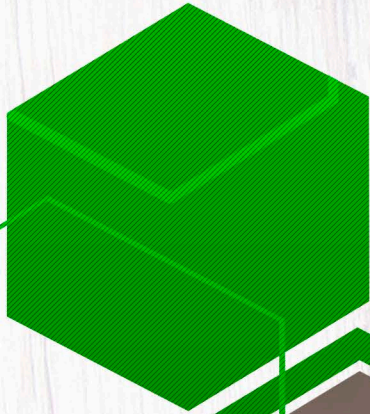


# NEKAZARITZA-INDUSTRIATIK LORTUTAKO HONDAKIN ETA AZPI-PRODUKTUETAN OINARRITUTAKO FILMAK ETA BIODONPOSITIBOAK



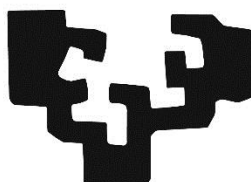
Tania Garrido Díaz

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila

Donostia-San Sebastián, 2019



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# **Nekazaritza-industriatik lortutako hondakin eta azpi-produktuetan oinarritutako filmak eta biokonpositeak**

**Tania Garrido Díaz**

Tesi zuzendariak:

Koro de la Caba eta Pedro Guerrero

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila

Donostia-San Sebastián, 2019



Zuri,



## **ESKERRAK**

### **AGRADECIMIENTOS**

### **ACKNOWLEDGEMENT**

*Cuando comienzas a escribir estas líneas te das cuenta de que esta etapa, que ha formado parte de tu vida durante estos últimos años, está llegando a su fin, y que durante este camino de más luces que sombras, han pasado muchas personas que han puesto su granito de arena para hacer que todo sea un poquito más fácil.*

*Para empezar, quería agradecer a mis directores, Koro de la Caba y Pedro Guerrero, por toda la ayuda que me han brindado durante todo este tiempo. Con ellos he aprendido que si a la tercera no va la vencida no hay que tirar la toalla y que si quieres algo es solo cuestión de confiar en ti mismo y en lo que haces.*

*I wish to thank Paul Kilmartin and Marija Gizdavic-Nikolaidis for their warm welcome in the University of New Zealand. It was a pleasure to share such a great experience with them and with all my college that introduce me in the interesting world of the winemaking. It was an intense three months experience*

*in the other part of the world that has boosted my self-confident and independence.*

*Bestalde, nirekin elkarren ondoan lan egin duten pertsoneri eskerrak eman nahi dizkiet. Lankideak baino gehiago lagunak izan direlako, eta lan gogorra egiteaz gain, momentu oso dibertigarriak ere pasatu ditugulako.*

*No puedo olvidar tampoco a mis amigos, y por supuesto a mi gran familia, que, aunque no me han podido ayudar en el aspecto más técnico, han hecho algo mucho más importante, estar ahí. Porque su paciencia y comprensión han sido infinitos y porque gracias a sus consejos y sus pequeños empujoncitos hoy puedo estar escribiendo estas líneas dándoles las gracias.*

*Badago ere espero ez duzunean epeltasuna ematen duen jendea. Udaberriko lehen eguzkia eskertzen duzun bezala eskertzen duzu zure bizitzan agertu izana. Horiei ere, eskerrik asko.*

*Amaitzeko, Euskara Errektoreordetzari, Biomat ikerketa taldeari eta Gipuzkoako Foru Aldundiari eskerrak eman nahi dizkiet emandako diru-laguntzengatik. Baita UPV/EHU-ko Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorrari (SGIker) ere.*

*Because nobody said it was easy...eskerrik asko denoi!!*



*"and suddenly you just know..."*

*...it's time to start something new and trust the magic of beginnings" ~M.E.~*



## LABURPENA

Azken urteotan, biopolimeroak lortzeko iturri berrien ikerketak baita hauen aplikazio berrien ikerketak ere, izugarriko hazkuntza jasan dute, gehienbat nekazaritzatik lortutako hondakin eta azpi-produktuen balorizazioan piztu den interesagatik, eta baita ingurumenarekiko lagungarria den kudeaketa lortzeagatik. Izan ere, egunero, nekazaritzatik eratorritako hondakin ugari sortzen dira, baina gehienak ez dira erabiltzen. Testuinguru horretan, soja-proteina soja-olioa ekoizterakoan lortzen den azpi-produktua da, eta purifikatzen bada soja-proteina isolatua lor daiteke. Proteina hau asko erabili da petroliotik eratorritako polimeroen alternatiba gisa bere propietate erakargarriak direla eta, hala nola, berriztagarritasuna, ugaritasuna eta biodegradagarritasuna. Horrela, soja-proteina beste konposatu batzuekin konbinatuz, soja-proteinak dituen desabantailak gainditzen dira eta aukera berriak sortzen dira elikagai eta biomedikuntza aplikazioetan. Gainera, erabili ohi diren material ez-berriztagarri eta ez-biodegradagarrien kantitatea murrizten da.

Aurrekoa kontuan hartuta, doktorego tesi honen helburu nagusia propietate hobeak dituzten soja-proteinan oinarritutako filmak eta biokonpositeak prestatzea da, biohondakin desberdinetatik lortutako beste biopolimero batzuk gehituz eta prozesatze-metodo desberdinak erabiliz. Horrela, tesi hau 11 kapitulutan banatuta dago. **1go kapitulua** landare-proteinetan oinarritutako filmen eta geruzen garapenean egin berri diren aurrerapenen ikuspegi orokorra da, soja-proteinan oinarritutako filmei garrantzia emanez. Gainera, proteinekin ontziratze aktiboen aplikazioetan egin diren aurrerapenen garrantzia azpimarratu nahi izan da. **2. kapituluan** lan honetan erabilitako materialak deskribatzen dira, baita hondakinetatik proteinak eta polisakaridoak

erauzteko erabilitako metodoak ere. Bestalde, erabilitako ekipoak eta prestatutako produktuen karakterizazioa egiteko metodoak ere azaltzen dira. **3. kapitulu**an, pH-aren, plastifikatzailearen eta prozesatze-metodoaren efektua aztertzen dira eta soja-proteinan oinarritutako filmek duten ingurumen inpaktua erakusten da. Behin prozesatze-baldintzak optimizatuta, **4. kapitulu**an, filmen propietate funtzionalak eta ingurumen inpaktuak aztertzen dira prozesatze-metodoaren funtziopean.

Hurrengo kapituluetan nekazaritzatik lortutako hainbat hondakinen balorizazioa deskribatzen da garatutako filmen propietate funtzionalak hobetzeko. **5. kapitulu**an, oilo-lumetatik keratina hidrolizatua lortzeko merkea eta ingurumenarekiko lagungarria den metodoa aztertzen da; horrela, lortutako keratina hidrolizatua, soluzio eta konpresio bidezko filmen egonkortasun kimiko eta termikoa hobetzeko erabil daiteke. Gero, **6. kapitulu**an, alga gorritik erauzitako agarra erabiltzen da estrusio eta konpresio bidez prestatutako soja-proteinan oinarritutako filmak garatzeko. Agarraren erauzketa-prozesuan lortutako hondakina, gehigarri bezala erabiltzen da **7. kapitulu**an non soja-proteina pelletak estrusioaren bidez eta biokonpositeak injekzioaren bidez lortzen diren. Hurrengo kapitulu ( **8. kapitulu**), txibien lumetatik egindako  $\beta$ -kitinaren erauzketa sinplea azaltzen da. Kitina konpresio-metodoaren bidez prestatutako soja-proteina filmak sendotzeko erabiltzen da atal honetan, propietate fisiko-kimiko eta mekaniko hobeak dituzten material funtzio anitzekoak lortzeko. Propietate funtzionalak hobetzeaz gain, filmen propietate antioxidatzaileak hobetzeak erabilera desberdinak sustatzen ditu garatutako produktuetan. Modu horretan, **9. kapitulu**an, mahats-patsa, ardo industrian lortutako hondakina, polifenolak erauzteko erabiltzen da mikrouhin bidezko erauzketa teknika erabiliz.

Amaitzeko, **10. kapitulu**an, aurreko kapituluetatik ateratako ondorio nagusiak aurkezten dira eta **11. kapitulu**an, tesian zehar agertutako erreferentzia guztiak.

## HELBURUAK

Doktorego tesi honen helburu nagusia propietate hobeak dituzten soja-proteinan oinarritutako filmak eta biokonpositeak prestatzea da, nekazaritza-industriatik lortutako hainbat hondakinetatik lortutako beste biopolimero batzuk gehituz eta prozesatze-metodo desberdinak erabiliz.

Tesiaren helburu zehatzak hurrengoak dira:

- Soja-proteinan oinarritutako materialen propietate funtzionalak aztertzea, hala nola, propietate mekanikoak, morfologikoak, optikoak, fisiko-kimikoak, termikoak eta hesi-propietateak.
- Erabilitako pH-a eta plastifikatzaile mota/kantitatea optimizatzea.
- Erabilitako prozesatze-metodoaren efektua ikertzea.
- Soja-proteinan oinarritutako materialen ingurumen inpaktua aztertzea.
- Hegazti-, arrain-, nekazaritza- eta ardo-industriatik lortutako hondakin desberdinak aztertzea proteinak, polisakaridoak eta polifenolak erauzteko. Biopolimero hauek soja-proteinan oinarritutako materialetan gehigarri gisa erabiltzea garatutako produktuen propietate funtzionalak hobetzeko.



# AURKIBIDEA

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1go KAPITULUA: SARRERA .....</b>                                 | <b>1</b>  |
| LABURPENA .....   | 3         |
| 1.1 PROTEINAREN EGITURA ETA PROPIETATEAK .....                      | 8         |
| 1.2 PROTEINAN OINARRITUTAKO FILMEN ETA GERUZEN<br>MANUFAKTURA ..... | 14        |
| 1.3 LANDARE PROTEINETAN OINARRITUTAKO FILM AKTIBOAK .....           | 17        |
| 1.3.1 Bioaktiboen erauzketa teknikak .....                          | 17        |
| 1.3.1.1 Jariakin gainkritikoen erauzketa .....                      | 18        |
| 1.3.1.2 Presiopeko likido erauzketa .....                           | 19        |
| 1.3.1.3 Ultrasoinuen bidezko erauzketa .....                        | 21        |
| 1.3.1.4 Mikrouhinen bidezko erauzketa .....                         | 22        |
| 1.3.1.5 Tekniken konbinaketa .....                                  | 24        |
| 1.3.2 Landare proteinak film aktiboen garapenerako .....            | 25        |
| 1.3.2.1 Soja-proteina .....   | 26        |
| 1.3.2.2 Zeina .....   | 32        |
| 1.3.2.3 Gari-glutena .....  | 35        |
| 1.3.2.4 Bestelako landare-proteinak .....                           | 38        |
| 1.4 ETORKIZUNeko JOERA ETA AUKERAK .....                            | 39        |
| <b>2. KAPITULUA: MATERIALAKETA METODOAK .....</b>                   | <b>41</b> |
| 2.1 MATERIALAK ETA ERREAKTIBOAK .....                               | 43        |
| 2.2 BIO-HONDAKINETATIK ERAUZITAKO MATERIALAK .....                  | 43        |
| 2.2.1 Keratinaren erauzketa eta karakterizazioa .....               | 43        |
| 2.2.2 Agarraren erauzketa eta karakterizazioa .....                 | 44        |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.3 Kitinaren erauzketa eta karakterizazioa .....                                 | 45 |
| 2.2.4 Polifenolen erauzketa eta karakterizazioa .....                               | 46 |
| 2.3 SOJA-PROTEINAN OINARRITUTAKO PRODUKTUEN PRESTAKETA .....                        | 50 |
| 2.3.1 Soluzio- eta konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmak .....             | 50 |
| 2.3.2 Estrusioa .....   | 51 |
| 2.3.3 Injekzioa .....   | 52 |
| 2.4 KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA .....   | 53 |
| 2.4.1 Hezetasun edukia, ura xurgatzeko ahalmena eta disolbaturiko masa totala ..... | 54 |
| 2.4.2 Fourier-en transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria .....          | 54 |
| 2.5 KARAKTERIZAZIO TERMIKOA .....   | 54 |
| 2.5.1 Ekorketa diferentzialeko kolorimetria .....                                   | 54 |
| 2.5.2 Analisi termograbitmetrikoa .....   | 54 |
| 2.5.3 Analisi mekaniko-dinamikoa .....  | 54 |
| 2.6 PROPIETATE OPTIKOAK .....   | 55 |
| 2.6.1 Kolore neurketak .....  | 55 |
| 2.6.2 Distira neurketak .....   | 55 |
| 2.6.3 Espektroskopia ultramore ikuskorra eta gardentasuna .....                     | 55 |
| 2.7 HESI-PROPIETATEAK .....   | 56 |
| 2.7.1 Uraren kontaktu angelua .....   | 56 |
| 2.7.2 Ur-lurrunarekiko iragazkortasuna .....  | 56 |
| 2.7.3 Olioarekiko iragazkortasuna .....   | 57 |
| 2.7.4 Oxigenoaren transmisio-abiadura .....   | 57 |
| 2.8 PROPIETATE MEKANIKOAK .....   | 57 |
| 2.9 KARAKTERIZAZIO MORFOLOGIKOA .....   | 58 |
| 2.9.1 Mikroskopia optikoa .....   | 58 |
| 2.9.2 Ekorketazko mikroskopio elektronikoa .....                                    | 58 |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.10 X-IZPIEN ANALISIA .....  | 58        |
| 2.10.1 X-izpien difrakzioa.....   | 58        |
| 2.10.2 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektronikoa.....  | 59        |
| 2.11 AKTIBITATE ANTIOXIDATZAILEA .....  | 59        |
| 2.11.1 Fenoliken guztizko edukia.....   | 59        |
| 2.11.2 Aktibitate antioxidatzailearen determinazioa.....  | 59        |
| 2.12 ERANTZUN GAINAZALEN METODOLOGIA .....  | 60        |
| 2.12.1 Formulazioaren optimizaziorako diseinu esperimentalta.....   | 60        |
| 2.12.2 Analisi estatistikoa eta erantzunaren optimizazioa .....   | 61        |
| 2.13 INGURUMEN INPAKTUA .....   | 61        |
| 2.14 ANALISI ESTATISTIKOA.....  | 62        |
| <b>3. KAPITULUA: PLASTIFIKATZAILEAREN, pH-AREN ETA PROZESATZE-METODOAREN EFEKTUA SOJA-PROTEINAN OINARRITUTAKO FILMETAN.....</b> | <b>63</b> |
| LABURPENA .....   | 65        |
| LABURPEN GRAFIKOA.....  | 66        |
| 3.1 FILMEN PRESTAKETA.....  | 67        |
| 3.2 EMAITZAK .....  | 68        |
| 3.2.1 Filmen karakterizazioa .....  | 68        |
| 3.2.2 Ingurumen inpaktua.....   | 78        |
| ONDORIOAK.....  | 81        |
| <b>4. KAPITULUA: SOLUZIO-METODOA VS KONPRESIO-METODOA: FILM JASANGARRIAK GARATZEA .....</b>                                     | <b>83</b> |
| LABURPENA .....   | 85        |
| LABURPEN GRAFIKOA.....  | 86        |
| 4.1 FILMEN PRESTAKETA.....  | 87        |
| 4.2 EMAITZAK .....  | 88        |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 4.2.1 Filmen karakterizazioa ..... | 88 |
| 4.2.2 Ingurumen inpaktua.....      | 94 |
| ONDORIOAK .....                    | 97 |

