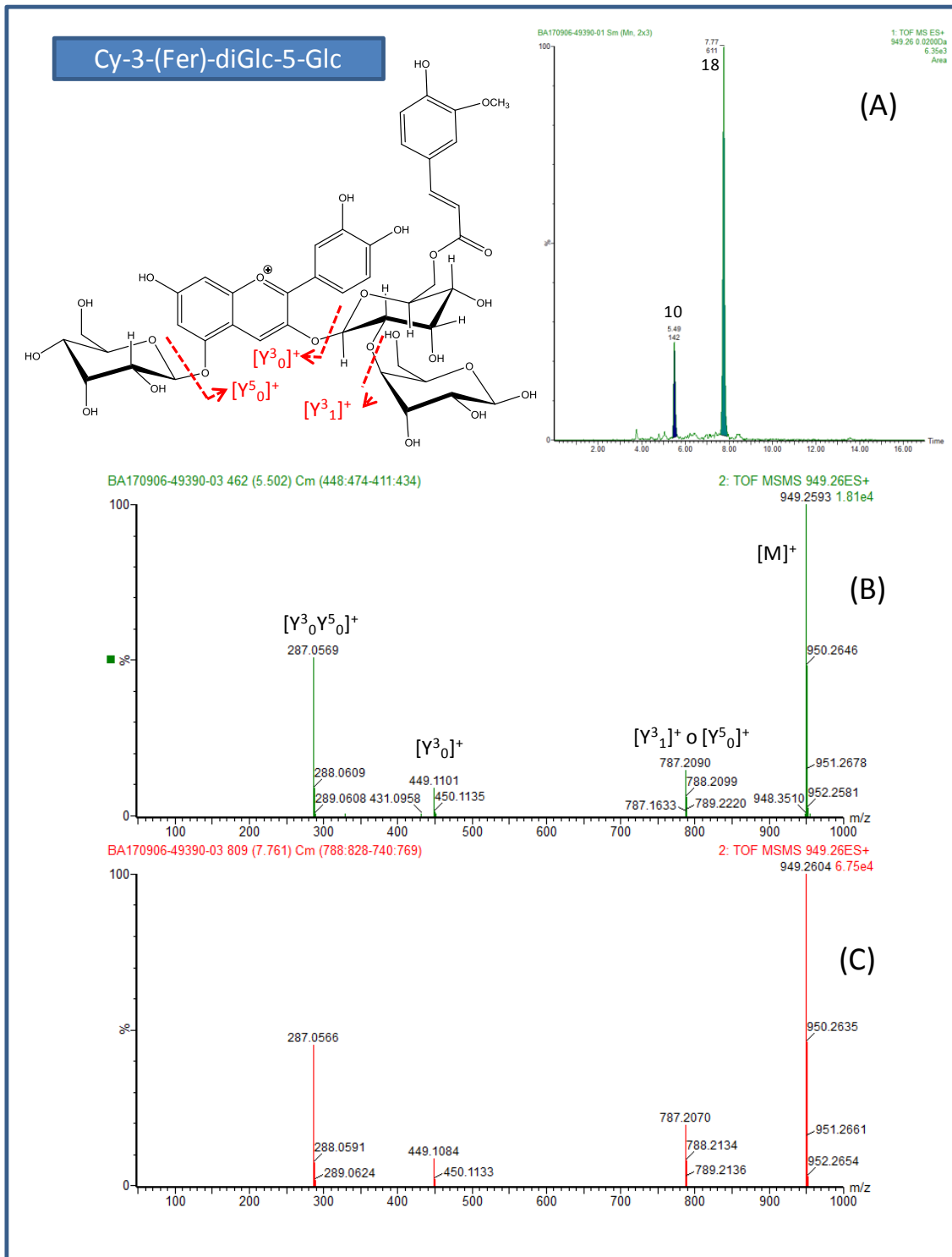
S1 irudia 773,2135 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-diGlc-5-Glc sustantziaren ESI-MS/MS espektroa t_r 3,27 minutuan (1) (B).