**5. KAPITULUA: OILO-LUMEN BALORIZAZIOA SUFRE ITURRI GISA FILMEN PROPIETATEAK HOBETZEKO .....99**

|   |     |
|---|-----|
| LABURPENA .....   | 101 |
| LABURPEN GRAFIKOA.....  | 102 |
| 5.1 FILMEN PRESTAKETA.....  | 103 |
| 5.2 EMAITZAK .....  | 104 |
| 5.2.1 Keratina hidrolizatuaren karakterizazioa.....                   | 104 |
| 5.2.2 Filmen karakterizazioa .....                                    | 108 |
| 5.2.2.1 Propietate fisikoak .....                                     | 108 |
| 5.2.2.2 Propietate termikoak .....                                    | 113 |
| 5.2.2.3 Propietate mekaniko dinamikoak eta trakzio propietateak ..... | 115 |
| 5.2.2.4 Gainazal propietateak.....                                    | 118 |
| ONDORIOAK .....   | 123 |

**6. KAPITULUA: AGARRAREN EFEKTUA ESTRUSIOAREN BIDEZ LORTUTAKO PELLETETAN BAITA KONPRESIO FILMETAN ERE.....125**

|  |     |
|--|-----|
| LABURPENA .....                          | 127 |
| LABURPEN GRAFIKOA.....                   | 129 |
| 6.1 PELLETEN ETA FILMEN PRESTAKETA ..... | 130 |
| 6.1.1 Pelleten prestaketa.....           | 130 |
| 6.1.2 Filmen prestaketa .....            | 130 |
| 6.2 EMAITZAK .....                       | 131 |
| 6.2.1 Agarraren karakterizazioa .....    | 131 |
| 6.2.2 Propietate fisiko-kimikoak .....   | 132 |
| 6.2.3 Propietate termikoak.....          | 137 |

|   |            |
|---|------------|
| 6.2.4 Propietate optiko eta morfologikoak .....   | 140        |
| 6.2.5 Propietate mekanikoak .....   | 143        |
| ONDORIOAK .....   | 145        |
| <b>7. KAPITULUA: ALGA HONDAKIN BETEGARRIZ GARATUTAKO SOJA-<br/>PROTEINAZKO BOKONPOSITEAK .....</b>  | <b>147</b> |
| LABURPENA .....   | 149        |
| LABURPEN GRAFIKOA.....  | 150        |
| 7.1 BOKONPOSITEEN PRESTAKETA .....  | 151        |
| 7.2 EMAITZAK .....  | 152        |
| 7.2.1 Estrusio prozesua.....  | 152        |
| 7.2.2 Hesi-propietateak.....  | 156        |
| 7.2.3 Propietate optikoak.....  | 158        |
| 7.2.4 Propietate mekanikoak eta morfologia.....   | 159        |
| ONDORIOAK .....   | 161        |
| <b>8. KAPITULUA: <math>\beta</math>-KITINAREN GEHITZEAFILMAK ETA HIDROGELAK<br/>GARATZEKO .....</b> | <b>163</b> |
| LABURPENA .....   | 165        |
| LABURPEN GRAFIKOA.....  | 168        |
| 8.1 FILMEN PRESTAKETA.....  | 169        |
| 8.2 EMAITZAK .....  | 170        |
| 8.2.1 $\beta$ -Kitinaren karakterizazioa .....  | 170        |
| 8.2.2 Filmen karakterizazioa .....  | 175        |
| 8.2.3 Hidrogelen karakterizazioa.....   | 181        |
| ONDORIOAK .....   | 184        |
| <b>9. KAPITULUA: ANTIOXIDATZAILEEN ERAUZKETA MIKROHUINEN<br/>TEKNOLOGIA ERABILIZ.....</b>           | <b>185</b> |
| LABURPENA .....   | 187        |

|   |            |
|---|------------|
| LABURPEN GRAFIKOA.....                                  | 190        |
| 9.1 EMAITZAK .....                                      | 191        |
| 9.1.1 MAE parametroen optimizazioa .....                | 191        |
| 9.1.2 Mahats-patsaren estraktuaren karakterizazioa..... | 196        |
| ONDORIOAK .....   | 210        |
| <b>10. KAPITULUA: ONDORIO NAGUSIAK.....</b>             | <b>211</b> |
| <b>11. KAPITULUA: ERREFERENTZIAK .....</b>              | <b>215</b> |

# ***1*** ***go*** ***kapitulua***

## **SARRERA**

*Garrido T., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. (2018)*

*The potential of vegetal and animal proteins to develop more sustainable food packaging. In: Gutiérrez T. (ed.), Polymers for Food Applications. Springer, Cham, 25-59*

*Etxabide A., Garrido T., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. (2018)*

*Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications. International Journal of Biological Macromolecules, 120, 2094-2105*



## LABURPENA

Biopolimeroen erabileraren interesa areagotu egin da, izan ere, kontsumitzaileek ingurumenarekiko duten ardura, baita aplikazio desberdinetan produktu ez-toxiko eta seguruak erabiltzeko duten desioa ere asetzen dutelako material hauek (Niaounakis, 2015). Testuinguru horretan, azken urteotan elikagaietzako ontziratze naturaletan eta aktiboetan interesa piztu da, kontsumitzaileak denbora gehiago irauten duten elikagaiak, kalitatekoak eta seguruak nahi dituztelako; hau guztia material sintetikoaren ordez konposatu naturalak eta biodegradagarriak erabiliz (Cerqueira et al., 2016). Modu berean, material biodegradagarriak biomedikuntza aplikazioetan erabiltzeko ikertu izan dira, hala nola, ehun-ingeniaritzan. Kaltetutako ehuna ordezkatzeko erabiltzen diren inplante iraunkor ez-degradagarriak ez bezala, biopolimeroetan oinarritutako aldamio biodegradagarrien erabilerak, kaltetutako ehunean birsortze eraginkor bat gauzatzen du (Balakrishnan et al., 2018). Horrela, petroliotik eratorritako materialak ordezkatzeko erabiltzen diren material biodegradagarriak eta berriztagarriak merkatuaren interesa piztu dute ontziratze eta biomedikuntza aplikazioetan.

Elikagaiak ontziratze teknologiak hazkunde azkarra erakutsi du azken urteotan. Izan ere, ikerkuntza-lan askok elikagaien segurtasunean, kalitatean eta babesean arreta jarri dute (Ma et al. 2017; Pinheiro et al., 2016; Sousa-Gallagher et al., 2016). Elikagaiak ontziratze erabiltzen diren material gehienek petrolioan dute jatorria. Material sintetiko hauek, izugarriko ingurumen arazo larriak gauzatzen dituzte bere biodegradagarritasun eta berriztagarritasun eza dela eta. Horrela, iturri naturaletatik lortutako material alternatiboen garapena aztertze joera dago (Wang et al., 2017a). Modu horretan, biodegradagarriak eta berriztagarriak diren ontziak erabiliz, mikroorganismoak

(bakterioak eta onddoak barne), kanpoko indar fisikoak, konposatu kimikoak, eguzki argia, konposatu lurrunkorrak, oxigenoa eta hezetasuna kontrolatu behar dira (Garavand et al., 2017).

Proteinetan oinarritutako filmak eta geruzak ontziratze sintetikoak ordezkatzeko aukera bat dira, izan ere, propietate onuragarriekin hornitzen dituzte elikagaiak, hala nola, usaina, zaporea, ehundura eta egonkortasuna hobetzen dituzte. Modu horretan, elikagaien babesean eginkizun garrantzitsua dute, baita distribuzioan eta merkaturatzean ere (Falguera et al., 2011).

Filma, geruza mehe bat bezala defini daiteke, elikagaia bildu dezakeena, elikagaien konposatuen artean jarri daitekeena edota poltsa jangarrietan zigila daitekeena. Bestalde, geruza deritzona elikagaien azalean zuzenean aplikatzen da sartu-irteten, espraiatzen, edo brotxarekin (Junqueira-Gonçalves et al., 2017; Otoni et al., 2017). Proteinak aukera egokia dira ontziratze erabiltzen diren filmak eta geruzak garatzeko, jangarriak, elikagaiarekin bateragarriak eta berriztagarriak direlako, eta babestutako produktuen balio nutrizionala handitzen dutelako. Gainera, polisakaridoekin alderatuz, sare molekular hiru-dimentzionala sortzeko gaitasun handiagoa dute proteinek, hidrogeno-loturekin, elkarrekintza hidrofoboekin eta disulfuro loturekin sarea egonkortu eta sendotzeaz gain, propietate mekanikoak eta hesi-propietateak hobetuz (Gupta eta Nayak, 2015). Elikagaiari kanpoko babesa emateaz gain, filmak eta geruzak mota askotako konposatuak garraiatzeko eramaile bezala erabil daitezke, hala nola, konposatu antimikrobiarrak eta antioxidatzaileak. Konposatu antimikrobien gehikuntzak filmetan, patogenoen hazkuntza eragotzi edo atzeratzen du (Aloui eta Khwaldia, 2016). Antioxidatzaileen gehikuntzak berriz, elikagaian oxidazioa galarazi edo atzeratzen du, bere bizitza luzatuz eta segurtasuna eta kalitatea hobetuz (Álvarez et al., 2017). Propietate



funtzionalak eta ontziraturako produktuaren propietate organoleptikoak hobetzeko asmoz filmetan beste konposatu batzuk ere gehitu daitezke. Konposatu hauen adibide batzuk honakoak dira: marroi kolorea agertzea ekiditeko agenteak, nutrazeutikoak, ehundura hobetzen duten konposatuak, zaporea eta kolorea ematen duten osagaiak, edota beste proteina eta polisakarido batzuk (Olivas et al., 2007).

Antioxidatzaileei dagokienez, sintetikoak erabili ohi dira ontziratze aplikazioetan. Hala ere, konposatu hauek osasun arriskuak ekar ditzakete, elikagaira migratzeko arriskua dagoelako. Gainera, herrialde askotan geroz eta lege zorrotzagoak jartzen ari dira (Gómez-Estaca et al., 2014). Zorionez, antioxidatzaile naturalen erabilera aztertua izaten ari da; adibidez, tokoferola (Córdoba eta Sobral, 2017), landare estraktuak (Saberri et al., 2017) eta olio esentzialak (EO) (Atarés eta Chiralt, 2016) erabiltzen hasi dira. Izan ere, geroz eta azertuago dago landareetatik eratorritako bioaktiboen lorpena, batez ere elikagai-, baso- eta nekazaritza-industriako hondakinak erabiliz. Horrela, egunero sortu eta ekidin ezin daitekeen hondakin kantitate handi bati balio erantsia ematen zaio. Elikagai-industrian hondakin kantitate handiak sortzen dira sagarrak, ahabiak, olibak, mugurdiak, mahatsak edo fruitu zitrikoak prozesatzean. Horrela, hondakin hauetatik antozianinak, azido fenolikoak eta flabonoideak erauz daitezke eta ontzi aktiboak eta adimendunak garatu (Socaci et al., 2017). Adibidez, Luchese-k et al. (2018) lanean antozianinak dituen ahabi-patsa, ahabi zukua egitean lortzen den hondakinetatik lortua, erabili zen pH balioaren arabera kolorea aldatzen zuten filmak garatzeko. Kolore aldaketa hori elikagaiaren pH aldaketarekin erlazionatu daiteke. Prietto eta lankideek (2017) eta Ma eta Wang-ek (2016), antozianina antioxidatzaile gisa ere erabili zuten baina iturri desberdinetatik lortua: babarrun beltzen hazietatik, aza gorriaren hostoetatik eta mahatsen azaletatik, hain zuzen ere. Olejar eta lankideek (2017), ardo-industriatik lortutako taninoen aktibitate antioxidatzailea azertu zuten; eta de Moraes Crizel eta lankideek

(2018) olioa ekoizterakoan lortutako oliba-patsaren irina eta mikropartikulak erabili zituzten aktibitate antioxidatzailea sustatzeko.

Konposatu antimikrobialrei dagokienez, filmetan agente antimikrobial naturalen gehikuntza ere ikertu izan da. EO, kitosanoa, eta landare eta belarren estraktuak erabili dira, ontziratutako produktuan mikrobioen hazkuntza kontrolatzeko (Etxabide et al., 2017, Irkin eta Esmer, 2015). Arfat eta lankideek (2014) arrain-proteina eta arrain azaletatik lortutako gelatinaren arteko nahastean albaka hostoaren EO eta ZnO nanopartikulen inpaktu antimikrobialra aztertu zuten. Albaka hostoaren EO-aren gehikuntzak, ZnO nanopartikulekin batera, aktibitate antibakteriano sendoa erakutsi zuten. Beste autore batzuk, konposatu antimikrobial naturalen eraginkortasuna frogatu dute elikagaietan bertan. Alparslan eta Baygarrek (2017), kitosanoa laranja azalaren EO-rekin batera duen efektu antimikrobialra aztertu zuten ur-sakonetan bizi diren izkira arrozetan; aldiz, Kakaei eta Shahbazik (2016), mahats gorrien hazi etanolikoen estraktuaren eta *Ziziphora clinopodioides* EO-ren gehikuntza aztertu zuten arrain xerretan.

Ontziratze aplikazioaz gain, konposatu bioaktiboak biomedikuntza aplikazioetan ere erabili dira. Konposatu hauek biomaterialetik edo inplantetik askatzen dira eta pazientearen berreskuratzea azkarragoa eta erosoagoa izatea lortzen da (Ruiz-Ruiz et al., 2017). Adibidez, Raja eta Fathimak (2015), propietate antioxidatzaileak zituzten gelatinan oinarritutako formulazioak sintetizatu zituzten, molekula antioxidatzaile txikien elkarrekintza fisikoak sustatuz, zainen tentsio oxidatzailea ekiditeko erabiltzen diren medikamentuak garraiatzeko. Patel eta lankideek (2018), berriz, kitosanoa eta gelatina nahastuz lupeolaren askapenerako hidrogel filmak prestatu zituzten, glutaraldehidoa

saretze errektibo gisa erabiliz. Lan horretan ondorioztatu zen kitosano/gelatina hidrogel filmek lupeola askatzeko ahalmena zutela eta zauriak hobeto sendatzeko erabil zitezkeela.

Orain arte, bioaktiboak eta beste motatako konposatuak gehitu izan dira proteinan oinarritutako filmetan; izan ere, hainbat gehigarriren askapenerako egokiak dira, eta modu erraz batean konposatuen artean elkarrekintza berriak sortzen dituzte. Horrela, lan ugari egin dira proteinak erabiliz filmak eta geruzak garatzeko; hala nola, kolagenoa (Wang et al., 2017b), gelatina (Molinaro et al., 2015), soja (Galus et al., 2012), gazurra (Cecchini et al., 2017), zeina (Pena-Serna et al., 2016), ilarra (Kowalczyk et al., 2016) edo gari-glutena (Sharma et al., 2017) erabili izan dira. Batez ere, soja-proteina erakargarria izan daiteke, kostu murriztuan baliabide erabilgarria delako, elikagaiekin erabiltzeko estandarrak betetzen dituelako, filmak eratzeko gaitasuna duelako eta biodegradagarria delako. Gainera, filmak eta geruzak garatzeko proteinak erabiltzean, ez dira bakarrik kontsumitzaileen beharrak asetzen, baizik eta nekazaritza-, haragi-, hegazti-, eta arrain-industrian lortzen diren azpi-produktuei eta hondakinei balio erantsia ematen zaie.

Aurrekoa kontuan hartuta, kapitulu honen helburua landare-proteinan oinarritutako filmen eta geruzen garapenean egin berri diren aurrerapenen ikuspegi orokorra ematea da, soja-proteinan oinarritutako filmei garrantzia emanez. Gainera, proteinekin ontziratze aktiboen aplikazioan egin diren aurrerapenen garrantzia azpimarratu nahi da.