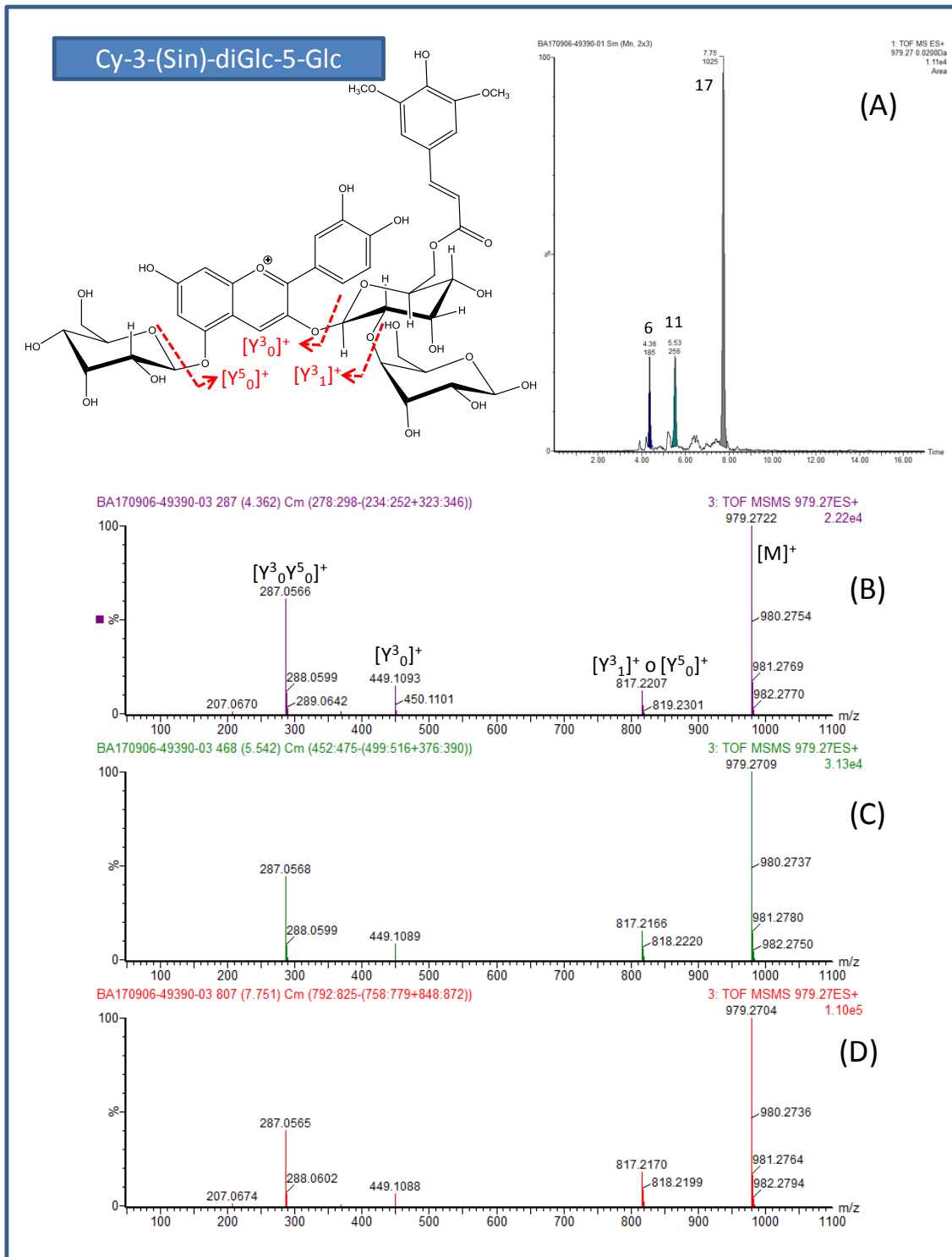
S2 irudia 919,2503 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(pC)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektoak t_r 5,06 minutuan (9) (B) eta t_r 7,65 minutuan (16) (C).



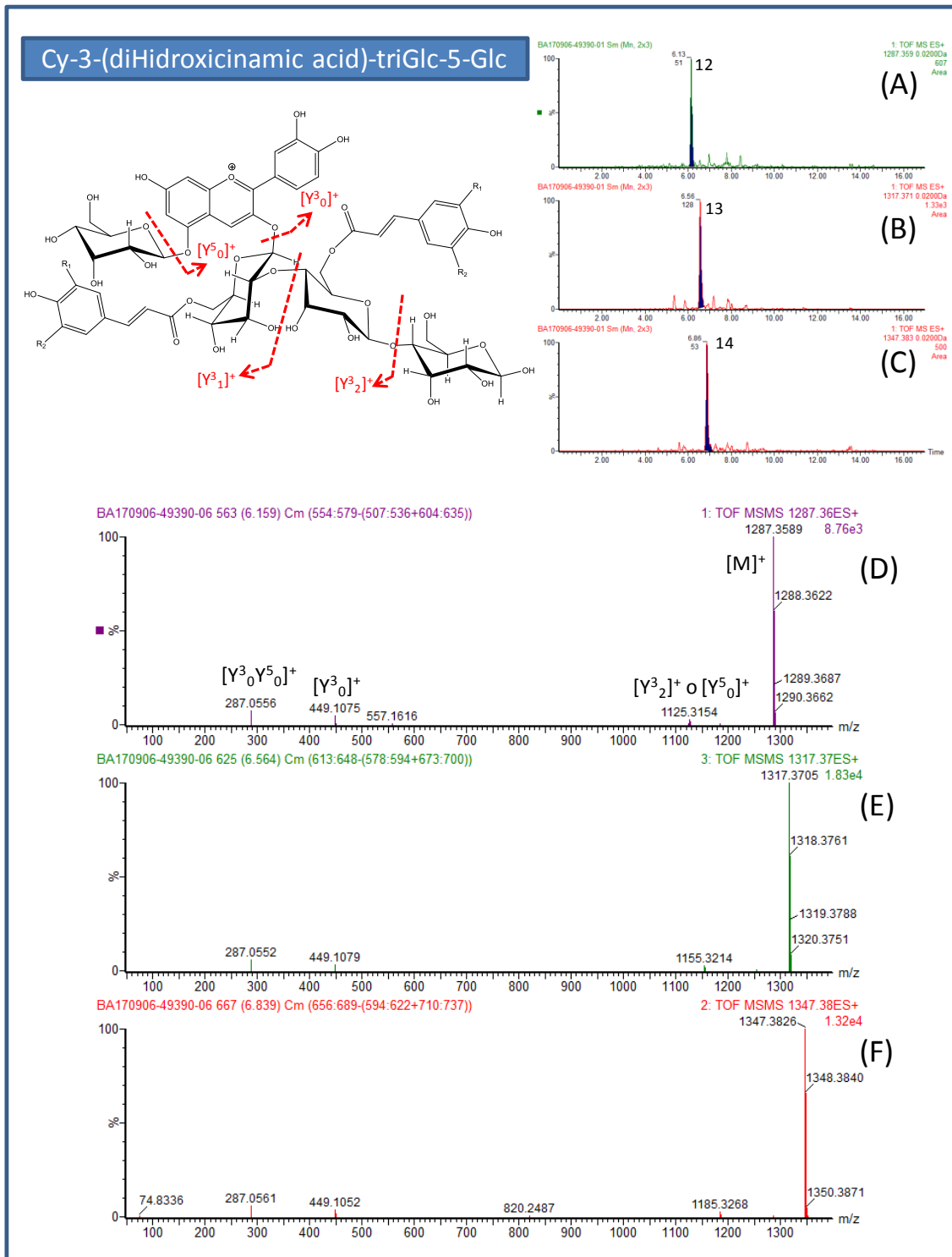
S3 irudia 935,2452 m/z $[M]^+$ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(Caff)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektoak t_r 4,03 minutuan (4) (B) eta t_r 7,08 minutuan (15) (C).