## 1.1 PROTEINAREN EGITURA ETA PROPIETATEAK

Proteinaren egitura, tolesdura eta elkarrekintzak ikertzea funtsezkoa da bere propietateak eta funtzioak ulertzeko. Proteina hiru-dimentsiotako egitura batean tolestend aminoazidoz osatutako makromolekula da eta hainbat egitura sekundarioko elementuz osatuta dago (Yan et al., 2014); horrela, proteinaren egiturazko unitate basikoak  $\alpha$ -aminoazidoak dira. Proteina naturalek 20 aminoazido primario izan ditzakete eta hauek bata besteari amida loturekin lotuta daude. Aminoazido hauek alboko talde desberdin batzuk dituzte eta honek erlazio zuzena dauka disolbagarritasunean, karga netoan, erreaktibotasun kimikoan eta hidrogeno loturak sortzeko potentzialean (Damodaran, 2007), beraz, aminoazido bakoitzak proteina molekula bakoitzari berezko ezaugarria ematen dio. Alboko taldearen arabera aminoazidoak klasifikatu daitezke. Alboko taldearen polaritateak aminoazido bakoitzak beste batekin elkarrekintzak sortzeko duen gaitasuna zehaztu dezake, bereziki. Adibidez, aminoazido polarrek, beste aminoazido polarrekin elkarrekintzak sortzeko gaitasuna dute, baita proteinaren inguruan dauden ur-molekulekin ere, horrela, disolbagarritasuna hobetuz. Gainera, elkarrekintza hauek eginkizun garrantzitsua daukate proteinaren tolesduran (Kessel eta Ben-Tal, 2010).

Proteinek bere jatorriaren arabera aminoazido-konposizio desberdina dute. Horrek beste konposatuekin eratu daitezkeen elkarrekintzetan zuzeneko eragina du, baita bere propietate funtzionaletan ere. **1.1. taulan** aurkezten den bezala, arrain-gelatina gliziniz (%31-37), prolina-hidroxi-prolinaz (%14-20) eta alaninaz (%10-12) osatuta dago; behi-gelatinak, berriz, prolina- hidroxi-prolina (%22) eta alanina (%12) kantitate handiagoak ditu. Jakina denez, hidroxi-prolina aminoazido ez-esentziala da, prolinaren hidroxi-lazioaren ondorioz sortzen dena, eta kolagenoan aurkitzen da gehienbat; izan ere, beste proteinetan agertzea ez da oso ohikoa. Kolageno mota I-etik eratorritako gelatina

gehienek, ez dute zisteinarik ezta triptofanorik ere, eta tirosinaren kantitatea %1etik behera izan ohi da (Gómez-Guillén et al., 2009; Lassoued et al., 2014).

### 1.1. taula. Animalia-proteinen eta landare-proteinen aminoazidoen kontzentrazioa.

| Aminoazidoak                  | Konposizioa (%)   |                   |               |       |              |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------|--------------|
|                               | Arrain-gelatina   | Behi-gelatina     | Soja-proteina | Zeina | Gari-glutena |
| Azido aspartikoa <sup>a</sup> | 5,2               | 4,4               | 11,6          | 4,6   | 2,8          |
| Treonina                      | 2,5               | 1,7               | 3,6           | 3,5   | 2,8          |
| Serina                        | 6,4               | 2,9               | 5,2           | 7,05  | 5,7          |
| Azido glutamikoa <sup>b</sup> | 7,8               | 7,5               | 19,8          | 26,9  | 31,9         |
| Prolina                       | 15,6 <sup>c</sup> | 21,9 <sup>c</sup> | 5,6           | 10,5  | 14,1         |
| Glizina                       | 34,4              | 34,5              | 4,1           | -     | 5,4          |
| Alanina                       | 9,6               | 11,6              | 4,1           | 10,5  | 3,5          |
| Zisteina                      | -                 | -                 | 1,2           | 0,8   | 2,2          |
| Balina                        | 1,8               | 2,1               | 4,7           | 4,0   | 5,4          |
| Metionina                     | 1,7               | 0,5               | 1,3           | 2,4   | 1,3          |
| Isoleuzina                    | 1,1               | 1,1               | 4,8           | 5,0   | 4,1          |
| Leuzina                       | 2,2               | 2,5               | 7,7           | 21,1  | 7,2          |
| Tirosina                      | 0,3               | 0,1               | 3,7           | 5,3   | 2,8          |
| Fenilalanina                  | 1,6               | 1,2               | 5,2           | 7,3   | 4,4          |
| Histidina                     | 0,8               | 0,5               | 2,6           | 1,3   | 1,7          |
| Lisina                        | 2,9               | 2,6               | 6,0           | -     | 1,4          |
| Arginina                      | 5,6               | 4,8               | 7,6           | 4,7   | 3,2          |
| Triptofanoa                   | -                 | -                 | 1,3           | -     | -            |

<sup>a</sup>Azido aspartikoaren eta asparaginaren balioak

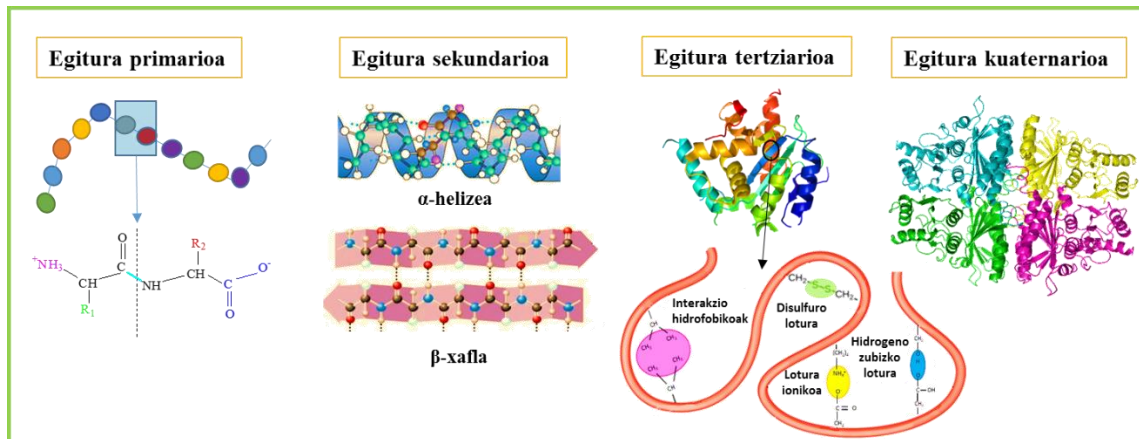
<sup>b</sup>Azido glutamikoaren eta glutaminaren balioak

<sup>c</sup>Prolinaren eta hidroxiprolinaren balioak

Landare-proteinei dagokienez, hauek zisteina kantitate handiagoa daukate, disulfuro loturen sorrera sustatzen duena (Garrido et al., 2018). Soja-proteina, gehienbat, azido glutamikoaz (%20) eta azido aspartikoaz (%12) osatuta dago, baita leuzinaz (%8) eta argininaz (%8) ere (Kalman, 2014). Zeina, berriz, azido glutamikoaz (%27), leuzinaz (%21), prolinaz (%10) eta alaninaz (%10) osatuta dago, baina glizina, zisteina, lisina eta triptofano kantitate eskasa da. Aminoazido ez-polarren proportzio handia, zeinaren disolbagarritasun mugatuaren erantzule da, eta horregatik alkohol urtsuetan bakarrik disolba daiteke (Shukla eta Cheryan, 2001). Glutenaren kasuan berriz, azido glutamikoa (%32) eta prolina (%14) dira aminoazido nagusiak (Rombouts et al., 2009).

Aminoazidoen talde funtzionalen artean sortzen diren hidrogeno-loturek eta elkarrekintza hidrofoboez eta elektrostatikoez proteinaren egitura lau mailetan egonkortzen dute (Verbeek eta van den Berg, 2010), **1.1. irudian** erakusten den bezala. Egitura primarioa aminoazidoen sekuentziari dagokio, eta bertan aminoazido baten  $\alpha$ -karboxilo taldea beste baten  $\alpha$ -amino taldearekin lotzen da lotura peptidikoaren bitartez. Katearen luzerak, aminoazidoen ordenarekin batera, proteinaren propietate fisikoak, kimikoak, egiturakoak, biologikoak eta funtzionalak definitzen ditu. Hurrengo maila, egitura sekundarioa deritzona, kate polipeptidoaren kokapen erregularrez konformatuta dago. Proteinak batez ere bi egitura sekundarioetan aurki daitezke,  $\alpha$ -helizean eta  $\beta$ -xaflan, baina baita zorizko kiribila egituran. Egitura sekundarioa hiru-dimentsiotako forma batean tolesten denean egitura tertziario batean bihurtzen da. Egitura horren formazioak proteinaren talde libreen eta interakzio hidrofobo, elektrostatiko, Van der Waals interakzio eta hidrogeno zubizko loturen arteko optimizazioa dakartza (Rodrigues et al., 2012). Amaitzeko, kate peptidiko bat baino gehiago batzen badira egitura kuarternarioa sortzen da. Proteinaren egitura garrantzitsua da filmen garapenerako batik bat, izan ere, proteinaren gaitasuna berarekin edo beste konposatuekin elkarrekintzak sortzeko zehazten du.

Metodo fisiko (berokuntza, ebakidura, presio hidrostatiakoa edo irradiazioa), kimiko (alkilazioa, azilazioa, azetilazioa edo pH aldaketa) eta biokimikoen (entzimak) bidez proteinaren egitura eralda daiteke, proteinaren berezko egitura aldatuz baina aminoazidoen sekuentzia aldatu gabe (Zink et al., 2016). Egituraren aldaketak proteinen propietate funtzionalak hobeto ditzake eta horrela, propietateak amaierako aplikaziora egokitu. Aldaketa hauek proteinaren desnaturalizazioa eragiten dute, proteina destolesten eta talde funtzionalak ikusgai jarriz eta elkarrekintza barne-molekularren bidez lotura berriak sortuz (Cordeiro de Azeredo, 2012; Schmid et al., 2014).



### 1.1. irudia. Proteinaren lau egiturak: primarioa, sekundarioa, tertziarioa eta kuaternarioa.

pH-aren balioak proteinaren egitura zehazten du eta horrela, proteinaren propietate funtzionaletan eragiten duen faktorea da. Elkarrekintza barne-molekularrak hala nola, hidrogeno zubizko loturak, interakzio hidrofoboak eta disulfuro loturak, nabarmenki pH aldaketan eraginpean daude. Proteinek karga negatiboa daukate pH-a proteinaren puntu isoelektrikoa (PI) baino altuagoa bada, eta berriz, karga positiboa, bere pH-a PI-a baino baxuagoa baldin bada. Horrela, pH-a bere puntu isoelektrikotik urrun doitzen denean, molekulen arteko aldarapen elektrostatikoa gertatzen da eta proteinaren disolbagarritasuna handitzen da. Bestalde, PI-an, molekulek ez dute kargarik, eta proteinaren agregazioa eta prezipitazioa gertatzen da (Wihodo eta Moraru, 2013).

Proteinen arteko elkarrekintzak aldatzeko asmoz, saretzea aztertu izan da proteinetan oinarritutako filmen indar mekanikoa eta hesi-propietateak hobetzeko metodo gisa. Testuinguru horretan, aldehidoak bezalako erreaktiboak erabili izan dira proteinen talde funtzionalekin elkarrekintzak sortzeko, hala nola, lisinaren eta hidroxilisinaren amino taldearekin edo azido aspartiko eta glutamikoaren talde karboxilikoarekin (Etxabide et al., 2015). Hala ere, aldehidoak toxikoak izan daitezke eta horregatik, proteinaren aldaketarako saretze produktu naturalak nahiago dira. Aragui eta Moslehi-ek (2014),

arrain-gelatina konposatu fenoliko naturala den azido kafeikoarekin erreakzionatu zuten, hesi-propietateak eta propietate fisiko-kimikoak hobetzeko. Samsalee eta Sothornvit (2017) lanean, berriz, rutina, azido kafeikoa eta genipina erabili ziren txerri-plasma-proteina sartzeko. Transglutaminasa bezalako entzimak ere erabiltzen dira proteinen saretze erreakzioetan (Al-Saadi et al., 2014; Song eta Zhao, 2014). Aldaketa fisiko, kimiko eta biokimikoez gain, plastifikatzailearen gehikuntza erabili ohi da proteinen hauskortasuna aldatzeko, prozesatzeko ahalmena zein filmak eta geruzak garatzeko behar diren propietateak hobetuz. Glizerola, manitola, sorbitola eta sakarosa plastifikatzaile jangarriak izan daitezke, hala eta guztiz, ura ere, plastifikatzaile eraginkorra da (Ustunol, 2009). Plastifikatzaile baten eraginkortasuna, bere tamainaren, formaren eta proteina-matrizearekin duen bateragarritasunaren araberakoa da. Rezaei eta Motamedzadegan (2015) autoreek, plastifikatzaile motaren efektua aztertu zuten proteina filmetan. Emaitzak erakutsi zuten, glizerola sorbitola baino plastifikatzaile hobea zen, izan ere, haustura-elongazioa hobetzen zuen eta tentsio-erresistentzia egokia ematen zien filmei.

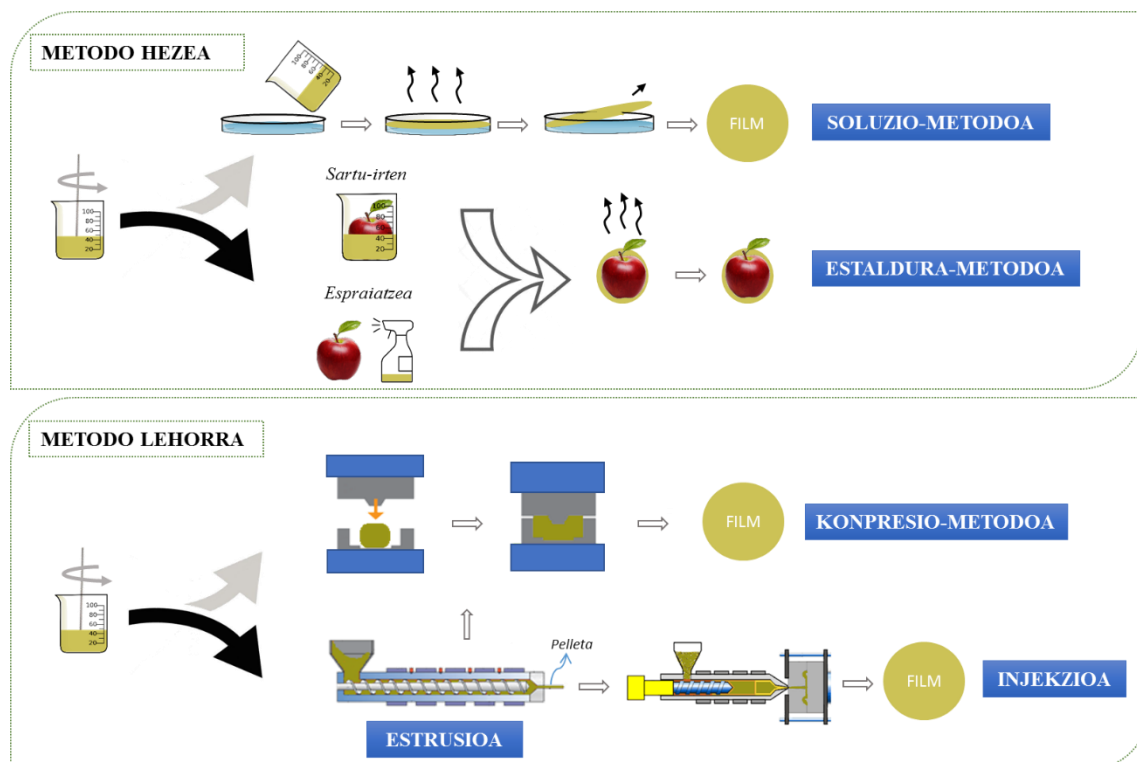
Amaitzeko, proteinen klasifikazioari dagokionez, makromolekula hauek bere formaren arabera klasifikatu daitezke: proteina globularrak edo zuntz-proteinak. Proteina globularrak esfera- edo elipsoide-itxurako egituretan tolesten dira berak biribilduz eta lotura hidrofobo, ioniko eta hidrogeno eta disulfuro loturak finkatuz. Zuntz-proteinak, berriz, zurtoin gisako itxura dute eta egitura paraleloetan kokatuta daude hidrogeno zubizko loturekin estekatuta zuntzak eratzeko (Gupta eta Nayak, 2015). Soja-proteina bezalako landare-proteinak, proteina globular baten adibide dira. Albuminen eta globulinen nahaste batez osatuta daude, eta %90 biltegiatze-proteinak dira. Sedimentazio-ratioa kontuan hartuta, soja-proteina lau frakzio desberdinez osatuta dago: 2S, 7S, 11S eta 15S. Hala ere, 7S ( $\beta$ -konglizina) eta 11S (glizina) proteinen %80a baino gehiago dira (Acosta-Dominguez et al., 2016). Bestalde, kolagenoa zuntz-proteinen



adibidea da. Kolagenoa saretutako hiru  $\alpha$ -loturez osatuta dago, kolageno triple-helizea deitzen dena. Bere egitura, barne eta kanpo hidrogeno loturekin egonkortuta dago batik bat, baina lotura hauek animaliaren espeziaren, adina eta ehunaren arabera aldatzen dira, beste faktore batzuen artean (Alfaro et al., 2015). Kolagenoaren zuntzak ez dira erraz disolbatzen, horregatik, kolagenoa kimikoki desnaturalizatu behar da gelatina lortzeko. Prozesuan zehar, hidrogeno loturak eta lotura kobalenteak apurtzen dira eta triple-helizea desegonkortu egiten da, kolagenoa gelatina disolbagarri batean bihurtuz. Gelatinaren egitura, hainbat parametroekin aldatu daiteke, hala nola, erauzketa temperaturarekin, pH-arekin, lehortze temperaturarekin eta hezetasun-erlatiboarekin (Duconseille et al., 2017). Orokorrean, egiturazko desberdintasun hauek proteina bakoitzaren berezko ezaugarriak eta funtzionalitateak islatzen dituzte. **1.1. taulan** erakusten den bezala, proteina bakoitzak aminoazido-konposizio desberdin bat dauka eta hori dela eta, propietate termiko, erreologiko, biskoelastiko eta mekaniko desberdinak (Díaz-Calderón et al., 2017). Propietate funtzionalak aldatzen badira ere, proteina guztiak ontziratze aplikazioetarako egokiak diren propietate batzuk dituzte. Bere abantailen artean honako hauek daude: filmak eratzeko gaitasuna dute, gardentasun ona, oxigenoaren eta gantzaren aurkako hesi-propietate bikainak, zigilatze erraztasuna, usain eza eta zapore eza (Song eta Zheng, 2014; Tongnuanchan et al., 2012; Tongnuanchan et al., 2016). Hala ere, proteinak urarekiko sentikortasun handia daukate eta neurrizko propietate mekanikoak. Horrela, azkeneko propietate hauen hobekuntza behar da proteinan oinarritutako ontziratze aktibo berriak garatzeko (Lin eta Zhao, 2007; Park et al., 2014).

## 1.2 PROTEINAN OINARRITUTAKO FILMEN ETA GERUZEN MANUFAKTURA

Proteinetan oinarritutako filmak garatzeko hainbat produkzio teknika erabiltzen dira, hala nola, metodo hezeak eta metodo lehorrak. Metodo hezearen sinpletasunagatik, teknika hau laborategi eskalan gehien erabiltzen da (Kashiri et al., 2017a; Liu et al. 2017a). Hala ere, eskala handiago batean estrusioa, konpresioa eta injekzioa erabiltzen dira (Ciannamea et al., 2017). Horrela, plastiko-industrian erabiltzen den teknologia ere film berriztagarriak eta biodegradagarriak prestatzeko erabili daiteke. **1.2. irudian** manufaktura metodoen eskema bat aurkezten da.



**1.2. irudia.** Filmek eta geruzek manufaktura: metodo hezeak eta lehorrak.

Proteinan oinarritutako filmak eta geruzak soluzio-metodoarekin prestatu izan ohi dira. Ura disolbatzaile erabili gabe izan arren, ur-alkohol soluzioak ere erabili daitezke zaina bezalako proteinak disolbatzeko. Film eta geruza homogeneousak lortzeko

berokuntza, nahasketa eta pH-aren doikuntza kontuan izan beharreko parametroak dira; izan ere, prozesatze-baldintza horiek proteinaren desnaturalizazioa eragiten dute, elkarrekintzak sustatuz edo oztopatuz. Filma prestatzeko soluzioa prest dagoenean, hau Petri ontzietan isuri egiten da eta lehortzen uzten da filma lortu arte (Liu et al., 2016; Qazanfarzadeh eta Kadivar, 2016) edo zuzenean jakietan aplikatzen da sartu-irten edo espraiatzeko teknika erabiliz (Zhong et al., 2014). Lehortze-prozesua giro baldintzetan eman daiteke edo tenperatura eta hezetasun-erlatiboaren kontrolpean, guztiak filmen propietateetan eragiten duelarik (Cerqueira et al., 2016). Proteinetan oinarritutako filmen produkzioa industria-mailara pasatzeko, plastiko eta paper industrietan erabili ohi den soluzio-metodo jarraitua erabiltzen da. Teknika honetan, filmak eratzeko soluzioa zinta batean hedatzen da eta hau bero-kondukzioaren, konbekzioaren, erradiazio infragorriaren edo hauen konbinazioen bidez lehortzen da. Teknika honek soluzio kontzentratuagoak behar ditu ohiko soluzio-metodoarekin konparatuz (Ortiz et al., 2017). Teknika honekin prozesu jarriak burutzeko, propietate erreologikoak neurtu behar dira fluxu baldintza egokiak lortzeko baita sedimentazioa minimizatzeke ere (de Moraes et al., 2013).

Metodo lehorrei dagokienez, estrusioa, konpresioa edo injekzioa erabiltzen direnean, proteinak bere trantsizio tenperaturatik gora berotu behar dira bere jarria lortzeko (Ghanbarzadeh eta Oromiehi, 2008). Gainera, presioa ere aplikatzen da eta plastifikatzaileak gehitzen dira trantsizio tenperatura hori jaisteko eta proteinaren termoplastizitatea areagotzeko (Hernandez-Izquierdo eta Krochta, 2008; Visakh eta Nazarenko, 2017). Poliolak bezalako plastifikatzaileak erabili ohi dira, baina urak ere plastifikatzaile gisa joka dezake. (Bertuzzi eta Slavutsky, 2016; Nur Hanani et al., 2013). Estrusioaren kasuan, teknika hau jarraitua, eraginkorra, errendimendu handikoa eta kostu baxukoa da, industria-mailarako ezaugarri onuragarriak direnak. Proteinak estrusio-makinara elikatzen dira eta bertan gehitutako gehigarriekin nahasten dira (Koch et al.,

2017). Nahastea elikatze-zonaldean konprimitu egiten da, baina konprimitzea oratze-zonaldean handitzen da, bertan presio handiagoak aplikatzen direlako. Berokuntza-zonaldean, ebakitze-abiadura, temperatura eta presio altuenak lortzen dira, eta amaitzeko, produktua irteera zonaldeetik ateratzen da abiadura konstante batean (Bertuzzi eta Slavutsky, 2016). Torloju bakarreko edo bikoitzeko estrusio-makinak erabili daitezke materiala bultzatzeko eta osagaiak nahasteko (Bouvier eta Campanella, 2014). Estrusio prozesuan hainbat parametro kontrolatu behar dira (Emin et al., 2017), esate baterako estrusio-makinaren parametroak (torlojuen abiadura, upelaren temperatura, torlojuaren konfigurazioa, irteerako dimentsioak) eta prozesatze parametroak (hezetasun edukia, energia mekaniko espezifikoa, egonaldi-denbora) (Guerrero et al., 2012). Konpresioari dagokionez, filma eratzeko erabiltzen diren osagaiak nahasten dira eta nahastearen kantitate zehatz bat berotuta dauden bi xaflen artean jartzen da, presioa aplikatuz filma lortu arte (Tatara, 2017; Türe et al., 2012). Prozesuaren pauso bakoitzean erabiltzen diren parametroak (presioa, temperatura eta denbora) desberdinak izan daitezke erabiltzen den proteinaren arabera. Hala ere, prozesu honetan proteinan oinarritutako filmak denbora laburrean prestatzen dira. Injekzioa, filmak lortzeko beste manufaktura teknika bat da estrusio-makinatik lortutako materialak eraldatzeko erabilgarria dena. Teknika hau, presio handiak erabiliz, materiala berotutako molde batean injektatzean datza, eta proteina nahasteak forma jakin bat hartzen du. Hainbat molde erabili daitezke, hala nola, itxura errektangularrekoak edo kanpai itxurakoak (Bourny et al., 2017). Prozesu hau ziklikoa eta automatikoa da eta ziklo bakar batek segundo batzuk bakarrik iraun ditzake (Zema et al., 2012). Hori dela eta, industria-mailara erraz transferitu daiteke, ekipamendu eta molde handiak erabiliz. Hala ere, teknika hau, nahiz eta plastiko sintetikoak garatzeko erabiltzen den teknikarik arruntena izan, proteinan oinarritutako materialak garatzeko ez da asko erabili.

## **1.3 LANDARE PROTEINETAN OINARRITUTAKO FILM AKTIBOAK**

### **1.3.1 BIOAKTIBOEN ERAUZKETA TEKNIKAK**

Azken urteotan, iturri naturaletatik lortutako bioaktiboak erazteko prozesuak optimizatzeko ikerketa esponentzialki handitu da. Konposatu hauek giza-osasunean dituzten abantailak direla eta, material biopolimeriko berriak garatzeko aukera berriak sortu dira, hainbat teknikekin prozesatzen direnak eta ontziratze eta biomedikuntza aplikazioetarako ezaugarri egokiak dituztenak. Izan ere, bioaktiboak proteinak bezalako hainbat biopolimeroekin elkarrekintzak sortzeko gai dira, azkeneko produktua aktibitate antioxidatzailearekin edota antimikrobiarrarekin hornitzeko gai direlako (Chen et al., 2017; Lau et al., 2017; Yu et al., 2018). Bioaktiboen berreskuratze-prozesuan 5 dira jarraitzen diren pausoak: aurre-tratamendu makroskopikoa, mikro- eta makromolekulen bereizketa, erazketa, purifikazioa eta isolamendua, eta produktuaren formakuntza (Galanakis, 2015). Hauetatik, erazketa-prozesua pausorik garrantzitsuenetariko bat da. Horrela, erazketa-prozesu ugari aztertu dira konposatu hauek lortzeko. Disolbatzailearen bidezko erazketa bioaktiboak lortzeko teknikarik arruntena izan ohi da (Ballesteros et al., 2014; da Silva Haas et al., 2018; Gullón et al., 2017; Maniglia et al., 2014). Teknika hau, hainbat disolbatzailek eta tenperatura altuek duten erazketa ahalmenean oinarritzen da, sistemaren fase desberdinen arteko masa-transferentzia sustatuz (Daso eta Okonkwo, 2015). Hala ere, desabantaila nagusia disolbatzaile organikoen erabileran datza; izan ere, hauek giza-osasunerako eta ingurumenerako kaltegarriak izan daitezke. Gainera, prozesu honek energia eta denbora altuak erabiltzen ditu. Erabilitako baldintza gogorrek, konposatuaren degradazioa eragin dezakete (Khuwijtjaru et al., 2014; Setyaningsih et al., 2015). Horrela, ingurumenarekiko lagungarriak, seguruak, eta kostu-baxua duten tekniken garapena aurrera eramaten ari da, metodo arrunten desabantailak gainditzeko

asmoz. Testuinguru honetan, jariakin gainkritikoen eta azpikritikoen bidezko erauzketa, presiopeko erauzketa likidoa, mikrouhin bidezko erauzketa, eta ultrasoinu bidezko erauzketa aipatu daitezke, beste batzuen artean.

### **1.3.1.1 Jariakin gainkritikoen bidezko erauzketa (SFE)**

SFE gehien erabiltzen den teknika da eta jariakinen konpresioan datza. SFE teknika berdea da eta prozesatzea tenperatura baxuetan burutu daiteke, horrela, degradazio termikoa mugatuz, eta disolbatzaile toxikoak ekidinez. Erauzketa denbora motzagoak eta disolbatzaile organikoen erabilera mugatuak dira teknika honen beste abantailak. Gainera, lurrunkortasun gutxiko konposatu solido/likidoak berreskuratzeko erabilgarria da (Ameer et al., 2017; Santos et al., 2017). Erauzketa prozesua bi pausotan gertatzen da. Lehenengoan, disolbatzailea ohe konpaktu batetik pasatzen da matrizean dauden konposatuak disolbatzeko. Bigarreanean, berriz, disolbatzailea disolbaturiko konposatuak berarekin eramanez irteten da eta estraktuari disolbatzailea kentzen zaio presioa erreduzitzen edo/eta tenperatura handituz (da Silva et al., 2016). SFE jariakin gainkritikoak erabiltzeagatik ezagutzen da, zeinek bere puntu kritikoaren azpitik likidoa bezalako propietateak (azalera tentsio oso txikiak) baita gasak bezalako propietateak ere (difusio altuak eta biskositate baxua) erakusten dituen (Bubalo et al., 2018). CO<sub>2</sub> da gehien erabiltzen den jariakin gainkritikoa. CO<sub>2</sub> honek olioak, gantza eta argizariak bezalako konposatu ez-polarrak eta erdi-polarrak disolba ditzake, bere ezaugarri polarragatik (Al-Bulushi et al., 2018; da Silva et al., 2017; de Zordi et al., 2017). Jariakin hau, hexanoak eta heptanoak bezalako disolbatzaile organikoak ordezkatzeko gai da (Al-Hamimi et al., 2016). Testuinguru horretan, teknika honekin kinoa-olioaren erauzketa burutu zen, hexanoa eta CO<sub>2</sub>-a erabiliz. Autoreek ziotenez, CO<sub>2</sub>-ren erabileraren ondorioz, tokoferol kantitate altuagoak lortu ziren, eta horrela antioxidatzaile gaitasun handiago bat (Benito-Román et al., 2018).

Disolbatzaile nagusiaren hautatze selektiboa aldatzeko eta erauzketaren eraginkortasuna hobetzeko, disolbatzaile bat baino gehiago erabil daiteke. Modu horretan, azido oleikoen eta linoleikoen erauzketa CO<sub>2</sub> eta elikagaietan eta produkzio farmazeutikoetan erabiltzen diren 8 disolbatzaile organikoekin gauzatu zen (Tirado et al., 2018). Autoreek ondorioztatu zuten, bi azido koipetsu hauek erauzteko etanola eta metanola bezalako kate motzeko alkoholak hoberenak ziren. Beste autore batzuk, aldiz, SFE prozesuan disolbatzaile lagungarrien portzentajea eta presioa gehien eragiten duten faktoreak direla ondorioztatu zuten (Salazar et al., 2018).

### **1.3.1.2 Presiopeko erauzketa likidoa (PLE)**

PLE, SFE teknikarekin batera, hainbat iturri naturaletatik lortutako flabonoideak (Leyva-Jiménez et al., 2018), azido fenolikoak (Sánchez-Camargo et al., 2016) edo antozianinak (Feuereisen et al., 2017) bezalako fitokimikoak erauzteko teknika erabiliena da. Orokorrean, laginak sakabanatzaile batekin erauzketa-gelan konpaktatzen dira eta ondoren, denbora labur batean (5-20 min), temperatura (40-200 °C), presio (5-20 MPa) eta disolbatzaile (ura, etanola, etil laktatoa, etil azetatoa) egoki bat erabiliz erauzketa gauzatu daiteke (de Oliveira et al., 2018; Kovačević et al., 2018; Lores et al., 2015; Otero et al., 2018).