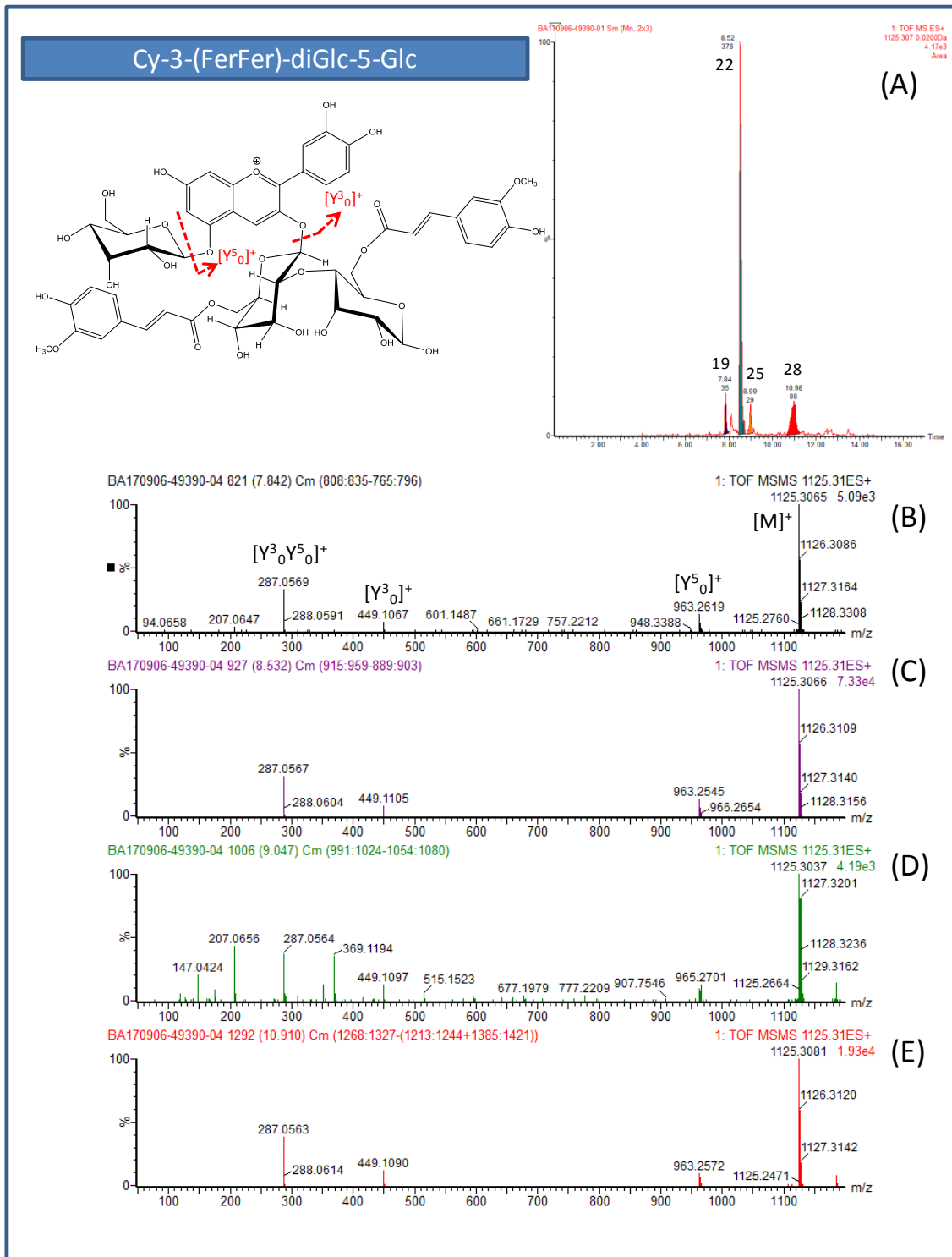
S4 irudia 949,2608 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutiko ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(Fer)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektoak t_r 5,50 minutuan (10) (B) eta t_r 7,76 minutuan (18) (C).