Metodo honen eraginkortasuna, masusta pulparen hondakinetatik lortutako polifenolen eta antozianinen erauzketarekin aztertu zen, eta temperatura eta disolbatzaile motaren eragina ikertu zen (Machado et al., 2015). PLE teknikaren bidez bioaktiboen berreskurapen handiena lortzeko baldintza egokienak etanol/ura nahasketa 100 °C-an aplikatzea izan zen. Disolbatzaile nahasketa berdinarekin, baina temperatura 137 °C-ra igoz, mirto hostoetatik konposatu fenolikoak erauzi ziren (Díaz-de-Cerio et al., 2018).

Azido galiko eta elagiko deribatuen kontzentrazio altuak aurkitu ziren, eta PLE teknikaren bidez konposatu fenolikoen erauzketa hobetzen zela ondorioztatu zen.

PLE beste metodoekin ere konparatu egin da. Zentzu horretan, PLE teknikaren bidez erauzitako *Thymus munbyanus* estraktuaren aktibitate antioxidatzailea altuagoa zela ikusi zen, SFE-CO<sub>2</sub> teknikaren bidez erauzitako estraktuaren aktibitatearekin konparatuz (Monteiro et al., 2018). PLE izan zen arrain-industriako azpi-produktu likidoetatik  $\omega$ 3 gantz-azido poliinsaturatuetan aberatsak ziren lipidoen errendimendu altuena lortu zuena. Gainera, bizi-zikloaren analisiaren (LCA) bidez, prozesu hau egokiena zela ikusi zen ingurumen inpaktu eta produkzio kostua baxua zela eta.

Ura erauzketa-disolbatzailea bakarra denean, PLE ur azpikritikoen bidezko erauzketa, presiopeko ur beroaren erauzketa, edo ur gainberotutako erauzketa izan daiteke. Metodo hauetan, uraren temperatura 200 °C-tik 350 °C-ra handitzen da, horrela, konstante dielektrikoa 20-30 ingurura txikitzen da, hau ohiko erauzketetan giro temperaturan erabiltzen diren metanol, etanol eta azetona disolbatzaileen konstantea bezalakoa da (Bodoira et al., 2017). Teknika hauek erabiliz polaritate baxua eta ertaina duten konposatu asko disolbatu egiten dira (Erşan et al., 2018; Luo et al., 2018a; Vardanega et al., 2017). Ur azpikritikoaren erauzketak presio altuko ponpa bat erabiltzen du disolbatzailea erauzketa-gelara bultzatzeko, zeina labe batean mantentzen den, alde batetik, temperatura kontrolatzeko, eta bestetik, presioa kontrolatzeko hainbat balbula eta murriztaileekin. Disolbatzailea kontrolatzeko balbulak, nitrogenoa purgatzeko lerroak, erauzketa-gela eta automoziorako erretiluak gainontzeko atal batzuk izan daitezke (Herrero et al., 2015).



### 1.3.1.3 Ultrasoinuen bidezko erauzketa (UAE)

UAE asko erabiltzen den beste teknika bat da, batzuekin konparatu egiten badugu erabiltzeko erraza delako, erabilera anitzak dituelako eta inbertsio-kostu baxuak behar dituelako. UAE-ko mekanismo nagusia, kabitazio akustikoaren fenomeno da ultrasoinuen eta nahasketa mekanikoaren efektua eragiten duena. Prozesu guzti hauek, zelulen apurtzea, disolbatzailearen penetrazio handia eta partikulen neurri murrizketa eragiten dituzte, erauzketaren eraginkortasuna handituz eta erauzketa-denbora txikituz (Pena-Pereira et al., 2017). Ultrasoinuen efektu fisikoak frekuentzia baxuekin (20-100 kHz) lotuta daude, efektu kimikoak, berriz, frekuentzia altuekin (200-500 kHz) (Tiwari et al., 2015).

Bioaktibo konposatuen aktibitate biologikoa UAE baldintzen arabera da, tenperatura, disolbatzaile mota eta erauzketa-denboraren arabera, esate baterako (Alonso-Carrillo et al., 2017). Disolbatzailearen aukeraketari dagokionez, metabolitoen disolbagarritasuna, likatasuna, azalera-tentsioa eta disolbatzailearen lurrun presioa bezalako parametroak garrantzitsuak dira. Parametro horiek, kabitazio akustikoaren fenomeno eragin dezakete; izan ere, UAE teknikan lurrun presio baxua duen disolbatzailea nahiago da, kabitazioaren burbuilen kolapsoa biziagoa delako, lurrun presio altua duten disolbatzaileekin konparatuta (Chemat et al., 2017).

Hainbat konposatuen erauzketarako erabili da teknika hau (Al-Dhabi et al., 2017; Luo et al., 2018b; Pudziuvelyte et al., 2018). Testuinguru horretan, ultrasoinu bidezko erauzketa okra polisakaridoaren erauzketa-errendimendua optimizatzeko aukeratu zen (Wang et al., 2018a). Erauzketa-baldintza optimoetan (59 °C, 30 min, eta 522 W), polisakaridoaren erauzketa-errendimendua  $10.35 \pm 0.11\%$  izan zen iragarritako balioekin bat eginik. UAE teknika erabiliz uretan disolbagarriak diren polisakaridoak ere

erauzi ziren lehortutako eta ehotutako onddoen produkzioaren azpiproduktuetatik (Aguiló-Aguayo et al., 2017). Teknika hau *Limonium sinuatum* loreetatik antioxidatzaile naturalak erauzteko ere erabili zen (Xu et al., 2017), baita biomedikuntza aplikazioetan asko erabiltzen den kurkumina *Curcuma amada*-tik erauzteko ere (Shirsath et al., 2017).

Teknika honen aplikazioan, konposatuak erauzteko UAE protokoloak energia sarrera desberdinekin aplikatu daitezke, eta katekinaren erauzketaren hautatze dependentzia UAE protokoloa aplikatu ostean frogatu daiteke (Wang et al., 2018b). Izan ere, ultrasoinuen energia espezifikokoaren sarreraren handitzeak, katekinaren amaierako kontzentrazioaren handitzea eragin zuela zehaztu zen, eta ondorioz fenoliko totalen kantitatea handitu zen. Ultrasoinuaren erauzketa-mekanismoak hainbat efektuen konbinaketa kontuan hartzen ditu, esate baterako, zatitzea, higadura, sonokapilaritatea eta destesturazioa. Gainera, efektu hauen jarrera desberdina izan daiteke mamiaren egituraren eta azalaren ehunen arabera, ura xurgatzeko ahalmenaren eta berriro hidratazioaren arabera, eta ehunaren barruan konposatu fenolikoen banaketaren arabera.

#### **1.3.1.4 Mikrouhin bidezko erauzketa (MAE)**

Elikagaietatik bioaktiboak erauzteko MAE beste aukera egoki bat izan daiteke (Ho et al., 2015; Valdés et al., 2015). Teknika honek mikrouhinen energia zuzenean erabiltzen du materialaren barne-egituraren dauden molekulak berotzeko, horrela, barne-presioa handituz eta analitoen zatiketa laginetatik disolbatzailera erraztuz (Ince et al., 2014). Ohizko erauzketa teknikekin konparatuz, erauzketa-denboran murrizketa esanguratsua lor daiteke. Ura, etanola, metanola edo hauen konbinaketa disolbatzaile gisa erabili ohi dira (Alara et al., 2018; Setyaningsih et al., 2015).

MAE-ren abantailak duela gutxiko lanetan ikusi dira. SFE teknikarekin eta erauzketa eta zatiketa hidroalkolikoarekin konparatuz, *Thymus algeriensis* belarraren

konposatu fenolikoaren errendimendua esanguratsuki handitu zen MAE erabili zenean (Boutaoui et al., 2018). Bestalde, MAE erabiliz *Pleurotus ostreatus* eta *Ganoderma lucidum* fruituetatik biologikoki aktiboa den  $\beta$ -glukanoaren erauzketaren eraginkortasuna aztertu zen (Smiderle et al., 2017), baita polifenolen isolatzea sagar zuhaitzaren egur hondakinetatik ere (Moreira et al., 2017). Gainera, MAE erabilia, *Myrtus communis* hostoetatik polifenolen erauzketa egiteko erauzketa-denborak 14 eta 15 aldiz baxuagoak direla ikusi zen, UAE eta ohizko erauzketa metodoak erabilia baino, hurrenez hurren (Dahmoune et al., 2015).

Mikrouhin hidrodifusio eta grabitate metodoek, landarearen barneko ura erabiltzen dute bakarrik, disolbatzailerik erabili gabe. Hau ohizko MAE metodoaren alternatiba da. Metodo hau, materialaren barneko ura berotzean datza, landare zelula apurtuz eta bioaktibo konposatuaren askapena sustatuz. Mikrouhin hidrodifusio eta grabitate metodoa tresna baliagarria da *Lettuce sativa* landaretik ez-degradagarriak diren polifenolen erauzketa egiteko laborategi eskalan baina baita eskala handiko errektore pilotu batean ere, biomasa hondakinen izugarritzko murrizketa eragin dezakeena (Périno et al., 2016). Metodo hau zitrikoen azaletatik olio esentzialak isolatzeko erabili zen (Boukroufa et al., 2015). Autoreek denbora laburrean baliozko konposatuak lortu zituzten eta sistema itxi bat egitea lortu zuten landareetatik eratorritako baliabideak bakarrik erabiliz. Horrela, denbora eta energia aurrezteko, metodo garbiago bat erabiltzea eta erabilitako ur kantitatea murriztea lortu zuten.

Mikrouhin bidezko hidrodestilazioa eta disolbatzailerik erabiltzen ez duen mikrouhin erauzketa, ohizko MAE metodoaren beste bi alternatiba dira. Hauek olio esentzialak lortzeko azkarrak eta eraginkorrak direla frogatu zen (Jeyaratnam et al., 2016; Kusuma et al., 2018). Gainera, bi metodo hauek, teknika berde gisa definitu daitezke

ikuspuntu energetiko batetik, eta horrela, olio esentzialen erauzketa eskala handian egiteko proposatu ziren (Golmakani et al., 2015).

### **1.3.1.5 Tekniken konbinaketa**

Metodo bakoitzaren abantailak aprobeztatuz, teknika desberdinen konbinaketa aztertu zen bioaktiboen erauzketa eraginkorragoa lortzeko. UAE eta MAE tekniken erabilera, etorkizun handiko konbinaketa izan daiteke (Albuquerque et al., 2017; Chan et al., 2017; Liew et al., 2016; Lu et al., 2017; Pongmalai et al., 2015; Wang et al., 2018c). Adibidez, mikrouhin-ultrasoinu bidezko erauzketa diseinatu egin zen piper beltzetik piperina isolatzeko. Metodo konbinatu honekin errendimendu hobeak lortu ziren (46,6 mg piperina/g piperra), Soxhlet (39,1 mg/g), mikrouhinen (38,8 mg/g) eta ultrasoinuen (37,0 mg/g) bidezko erauzketetan lortutako errendimenduekin konparatuz (Gorgani et al., 2017).

Ultrasoinuen teknika PLE-rekin batera ere erabili zen. Konbinaketa hau granada azaletik erauzitako konposatu fenoliken kantitatea handitzeko aztertu zen (Sumere et al., 2018). Autoreek frogatu zuten konbinaketa hau alternatiba eraginkorra eta berdea izan zitekeela, izan ere, disolbatzaile organikoen erabilera urarekin ordezkatzeko delako, erauzketa-denbora murrizten delako, tenperatura baxuak erabiltzen direlako eta oztopo arazorik ez daudelako. Antozianinak masustetatik, ahabetatik eta grimixama hondakinetatik lortzeko ere erabili zen teknika hau (Machado et al., 2017). PLE eta mikrouhinen konbinaketak ere abantaila asko izan ditzake. Adibidez, orburuen kanpoko brakteatik karbohidrato bioaktiboak (inositolak eta inulina) erauzi ziren modu eraginkorrean (Ruiz-Aceituno et al., 2017).

SFE-CO<sub>2</sub> eta PLE etanolarekin konbinatzen zituen ekipoa diseinatu zen kakao aletik antioxidatzaileak lortzeko (Mazzutti et al., 2018). Bestalde, aktibitate biologiko

handia duen *Phaeodactylum tricornutum* algatik fukoxantina erauzi zen PLE teknologia erabiliz. Bioaktibo hau antioxidatzailea, antigizentasuna, antidiabetikoa, antihantura, antizahartze fotoikoa eta antikartzinogenoa da (del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2017). Fukoxantinaren berreskurapena %50 ingurukoa izan zen, horrela erauzketa jarraitua diseinatu zen jariakin gainkritikoa CO<sub>2</sub>-rekin erabiliz, berreskurapen portzentajea handitzeko.

Metodo berri hauek gauzatzen dituzten abantailez gain, oraindik industria-mailara pasatzeko ikerketa gehiago egin behar dira bere bideragarritasun ekonomikoa aztertzeko. Hori dela eta, etapa anitzeko eta etapa bakarreko prozesuen ebaluazio ekonomikoa egin zen (Viganó et al., 2017). Emaitzek erakutsi zutenez, bi metodoak industria-mailara pasatzeko ekonomikoki bideragarriak izan daitezke, prozesuaren produktibitatea handitu eta manufaktura kostua txikitzen direlako. Malageta piperretatik SFE teknikaren bidez lortutako oleoresinaren produkzioaren azterketa ekonomikoa egin zen (de Aguiar et al., 2017). Proposatutako baldintzetan (15 MPa eta 40 °C) manufaktura kostua 125 US\$/kg-koa zen, estraktu komertzializatzeko kalkulaturako prezioa (223 US\$/kg) baino baxuagoa zena. Horrela, SFE teknikaren bidez lortutako oleoresinaren produkzioa industria-mailan bideragarria izan daiteke. Hori guztia dela eta, proteinetan oinarritutako produktuak bioaktiboen garraio gisa erabil daitezke, ontziratze eta biomedikuntza aplikazioetan material berrien garapenean aukera berriak sortuz.

### **1.3.2 LANDARE PROTEINAK FILM AKTIBOEN GARAPENERAKO**

Biologikoki aktiboak diren konposatu hauen gehikuntzak proteinetan oinarritutako filmen formulazioan, filmen propietateak hobetzen ditu. Hainbat landare iturritik lortutako proteinak erabili dira, konposatu hauekin batera, hainbat

aplikazioetarako; horrela, polimero sintetikoen alternatiba bihurtu dira. Soja-proteina, zeina eta gari-glutena hauen adibide batzuk izan daitezke.

### **1.3.2.1 Soja-proteina**

Soja-proteina soja-olioa lortzeko erabiltzen den sojatik erauzten da. Estatu Batuetako Nekazaritza Sailaren arabera, soja produkzioa 2018 eta 2019 urteetan 370 miloi tonakoa izan zen mundu osoan (USDA, 2018). Horren ondorioz, baliabide hau ugaria, eskuragarria eta kostu baxukoa da. Soja-olioaren erauzketan, soja irina (SF), soja-proteina kontzentratua (SPC) eta soja-proteina isolatua (SPI) bezalako azpi-produktuak lortzen dira (Preece et al., 2017). Hiru produktu hauek proteina kontzentrazioan desberdintzen dira: SF-ak proteina kantitate baxuena du, %40-60 inguruan, eta gantzak eta karbohidratoak ditu; SPC-ren %60-70 inguru proteina da, %8-15 polisakarido frakzioa, zelulosaz eta pektinaz osatua, eta gantza (%1), fibra (%1-3) eta errautsa (%3-5) ere badauzka; SPI-ren proteina kantitatea %90 ingurukoa da (Ciannamea et al., 2014). Proteina kantitate altuagatik, berritasunagatik, biodegradagarritasunagatik eta ugaritasunagatik, SPI elikagaiak ontziratzeke aplikazioetan erabiltzeko hautagai egokia da (Božič et al. 2015; Garrido et al., 2014). Material hauek baldintza batzuk bete behar dituzte elikagaien kalitatea eta segurtasuna bermatzeko. Horrela, hezetasunarekiko hesi-propietateak, oxigeno xurgapena, lipidoen oxidazioa eta zapora eta aroma hegazkorren galera kontrolatu behar dituzte, propietate mekaniko onak eduki behar dituztela ahaztu gabe (González et al., 2015). Arrazoi horiengatik, ikerketa-lan asko egin dira baldintza guzti hauek betetzen dituzten materiak sortzeko helburuarekin.