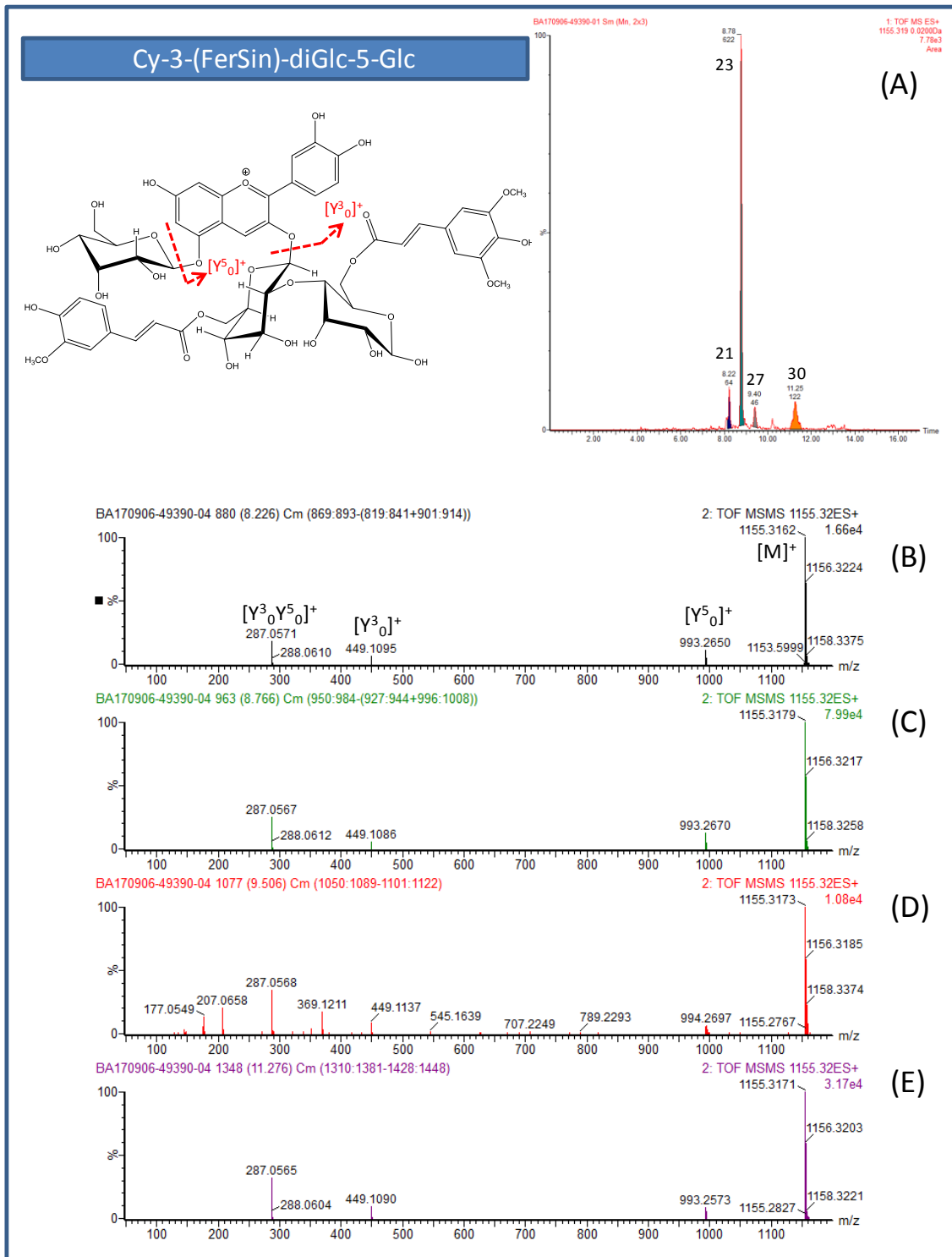
S5 irudia 979,2714 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(Sin)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektroak t_r 4,36 minutuan (6) (B), t_r 5,54 minutuan (11) (C) eta t_r 7,75 minutuan (17) (D).