Plastiko sintetikoekin konparatuta, SPI filmek propietate mekaniko eta hezetasunarekiko erresistentzia baxuagoak dituzte; horren ondorioz, SPI aldatzeko hainbat metodo ikertu dira, propietate horiek hobetzeko asmoz. Metodo hauen artean,

substantzia naturalekin nahastea (Pan et al., 2014; Wang et al., 2014), saretze kimikoa (Jiang et al., 2017; Xu et al., 2015), prozesatze-metodo desberdinen erabilera (Garrido et al., 2016), eta tratamendu entzimatiakoak (Meinlschmidt et al., 2016) azpimarratu daitezke.

Proteina, polisakarido, lipido edo beste substantzia natural batzuen gehikuntza aztertua izan da, konposatu bakoitzaren eta beraien artean sortzen diren sinergiaren abantailak aprobetxatu daitezkeelako. Modu horretan, SPI-n oinarritutako filmen eta geruzen propietateak hobetu daitezke eta funtzionalitate berriak sustatu. Bai eta lankideek (2013) SPI-n oinarritutako filmetan gelatinaren gehikuntza aztertu zuten. Emaitzetan ikusi zenez, tentsio-erresistentzia, haustura-elongazioa eta uraren kontaktu angelua handitu egin ziren; gainera, ur lurrunaren transmisio abiadura txikitu egin zen. Polisakaridoen gehikuntza ere kontuan hartu izan da. Sui eta lankideek (2016) guam goma gehitu zuten SPI filmetan, barne-molekular elkarrekintza sendoak zirela eta sarearen trinkotasuna handituz. Ondorioz, SPI filmek trakzio eta ur erresistentzia handiagoak zituzten, eta argiarekiko hesi-propietate hobeak. Almidoiaren gehikuntza ere aztertu izan da. Almidoiaren nanokristalek SPI filmen trakzio-erresistentzia eta modulu elastikoa hobetu zituzten, bi osagaien arteko kohesio handiagatik film zurrunagoak lortuz. Gainera, disolbagarritasuna, xurgatzeko ahalmena eta ur lurrunarekiko iragazkortasuna txikitu ziren (González eta Igarzabal, 2015). Propietate mekanikoei dagokienez, SPI filmetan manioka almidoia (Chinma et al., 2012) edo almidoi patata oxidatua (Galus et al., 2013) gehitu zenean antzeko joera ikusi zen. Modu berean, Hopkins eta lankideek (2015) SPI eta liho-olioa nahastu zituzten hezetasun eduki baxuko, ura xurgatzeko gaitasun gutxiko eta sendotasun handiko filmak garatzeko.

Gehitutako konposatuek saretze errektibo gisa ere joka dezakete. Xia eta lankideek (2015) ingurumenarekiko lagungarria den epoxidatutako soja-olioa erabili zuten saretze errektibo gisa, tratatu ez ziren filmekin konparatuz tentsio-erresistentzia balioak %140 batean eta modulua %696 batean hobetuz. Friesen eta lankideek (2015) berriz, rutinaten gehikuntzak ur lurrunarekiko iragazkortasuna txikitzen zuela eta erresistentzia handitzen zuela zehaztu zituzten.

Bestalde, hainbat autorek soja-proteina filmek garraiatzaile gisa erabiltzeko duten eraginkortasuna frogatu dute: antioxidatzaile diren gaztaina estraktua (Wang et al., 2016), taninoak (Wang eta Wang 2017) edo katekina (Han et al., 2015) garraiatzeko, baita agente antimikrobiarrak diren timol (antibakterianoa) eta natamizina (antifungikoa) garraiatzeko ere (González eta Igarzabal, 2013). Antozianinetan aberatsa den mugurdi gorria (Wang et al., 2012), mango haziaren estraktua (Adilah et al., 2018) edo erregaliz hondakinaren estraktua (Han et al., 2018) bezalako estraktu naturalek edo bioaktiboek, filmen propietateetan eragin dezakete, eta aktibitate antioxidatzailea edo antimikrobiarra hobetu, gehitutako konposatuaren arabera. Adibidez, mango haziaren estraktuaren gehikuntzak SPI filmen trakzio-erresistentzia hobetu zuen eta haustura-elongazioa eta disolbagarritasuna uretan txikitu zituen; erregaliz hondakin estraktuaren 70 g/kg proteinarekiko baino kantitate txikiagoak erabili zirenean, propietate mekanikoak, zein urarekiko, oxigenoarekiko eta argiarekiko hesi-propietateak hobetu ziren. Gainera, fenoliken guztizko edukiak simulatzaile urtsu (%10 etanola) eta oliotsuan (%95 etanola) neurtu ziren. Emaitzek erakutsi zuten, estraktuaren gehikuntzak konposatu fenoliken askatzea handitu zuen, simulatzaile alkoholikoan 4,0-5,6 mg azido galiko/g filma eta simulatzaile oliotsuan 2,2-5,5 mg azido galiko/g filma lortuz. Echeverría eta lankideek (2016) iltze EO-a gehitu zuten montmorillonitarekin indartutako SPI filmetan. EO honek propietate antioxidatzaile eta antimikrobiar garrantzitsuak hornitzeaz gain,



plastifikatzaile efektua ere badu. Gainera, nanobuztinak sendotasun efektua sustatzen du iltze EO-a duten filmetan; 10 g montmorillonita/100 g SPI duten nanokonposite filmetan, aldiz, trakzio-erresistentzian %105eko hazkuntza eta Young moduluan %200ekoa lortu ziren. Iltze EO zuten filmen aldakuntza handiagoa zen (%230 eta %345, hurrenez hurren).

Azido ferulikoa, kafeikoa, galikoa eta karbakrol azidoa bezalako konposatu fenolikoak ere, arrakastaz erabili dira SPI filmetan. Orokorrean, azido fenolikoek efektua bi ezaugarri desberdinez kontrolatzen da: proteinen karboxil taldeen eta amino taldeen arteko hidrogeno loturak edo beste elkarrekintza batzuk eratzeko gaitasunarekin, eta beraien urarekiko afinitatearekin, zeinek ur absortzio altua eragiten duten (Ganiari et al., 2017). Otoni eta lankideek (2016), karbakrola eta zinamaldehidoa gehitu zituzten eta filmen sendotasunaren handitzea sustatu zuten. Insawars eta lankideek (2015), berriz, azido feruliko, kafeiko eta galikoen eta beren produktu oxidatuen eragina aztertu zuten. Azido galikoa zuten filmek trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazio balio altuenak erakutsi zituzten. Gainera, oxidatuak ez zeuden produktuekin konparatuz, azido fenoliko oxidatua zuen filmak trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazio balio altuagoak erakutsi zituen. Bestalde, konposatu fenolikoak zituzten filmek, ur lurrunarekiko iragazkortasun eta disolbagarritasun balio txikiagoak, eta kontaktu angelu handiagoak, azaldu zituzten. Amaitzeko, Ciannamea eta lankideek (2016), mahats gorrien estraktu kantitate desberdinak gehitu zituzten (%0-10 w/w) eta hiru pausoko termo-kompresioa erabili zuten filmak garatzeko: 150 °C-an 5 minutuz 10 kg/cm<sup>2</sup> presiopean, 150 °C-an 2 minutuz 100 kg/cm<sup>2</sup> presiopean, eta hoztea 30 °C-an 30 minutuz 100 kg/cm<sup>2</sup> presiopean. Emaitzek erakutsi zutenenez, soja-proteinan gehitutako estraktuak haustura-elongazioa txikitu zuen eta modulu elastikoa handitu. Gainera, estraktuaren %5eko gehikuntzak filmen aktibitate antioxidatzailea hobetu zuen, DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitatea %58tik %81ra igo baitzuen, mahats gorrian dauden katekin, epikatekin eta prozianidin

konposatu fenoliken ondorioz. Ikusi zenez, estraktuaren kantitate altuago batek (%10 w/w) ez zuen aktibitate antioxidatzailean eragiten.

Soja-proteinan oinarritutako filmek eta geruzek elikagaien iraungitzea luzatzeko onura asko dituztela frogatu dute hainbat ikerkuntza lanek. Onura garrantzitsuenen artean aurki daitezke oxidazioaren eta dekolazioaren murrizketa, zaharmintasunaren atzerapena, mikrobioen kutsaduraren inhibizioa edo murrizketa, hezetasun galeraren prebentzioa eta zaporea ematen duten konposatuen galera. SPI filmek eta geruzek okelean, arrainean, fruituetan, barazkietan eta beste elikagai batzuetan erabiltzeko duten potentziala azpimarratu duten lan batzuk **1.2. taulan** agertzen dira.

### 1.2. taula. SPI-an oinarritutako filmak edo geruzak elikagaiak ontziratzeko.

| Agente aktiboa                   | Gehigarriaren eginkizuna* | Erabilitako elikagaia | Prozesatze-metodoa | Erreferentzia                 |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------|
| Iltze EO                         | AM<br>AO                  | Atuna                 | Soluzioa           | Echeverría et al., 2017       |
| Nisina<br>Sodio laktatoa<br>EDTA | AM                        | Txerria               | Soluzioa           | Liu et al., 2017b             |
| Zinamaldehidoa<br>Eugenola       | AM                        | Txerria               | Soluzioa           | Zhang et al., 2013            |
| Timeo EO<br>Oregano EO           | AM                        | Behikia               | Soluzioa           | Yemiş eta Candoğan, 2017      |
| Timeo EO<br>Oregano EO           | AO                        | Behikia               | Soluzioa           | Coşkun et al., 2014           |
| Zitral<br>Limoneno               | AM                        | Persiako lima         | Estaldura          | González-Estrada et al., 2017 |
| Azido ferulikoa                  | AO                        | Sagarra               | Soluzioa           | Alves et al., 2017            |
| Zitronela EO                     | AM                        | Banana                | Soluzioa           | Arancibia et al., 2014        |
| Kanela olioia                    | AM                        | Tofu lehorra          | Soluzioa           | Liu et al., 2014              |
| Katekina                         | AO                        | Intxaurra             | Estaldura          | Kang et al., 2013             |

\*AO = antioxidatzailea

\*AM = antimikrobiarra

Fruituen eta barazkien kalitatea luzatzeko estrategiek, hainbat erronka garrantzitsu dituzte: deshidratazioa minimizatu, mikrobioen hazkuntza murriztu edo ekidin eta heltze eta seneszentzia denboraldia luzatu. SPI filmetan kitosanoaren eta azido estearikoaren (Wu et al., 2017c) eta azido ferulikoaren gehikuntzak (Alves et al., 2017) sagarren iraungitzea luzatzen du eta filmen propietateak hobetzen ditu. Beste ikerketa lan batean,

Arancibia eta lankideek (2014) erakutsi zuten lignina eta SPI filmetan %3 zitronela EO-a gehitzean, mikroorganismo patogenoen kontra (*Fusarium oxysporum*) aktibitate antifungiko ona azaltzen zela bananatan aplikatuz gero. SPI geruzek zitral eta limonenorekin limaren kalitatea kontserbatzen zuten eta *Penicillium italicum* mikroorganismoaren kontrako propietate antifungikoak sustatzen zituzten (González-Estrada et al., 2017). Beste gehigarri batzuk, zisteina (Ghidelli et al., 2014; Ghidelli et al. 2015), azido lauriko eta alginato propilenglikola bezalakoak (Zeng et al., 2013), SPI geruzetan erabilia marroizte entzimatikoa murrizten zuten eta orburuen, berenjenen eta jujuben kalitatea hobetzen zuten. Kalitatea galdu izanaren erakusle diren beste efektu batzuen prebentzioa ere garrantzitsua da, hala nola, haragi, arrain eta hegazti produktuen txikiagotzea, zapoaren oxidazioa, kutsadura mikrobiarra eta dekolorazioa. Echeverría eta lankideek (2017) hoztutako atun xerren kontserbaziorako soja-proteina/montmorillonita/iltze EO filmak erabili zituzten. Ikusi zenez, SPI-n oinarritutako filmek *Pseudomonas* hazkuntza eta lipidoen oxidazioa murrizten zituzten. Gainera, montmorillonitak iltze EO-ren askapena sustatzen zuen, atunaren iraungitzea luzatuz. SPI geruzek ere, haragia kontserbatzeko eraginkortasuna erakutsi zuten behi haragian lipidoen oxidazioa eta kolorearen hondapena atzeratuz eta itxura parametroak mantenduz (Guerrero et al., 2015). Behi haragiari ere SPI eta timeo eta oregano EO-en estaldura aplikatu zitzaion. Yemiş eta Candoğan (2017) dagokienez, soja-proteina geruzek aktibitate antimikrobiarra erakutsi zuten *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* eta *S. aureus*en kontra. Gainera, Coşkun eta lankideek (2014) konfirmatu zuten, bi olio esentzial horien gehikuntzak, lipidoen oxidazioa kontrolatzen zuela behi xerretan. Zinamaldehido eta eugenola (Zhang et al., 2013) edo nisina, sodio laktatoa eta EDTA bezalako bioaktiboek ere, *S. aureus*, *Pseudomonas* eta *legamiaren* hazkuntza inhibitzen zuten; izan ere, zinamaldehidoa eraginkorra izan zen. %6 EO zuten filmek

kontserbazio efektua erakutsi zuten txerrian. SPI filmetan nisina, sodio laktatoa eta EDTA gehitu zirenean, txerriaren iraungitzea 3-6 egunetan luzatu zen, efektu esanguratsua erakutsi zelako elikagaien hiru patogenoetan: *E. coli*, *Salmonella* eta *Bacillus cereus*.

### 1.3.2.2 Zeina

Zeina ontziratze aplikazioetan erabiltzen den proteina da, izan ere, beste proteinez egindako film batzuekin konparatuz gero ur lurrunaren transmisioaren eta konposatu hegazkorren kontrako hesi-propietate hobek ditu (Ozcalik eta Tihminlioglu, 2013). Gainera, zeinak filma eratzeko gaitasun bikaina dauka, zeinaren kateen artean lotura hidrofobo, eta hidrogeno eta disulfuro loturen arteko garapena eragiten dela pentsatzen baita (Bourtoom, 2008). Biopolimero hau artoan aurkitzen den eta hidrofoboa den biltegitratze proteina gisa defini daiteke. Disolbagarritasunean eta sekuentziaren homologian oinarrituta,  $\alpha$ -zeinan (19 eta 22 kDa),  $\beta$ -zeinan (14 kDa),  $\gamma$ -zeinan (16 eta 27 kDa) eta  $\delta$ -zeinan (10 kDa) banatu daiteke.  $\alpha$ -zeinak  $\alpha$ -helize kantitate handia du eta unitate errepikakor homologoez osatuta dago (Zhang et al., 2015b); gainera, zeinaren masaren frakzio totalaren %70-85 osatzen du.  $\gamma$ -zeina, berriz, bigarren frakzio ugariena da (%10-20).