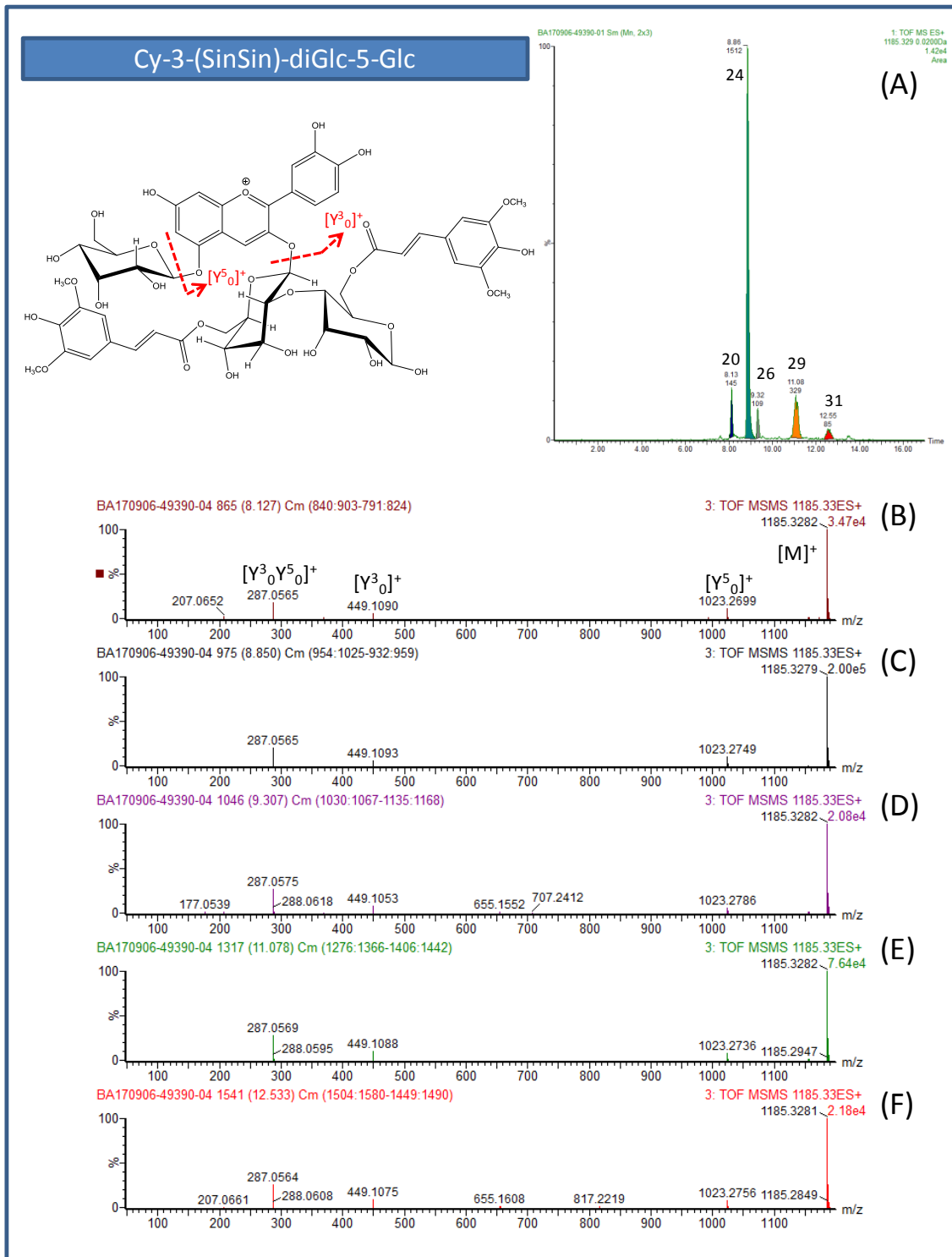
S6 irudia 1287,3610 m/z [M]⁺ (A), 1317,3716 m/z [M]⁺ (B) eta 1347,3821 m/z [M]⁺ (C) baldintzetan erazutako ioien kromatogramak eta ESI-MS/MS espektoak: Cy-3-(FerFer)-triGlc-5-Glc sustantziarena t_r 6,13 minutuan (12) (D), Cy-3-(SinFer)-triGlc-5-Glc sustantziarena t_r 6,56 minutuan (13) (E) eta Cy-3-(SinSin)-triGlc-5-Glc sustantziarena t_r 6,86 minutuan (14) (F).