Beste proteina batzuekin gertatzen den bezala, hauskortasuna da zeinaren desabantailarik handiena. Plastifikatzaileen gehikuntzak hauskortasun hori murrizten laguntzen du (Xu et al., 2012), baina beste konposatu naturalekin nahastea bestelako irtenbide bat izan daiteke. Zeina eta gliadina etanol urtsuan disolbagarriak direnez eta filmak eratzeko gaitasun ona daukatenez, bi proteina hauek erabiliz Gu eta lankideek (2013) filmak prestatu zituzten. Gliadinaren gehikuntzak zeina filmen haustura-elongazioa hobetu zuen,  $\alpha$ -helizea eta  $\beta$ -bira egituren edukia handitzen zuelako eta  $\beta$ -lagina egitura, aldiz, txikitzen zuelako. Cheng eta lankideek (2015) zeinan oinarritutako

film aktiboak prestatu zituzten kitosano, konposatu fenoliko (azido ferulikoa edo azido galikoa) eta azido dikarboxilikoarekin (azido adipikoa edo azido sukinikoa). *S. aureus* eta *E. coli*-ren kontrako aktibitate antimikrobiarra frogatu zen, eta aktibitate antioxidatzailea DPPH eta ABTS erradikalak ezabatzeko metodoekin konfirmatu zen. Gainera, kitosanoa transglutaminasarekin glikosilatutako zeinarekin batera erabiliz, txerrikietan lipidoen oxidazioa murrizteko eraginkorra zela ikusi zen, horrela, glikosilazio entzimatikoa zeinaren propietate funtzionalak aldatzeko hurbiltze berri bat izan daitekeela esan daiteke (Wang et al., 2017c).

Beste autore batzuk saretze estrategia erabili dute zeina filmen propietateak hobetzeko. Khalil eta lankideek (2015) anhidrido sukzinikoa, eugenola eta azido zitrikoa erabili zituzten saretze agente natural gisa. Saretutako filmek antibakterio-aktibitate ona erakutsi zuten *B. cereus* ATCC 49064 eta *Salmonella enterica* ATCC 25566-ren kontra. Hala ere, saretze erreaktibo hauek filmen propietate funtzionalak hobetzeko ere gehitu ziren kimikoki eraldatutako zeinan; izan ere, konposatu hauen gehikuntzak 2-3 aldiz handitu zituen trakzio-erresistentzia balioak. Bestalde, Santos eta lankideek (2017) zeina saretzeko azido tanikoaren forma oxidatuaren gehikuntza ebaluatu zuten. Ondorioztatu zutenez, azido tanikoaren edukia eta pH balioa geroz eta altuagoa izanda, filmen propietate fisiko hobeak lortzen dira.

Orokorrean, zeinarekin lan egiteko abantaila nagusia bere hidrofobizitatea da, izan ere, konposatu antimikrobiar naturalekin bateragarria izatea eragiten du (Yemenicioğlu, 2016). Konposatu antimikrobiar naturalak kontserbagarri sintetikoen alternatibak dira eta hauen erabilera izugarri handitzen ari da. Testuinguru horretan, efektu antimikrobiarra duten zeina filmak garatzeko agente natural hauek erabili dira. *Z. multiflora* Boiss. *Lamiaceae* familiakoa den timeo bezalako landareak, karbakrola eta

timola ditu bere konposatu antimikrobiar nagusi. Kashiri eta lankideek (2017a) eta Moradi eta lankideek (2016) zeina filmetan bi EO hauen gehikuntzak aztertu zituzten. Autore hauek *Z. multiflorak* *L. monocytogenes* eta *E. coli*-ren kontra duen propietate antimikrobiar ona baieztatu zuten, baita konposatu hauen propietate antioxidatzaile onak ere. Gainera, Kashiri eta lankideek (2017b) *Z. multiflora* EO gehikuntzak filmetan haustura-elongazioa portzentaje handitze bat gauzatzen zuela frogatu zuten. Alkan eta Yemenicioğluek (2016) karbakrol eta timol EO-en erabilera aztertzeaz gain, zeina filmetan eugenola eta zitrala bezalako EO aztertu zituzten, baita azido galiko, banilliko eta zinamiko bezalako azido fenoliko batzuk ere, eta iltze, oregano, orburu zurtoin eta intxaur oskoletatik lortutako estraktu fenolikoak. Konposatu antimikrobiar hauen gehikuntzak zeina filmetan landare patogenoen aurkako emaitza positiboak erakutsi zituen, hala nola, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas vesicatoria* eta *Pseudomonas syringae*-ren kontra. Gainera, autore hauek ondorioztatu zuten, konposatu fenolikoak dituzten zeinan oinarritutako filmek, fruitu freskoetan eta barazkietan onurak izan ditzaketela, izan ere, uzta ondoren, bakterioen hazkuntza atzeratzen dute.

Lan batzuek aztertu dute zeina filmek produktu freskoetan duten eraginkortasuna. Ünalan eta lankideek (2013) Kashar gaztan frogatu zuten lisozima eta lisozima/konposatu fenoliken (katekina eta azido galikoa) nahastearen askapena zeina eta zeina-argizari konposite filmetan. Lisozima zuten filmek *L. monocytogenes*-en hazkuntza saihestu zuten 8 astez 4 °C-an gordetako gaztan. Hala ere, etengabeko lisozima askapen ratioak zituzten zeina-argizari filmek bakarrik gauzatu zuten murrizketa esanguratsua hasierako mikrobio karga inokulatuta zuten gazta laginetan. Katekinaren eta azido galikoaren nahasteak filmen *in vitro* efektu antimikrobiarra hobetu zuen *L. monocytogenes*-en kontra, baina efektu antimikrobiar hau ez zen esanguratsua izan gaztan aplikatzerakoan. Beste lan batean (Chen et al., 2016), zamo arrunta arrain-bolak hexadentato 3-hidroxiipiridinones

zuen zeinarekin estali ziren. Lan honetan frogatu zenez, geruza honek arrain-bolen propietate sensorialak modu eraginkorrean hobetzen ditu bere freskura mantenduz; izan ere, mikrobioen hazkuntza inhibitzen da eta proteinaren deskonposizioa eta lipidoen oxidazioa atzeratzen dira produktua biltegitratzen den bitartean. Mehyar eta lankideek (2014) Berhi fruituak estali zituzten jangarriak diren hainbat materialekin. Emaitzek erakutsi zuten, zein oinarritutako geruzak fruituen heltzea 7 egunetik 14 egunetara atzeratu zuen.

### 1.3.2.3 Gari-glutena

Gari-glutena biltegitratze proteina bat da, gari-irinatik lortutako almidoiaren isolamenduaren prozesuan azpi-produktu gisa lortzen dena (Day, 2011). Proteina hau bi proteina nagusiz osatuta dago, gliadinaz eta gluteninaz. Hauek bere disolbagarritasun maila alkohol urtsuan eta disulfuro lotura barne-molekularrak eratzeko gaitasunean desberdintzen dira (Zubeldía et al., 2015). Gliadinak monomeroak dira, gluteninak, berriz, polipeptido azpi-unitatez osatuta dauden eta kateen arteko disulfuro loturak dituzten pisu molekular altuko polimeroak dira. Horrela, gluten-proteinek masa molekular tarte handia betetzen dute zenbait miloi daltonetara ailegatuz. Gari-glutenean dauden disulfuro eta hidrogeno loturek, proteinaren egituran eta propietatetan eginkizun garrantzitsua daukate (Pommet et al., 2005). Zeinak eta gari-glutenak antzekotasun ugari partekatzen dituzte, adibidez, alkohol urtsuetan disolbagarriak dira, prolina eduki handia dute, merkeak eta ugariak dira (Dahesh et al., 2016). Gainera, uretan disolbatzen ez direnez, geruza disolbaezinak sortzen dituzte. Hala ere, gari-glutenak, zeinarekin konparatuta, propietate biskoelastiko onak erakusten ditu, filmak eratzeko gaitasuna sustatuz. Beste proteinak bezala, gari-glutenak ur lurrunarekiko erresistentzia mugatua eta propietate mekaniko ahulak ditu. Baina bere abantailen artean, oxigenoarekiko

iragazkortasun ona azpimarratu daiteke (Mojumdar et al., 2011; Tanada-Palmu et al., 2000).

Filma eratzeko teknikei dagokienez, autore askok prozesu termo-mekanikoak erabili dituzte gari-glutenezko filmak prestatzeko (Ansorena et al., 2016; Thammahiwes et al., 2017). Gari-glutena tenperatura altuen eraginpean jartzen bada, sare molekularrean barruko saretze graduan eta motan aldaketa garrantzitsuak gauzatzen dira. Horrek, plastifikatzaile gabezia, film hauskorak sortzen ditu (Jansens et al., 2013). Horrela, plastifikatzailearen gehikuntzak gari-gluten filmen malgutasuna sustatzen du. Plastifikatzailerik erabiliena glizerola da (Duval et al., 2015; Sharma et al., 2017). Aurrez aipatutako proteinen kasuetan bezala, beste biopolimeroekin nahasteak gari-gluten filmen propietateak hobe ditzake. Modu horretan, oti indaba erretxina, metil zelulosa, karboximetil zelulosa (Zárate-Ramírez et al., 2014), almidoia (Basiak et al., 2015; Basiak et al., 2017) eta kitosanoa (Chen et al., 2014) bezalako polisakaridoen gehikuntza aztertu da.

Azken urteotan, lan askok gari-gluten filmek duten onddo eta mikrobioen kontrako eraginkortasuna aztertu dute, material hauek elikagaiak babesteko produktuetan aplikatu daitezten. *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* eta *L. monocytogenes* elikagaiak kaltetzen dituzten ohizko patogenoak dira. Horrela, Barazi eta Osman (2017) autoreek gluten filmek *Origanum vulgare* EO kontzentrazio desberdinekin, hainbat patogenoren kontrako aktibitate antimikrobiarra aztertu zuten. Beste agente antimikrobiarrek ere (iltze, timeo gorriak, karbakrolak, zinamaldehidoak eta timeo zuriak) *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *E. coli* eta *S. aureus*-en kontra eraginkortasun antimikrobiarra erakutsi zuten (Gómez-Heincke, 2016). Gari-gluten filmetan azido formikoaren eta oregano EO-ren gehikuntzak ere *A. niger*, *Candida kefyr*,



*B. cereus* eta *E. coli*-ren kontrako aktibitate antimikrobiarra erakutsi zuen (Martínez et al., 2013). Granada azalaren eta curry hostoen estraktuak ere erabili dira gari-glutenean oinarritutako filmak prestatzeko, konkretuki, Cherry tomateen eta mangoen iraukitzea luzatzeko (Kumari et al., 2017). Granada azalaren estraktuak curry hostoak baino aktibitate antimikrobiar handiagoa du *S. aureus* eta *Micrococcus luteus* patogenoen kontra. Gari-gluten filmen efektu antimikrobiarra haragi produktuetan aztertu zen (Massani et al., 2014). *Lactobacillus curvatus* CRL70 zuen gari-glutena erabili zen elikagai simulatzaileen (ekilore-olioa eta ura) kontaktupean askatze propietateak ebaluatzeko. Eraitzen arabera, filmarekin hutsunean ontziratutako prestatutako saltxitxetan efektu antimikrobiar eraginkorra ikusi zen.

Nahiz eta ikerketa lan gehienak film aktiboen garapenean zentratu diren, ontziratze adimentsuen garapenean hazkuntza apurka-apurka hasi da (Ghaani et al., 2016). Bibi eta lankideen (2015) arabera, ontzi adimentsu bat ontziratutako elikagaiaren baldintzei edo elikagaia inguratzen duen ingurumenari buruzko informazioa ematen duen material gisa defini daiteke. Gainera, elikagaiaren kalitateari buruzko informazioa bere garraioan eta biltegitratzean ematen du. Horrela, karbono dioxidoaren eta hezetasun erlatiboaren aldaketak kontrolatuz, elikagaiaren metabolismoaren eboluzioaren kontrola hobea da, eta kontsumitzaileek duten kalitate handiagoko produktuen eskaera betetzen da. Gari-glutenari dagokionez, honek propietate dielektrikoak ditu (Sharma et al., 2010). Horrela, proteina hau ontziratze adimentsuak garatzeko erabilgarria izan daiteke. Bibi eta lankideek (2017) aipatu zuten, gari-glutenaren propietate elektriko eta dielektrikoak karbono dioxidora sentikorrak dira. Horregatik, gari-gluten filmak ingurunea kontrolatzeko ontziratze sistema adimentsuetan erabil daitezke. Testuinguru horretan, autoreek gari-glutena karbono dioxidoaren sentsore gisa erabili zuten, emaitza interesgarriak lortuz, batez ere hezetasun erlatibo handiko balioetan (%90). Gainera, Bibi

eta lankideek (2016) hezetasun erlatiboa kontrolatzeko gari-gluten filmen erabilera aztertu zuten, hezetasun erlatibo balio altuetan bere sentikortasun ona konfirmatuz. Propietate hau ontziraturako elikagaien kontrolarekin erlazionatuta dauden aurreikuspen aplikazioetarako oso egokia da.

#### **1.3.2.4 Bestelako landare-proteinak**

Soja-proteina, zeina eta gari-glutena asko ikertuak eta erabiliak izan arren, beste landare-proteina batzuk ere aintzat hartu dira film eta geruza aktiboak garatzeko. Iltze EO-rekin prestatutako ekilore-olioan oinarritutako filmak, sardinak babesteko erabili ziren, lipidoen oxidazioa eta mesofilo totalen hazkuntza atzeratzen baitzuten. Kanolaren bideragarritasuna elikagaien ontziratze aplikazioetarako ere aztertu izan da. Kanola olio-industriaren azpi-produktu bat da, hala ere, soilik ganadua elikatzeko erabili ohi da. Bere proteina kantitate maximoa %50a da (oinarri lehorrean) baina aminoazido-profil orekatua dauka, horrela, glizerola (Chang eta Nickerson, 2015), sorbitola eta polietilenglikolarekin (Chang eta Nickerson, 2014) plastifikatutako filmak prestatzeko erabili izan da. Algarroba-lekaren proteina kantitate maximoa %25a da eta proteina merkea izan ohi da, hori dela eta, filmak garatzeko lehengai eskuragarria da. Hala ere, proteina hau mekanikoki ez da egokia (Arabestani et al., 2013). Horrela, azido feruliko oxidatua (Arabestani et al., 2016a) edo granada zukua (Arabestani et al., 2016b) bezalako gehigarriak gehitu izan dira filmen propietateak hobetzeko, trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazio balio altuagoak lortuz. Duela gutxi, intxaur-olioaren produkzioak garrantzia hartu du, izan ere, bere gantz azidoen profila oliba-olioarenaren antzekoa da. Bere nutrizio-balioa eta proteinaren eduki altua dela eta, olio erauzketatik lortutako intxaur-irina arrakasta lortzen ari da. Aydemir eta lankideek (2014) intxaur-proteina film gardenak eta malguak lortu zituzten; gainera, intxaur-proteina isolatuaren aktibitate

antioxidatzailea, antikartzinogenoa eta antihipertentsiboa frogatu zituzten, baita bere emultsifikazio, gelifikazio eta ur absortzio gaitasun eskasak. Olio erauzketan sesamo-proteina ere lor daiteke. Sesamoak %30-40 proteina dauka eta filmak eratzeko erabil daiteke. Sharma eta Singh-ek (2016) sesamo-proteina isolatua erabili zuten filmak prestatzeko. Propietate mekanikoak eta optikoak hobetzeko ikerkuntza gehiago behar izan arren, film hauek fruituak eta barazkiak ontziratzeke erabil daitezke, hezetasunarekiko hesi-propietate onak baitituzte.