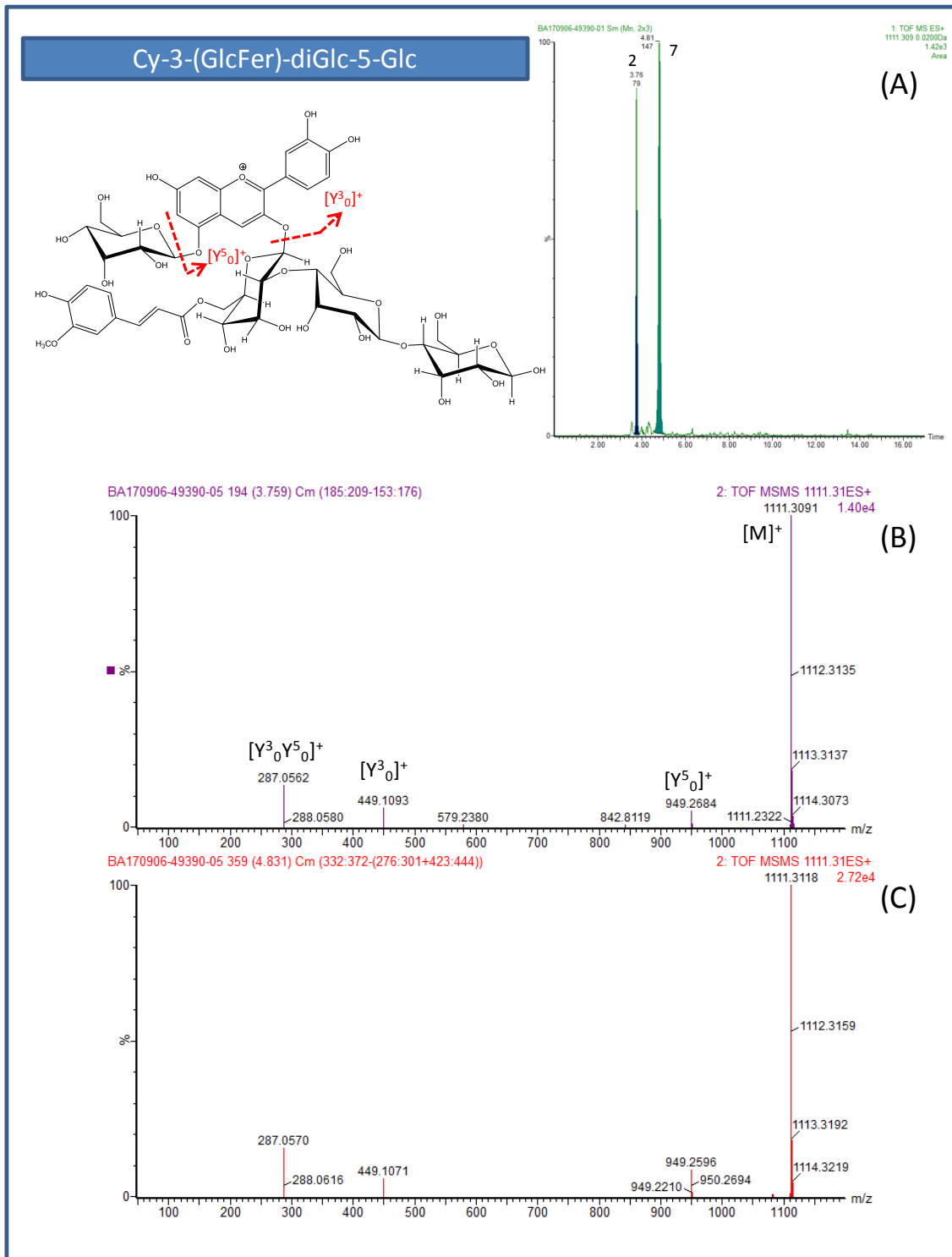
S7 irudia 1125,3065 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(FerFer)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektoak t_r 7,84 minutuan (19) (B), t_r 8,52 minutuan (22) (C), t_r 8,99 minutuan (25) (D) eta t_r 10,98 minutuan (28) (E).



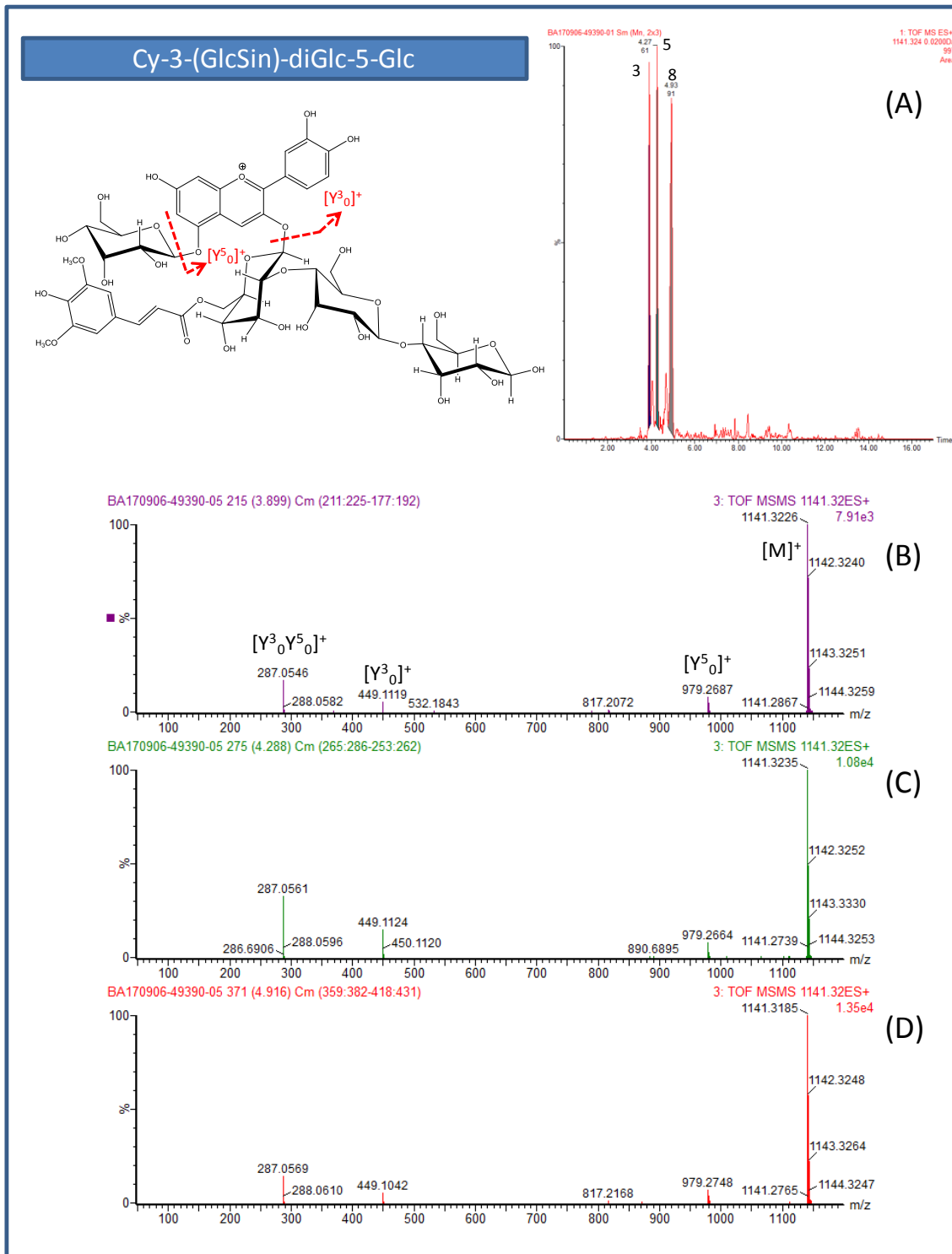
S8 irudia 1155,3173 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(FerSin)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektroak t_r 8,22 minutuan (21) (B), t_r 8,76 minutuan (23) (C), t_r 9,50 minutuan (27) (D) eta t_r 11,27 minutuan (30) (E).



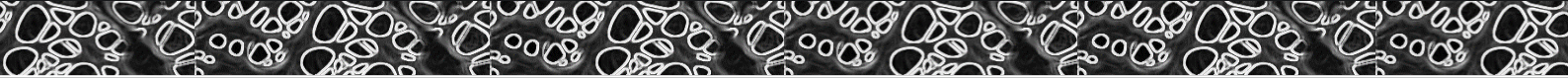
S9 irudia 1185,3293 m/z $[M]^+$ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(SinSin)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektroak t_r 8,13 minutuan (20) (B), t_r 8,86 minutuan (24) (C), t_r 9,30 minutuan (26) (D), t_r 11,08 minutuan (29) (E) eta t_r 12,55 minutuan (31) (F).



S10 irudia 1111,3137 m/z $[M]^+$ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(GlcFer)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektroak t_r 3,77 minutuan (2) (B) eta t_r 4,83 minutuan (7) (C).



S11 irudia 1141,3242 m/z [M]⁺ baldintzetan erazutako ioiaren kromatograma (A) eta Cy-3-(GlcSin)-diGlc-5-Glc isomeroen ESI-MS/MS espektoak t_r 3,91 minutuan (3) (B), t_r 4,28 minutuan (5) (C) eta t_r 4,91 minutuan (8) (D).



BioMat