#### **1.4 ETORKIZUNEN JOERA ETA AUKERAK**

Landare-proteinan oinarritutako filmak eta geruzak elikagaiak ontziratzeke eta biomedikuntza aplikazioetarako etorkizun handiko sistemak dira. Ontziratzeke aplikazioaren kasuan, osagai bakoitzaren eginkizuna ulertzea oso garrantzitsua da, elikagaiaren usteltze mekanismoa kontrolatzen duten propietate funtzional egokiak dituzten filmak eta geruzak garatzeko, eta ondorioz, elikagaiaren kalitatea hobetu eta bere iraungitzea luzatzeko, elikagaiekin kontaktuan dauden materialak izan behar dituzten baldintzak betez.

Ikerkuntza lan asko, proteinan oinarritutako filmen eta geruzen konposizioaren optimizazioan, propietate funtzionaletan eta prozesatze-metodoetan zentratu dira; izan ere, ekonomikoki bideragarriak eta ingurumenarekiko jasagarriak diren materialak garatu nahi dira, plastiko sintetikoaren kontra lehiatzeko eta elikagaiak ontziratzeke aplikazioetan hauen erabilera murrizteke. Horrela, proteinen erabilerak, nekazaritza-, haragi-, hegazti- eta arrain-industrietatik sortutako hondakin edo azpi-produktuetatik erauzi daitezkeen bioaktiboekin batera, lagundu egin dezake; gainera, ingurumenarekiko lagungarriak diren ontzien kostu eraginkorra duen produkzioa aurrera eramaten, baita funtzionalitate berriak sustatzen lagundu dezake. Geroz eta ikerkuntza lan gehiago daude

elikagai freskoak babesteko proteina filmak eta geruzak erabiltzen dituztenak, horrela, frogatu egin da proteina hauek elikagaien kalitatea, segurtasuna, funtzionalitatea eta iraungitzea hobe dezaketela, eta ondorioz, proteinetan oinarritutako ontziratze sistema hauek merkatuan inplementatzeko aukerak zabaltzen dira.

Biomedikuntza arloan erabilitako material hauei dagokienez, proteinan oinarritutako produktuak bioaktiboak garraiatzeko erabili izan dira. Modu horretan, biologikoki aktiboak diren konposatu hauek proteinetan oinarritutako formulazioetan gehitu dira material aktiboak garatzeko, adibidez, zaurien sendakuntzarako aproposak diren materialak. Nahiz eta aplikazio horretarako soluzio-metodoa zein konpresioa asko erabili diren, beste prozesatze-metodo batzuk aintzat hartzen ari dira material hauek erabiltzeko aukerak handitzeko. Adibidez, liofilizazioa erabiliz edo 3D inprimaketaren bidez prestatutako aldarnioak ehun-ingeniartzan erabiltzen hasi dira. Hala ere, ikerkuntza sakonago bat beharrezkoa da, proteinetan oinarritutako biomaterialetan bioaktiboen gehikuntzaren onurak maximizatzeko.

Orokorrean, bioaktibo konposatuen erauzketaren berrikuntza teknologikoa eta proteinetan oinarritutako produktuen garapena egin da, bai elikagai bai biomedikuntza aplikazioetarako. Hala ere, ikerkuntza gehiago behar da erauzketa eta manufaktura tekniken mugak gaintzeko, modu horretan, bioaktiboen eta proteinen produktuak industria-mailara pasatzeko, prototipo batetik bolumen handiko manufakturara.

# 2.

*kapitula*

**MATERIALAK ETA METODOAK**



## 2.1 MATERIALAK ETA ERREAKTIBOAK

Soja-proteina isolatua (SPI), PROFAM 974, ADM Protein Specialties Divisionek ekoiztutakoa da. Ekoizlearen informazioaren arabera, SPI-k %90eko proteina kantitate minimoa du (oinarri lehorrean), %5eko hezetasuna, %4ko gantza eta %5eko errautsak ditu eta bere puntu isoelektrikoa 4,6 da. ADM Protein Specialties Divisionek ere SPI-ren aminoazido edukia hornitu zuen, berriz, aminoazidoen analisia Biochrom 30+ aminoazido analisi ekipoarekin burutu zen.

Glizerola eta sorbitola, Panreac ekoiztutakoak, plastifikatzaile gisa erabili ziren. Glizerola (92 g/mol) kolore gabeko eta likatsua den likidoa da, sorbitola (182 g/mol), aldiz, kolore zuriko hautsa da.

Lan honetan beste erreaktibo batzuk ere erabili ziren. Azido galikoa, Folin-Cicalteu, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), eta leuzin-enzefalin azetato hidratatua (%95eko purutasuna) Sigma Aldrich-ek hornitutakoak ziren; sodio karbonatoa, kobre sulfatoa, sodio hidroxido, sodio tiosulfatoa eta ioduro potasikoa ECP-an erosi ziren; azido sulfurikoa eta Rochelle gatza JT Baker-ean erosi ziren; azido azetikoa Merck-ek hornitu zuen; metanola, azetonitriloa eta azido formikoa Fisher Scientific-ean erosi ziren. Filmen prestaketarako ur distilatua erabili zen.

## 2.2 BIO-HONDAKINETATIK ERAUZITAKO MATERIALAK

### 2.2.1 Keratinaren erauzketa eta karakterizazioa

Keratina hidrolizatua (HK) Lumagorri S.L. enpresak hornitutako oilo-lumetatik erauzi zen. Hasteko, oilo-lumak urarekin garbitu eta giro tenperaturan lehortu ziren. Gero, lumak zati txikitan moztu eta ehotu egin ziren. Ondoren, ehotutako lumak

metanolarekin tratatu ziren Soxhlet aparatu batean 3 orduz eta, amaitzeko, giro tenperaturan lehortu eta ontzi itxi batean gorde ziren erabili aurretik. Tratatutako oilo-luma hauek (CF) NaOH-rekin (1 M) nahastu ziren 1:20 (w/v) erlazioan 8 orduz giro tenperaturan eta nahaste jarraitua erabiliz (Lavall et al., 2007). Horren ondoren, 100 mL ur distilatua gehitu ziren eta soluzioa (HK) iragazi zen. Beharrezko kantitatea izatean, HK soluzioa liofilizatu zen Alpha 1-4 LD ekipoa erabiliz hautsa lortzeko.

Pisu molekular desberdinak dituzten frakzio proteikoen analisisia egin zen sodio dodezil sulfato-poliacrilamida gel elektroforesia (SDS-PAGE) erabiliz, Laemmli-k SPI-n egindako metodoa jarraituz (Laemmli, 1970). Lagin kantitate desberdinak SDS, tris-HCl bufferra (pH 6,8), ditiotreitol (DTT), glizerola eta bromofenol urdina zituen buffer batean disolbatu ziren. Metatze- eta banatze-gelak %12 poliacrilamida ziren. Elektroforesi boltajea 200 V-koa izan zen. Elektroforesia eta gero, gela urarekin garbitu zen eta ondoren tindatzeko soluzio batekin (Coomassie Brilliant Blue R-250, BIO-RAD) tindatu zen. Gero, tindu kendu zen, ura, metanol eta azido azetiko glaziarrez osatutako nahaste batekin. Kalibrazioa erreferentzia proteina (Precision plus protein all blue standards, BIO-RAD) batekin egin zen.

### 2.2.2 Agarraren erauzketa eta karakterizazioa

Agarra (AG) udazkenean erauzi zen Espainiako iparraldeko kostatik (Hondarribiako hondartza: 43°23'50N, 01°47'50W) bildutako *Gelidium sesquipedale* (Rodophyta) alga gorritik. Erauzketa prozesuan, lagin lehorra (10 g) lau orduz ur irakitan (900 mL) murgildu zen, eta lortutako soluzioa iragazketaren bidez hondakinetik bereizi zen, 50 µm-ko blutex nylona erabiliz. Ondoren, soluzioa giro tenperaturan gelifikatzen utzi zen eta liofilizazio prozesuaren bidez agarra hauts moduan lortu zen.



Bestalde, lortutako hondakin disolbaezina 3 orduz tratatu zen; 2 aldiz erauzi zen, irakiten zegoen uretan eta 25 µm-ko blutex nylona erabiliz, iragazketaren bidez bereizi zen soluziotik, eta ondoren lehortzen utzi zen. Ondoren, klorofila pigmentuak kentzeko, hondakina Soxhlet aparatu batean erauzi zen, irakiten zegoen etanola erabiliz eta jarraian lehortu, ehotu eta bahetu zen. Lortutako hautsa, alga hondakina (AH) bezala izendatua, betegarri gisa erabili zen. Hau zelulosaz, proteinaz eta agarosaz osatua zegoen batez ere (Guerrero et al., 2014; Vignon et al., 1994)

$^1\text{H}$  eta  $^{13}\text{C}$  erresonantzia magnetiko nuklearrezko espektroak Bruker Avance espektrometro batean egin ziren. Espektrometroa BBO z gradientedun kateterrarekin horituta zegoen. %5eko agar soluzioa prestatu zen,  $\text{D}_2\text{O}$ -an disolbatuta, eta datuak 90 °C-an aztertu ziren.  $^1\text{H}$  NMR-rako baldintzak hurrengoak ziren: 500 MHz, 64 ekorketa, 5000ko leiho espektrala eta segundo bateko atzeratze berreskurapena.  $^{13}\text{C}$  NMR-ren kasuan, baldintzak honakoak ziren: 125,75 MHz, 14000 ekorketa, 25000ko leiho espektrala eta bi segundoko atzeratze berreskurapena.

### 2.2.3 Kitinaren erauzketa eta karakterizazioa

$\beta$ -Kitina bertako arrandegi batek hornitutako txibien lumetatik (*Loligo* sp.) erauzi zen. Txibiak Kantauri itsasoan arrantzatu ziren arrantza-denboraldian (Martxoa-Abuztua). Kitina isolatu baino lehen, bildutako txibien lumak urarekin garbitu ziren, organiko disolbagarriak eta ezpurutasunak kentzeko. Gero, lumak izozkailuan gorde ziren -20 °C-an prozesatu arte. Erabili baino lehen, lumak desizoztu, zati txikitik moztu ( $1 \times 2 \text{ cm}^2$ ) eta lehortzen utzi ziren giro tenperaturan. Txibien lumak NaOH-rekin (1 M) tratatu ziren 1:20 (w/v) erlazioan, 24 orduz, giro tenperaturan eta nahaste jarraitua erabiliz kitinaren desazetilazioa zein degradazioa ekiditeko (Chaussard eta Domand, 2004). Ondoren, nahastea iragazi zen eta frakzio solidoa ( $\beta$ -kitina) ur distilatuarekin

garbitu zen pH neutroa lortu arte. Amaitzeko,  $\beta$ -kitina izoztu, liofilizatu eta ehotu zen hautsa lortzeko. Lortutako hautsa soja-proteinarekin nahastu zen filmak egiteko.

Txibia lumen errausts kantitatea, laginaren gramo bat 595 °C-an 3 orduz labean berotuz kalkulatu zen, TAPPI T211-02 (TAPPI, 2002) araua jarraituz. Errausts kantitatea hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$\text{Errausts kantitatea (\%)} = \frac{m_a}{m_s} \times 100$$

non  $m_a$  erraustsen pisua zen (g) eta  $m_s$  laginaren pisua (g) hezetasunik gabe.

Analisi elementala (EA) Euro EA Elemental Analyser ekipoa erabiliz aztertu zen. Karbono (C) eta nitrogenu (N) kantitateak kontuan hartu ziren kitinaren bataz besteko azetilazio maila (DA) kalkulatzeko, hurrengo ekuazioa erabiliz (Xu et al., 1996):

$$\overline{DA} (\%) = \frac{(C/N) - 5,14}{1,72} \times 100$$

non C/N karbono/nitrogenu ratioa zen.

## 2.2.4 Polifenolen erauzketa eta karakterizazioa

Polifenolak Zeelanda Berriko Marborough herrialdetik 2015 urteko uztatik hartutako Chardonnay motako ardo mahats-patsetik (GM) erauzi ziren. GM-a haziz, mahats azalaz eta zurtoinez osatuta zegoen eta -18 °C-an gordeta mantendu zen erabili arte. Polifenolen erauzketa egin baino lehen, mahats-patsa desizoztu zen giro tenperaturan eta ehotu egin zen minutu batez partikula txikiagoak lortzeko erauzketa prozesua hobetzeko (Muhamad et al., 2017). Polifenolen erauzketa mahats-patsetik erauzi zen mikrouhin bidezko erauzketa prozesua erabiliz. Horretarako, CEM erreaktore

bat (Model Discover, CEM) 2,45 GHz-an eta potentzia kontrolatzeko gaitasuna zuena erabili zen. Sistemako tenperatura fibrazko tenperatura sentsoarekin neurtu zen, mikrouhinen eta bere inpaktua tenperatura irakurketaren arteko elkarrekintza saihestuz (Gizdavic-Nikolaidis et al., 2010). Kanpoko hozte-zirkuitu batek nahastearen tenperatura eta irradiazio potentzia konstante mantendu zituen . Saiakera guztiak baldintza berdinetan egin ziren: potentzia (93 W), tenperatura ( $24 \pm 1$  °C) eta disolbatzailearen bolumena (10 mL). Etanola, konposatu fenoliken erauzketarako disolbatzaile segurua eta efizientea dena, kontzentrazio desberdinetan erabili zen. Disolbatzailea zentrifugazioaren bidez kendu zen 60 °C-an (Dahmoune et al., 2015; Kerton eta Marriot, 2013).

Mahats-pats erauzkinaren azukrea Rebelein metodoa erabiliz zehaztu zen (Zoecklein et al., 1995). Hasteko, 2 mg/mL-ko soluzioa prestatu zen mahats-patsa uretan disolbatuz. Gero, 10 mL kobre sulfatoa (0,168 M) azido sulfurikoan (0,005 M), 10 mL Rochelle gatza (0,886 M) sodio hidroxidoan (2 M) eta erauzitako soluzioaren 2 mL-an nahastu ziren 200 mL-ko Erlenmeyer batean. Nahastea berotu zen lurrina atera arte eta horrela 1,5 minutuz utzi zen, gero berehala hozteko izotz bainu batean. Ondoren, 10 mL potasio ioduroa (1,81 M) sodio hidroxidoan (0,1 M), 10 mL azido sulfurikoa (%16), eta 10 mL almidoi soluzioa (%1) potasio ioduroan, eta hau aldi berean sodio hidroxidoan (0,01 M), gehitu ziren aurreko nahastera. Lortutako soluzioa baloratu egin zen, sodio tiosulfatoa (0,056 M) sodio hidroxidoan (0,05 M) erabiliz, soluzio txuri krematsu bat lortu arte. Azukre kantitatea hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$RS \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{\left( 28 - 28 \times \left( \frac{V_S}{V_B} \right) \right) \times 1000}{S}$$

non  $V_s$  laginerako erabilitako baloratzaille kantitatea (mL),  $V_B$  lagin txurirako erabilitako baloratzaille kantitatea (mL) eta S laginaren kontzentrazioa (mg/mL) diren.

Errendimendu handiko kromatografia likidoa (HPLC) mahats-patsan dauden monosakaridoen identifikazioa egiteko erabili, zen Jasco LC Net II/ADC kromatografoa erabiliz. Analisia  $300 \times 7,8$  mm-ko CARBOSep CHO-628 LEAD zutabe batean egin zen  $80^\circ\text{C}$ -an (fase mobila: ur desionizatua  $0,4\text{mL}/\text{min}$ -tan purifikatuta). Injekzioaren bolumena  $20\ \mu\text{L}$ -koa zen.

Bestalde, konposatu fenoliken zehaztapena errendimendu ultra-handiko likidoen kromatografia (UHPLC) erabiliz gauzatu zen Waters etxeko ACQUITY UPLC<sup>TM</sup> sistema batekin. Waters etxeko alderantzizko fase zutabea (Acquity UPLC BEH C18  $1,7\ \mu\text{m}$ ,  $2,1\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ ) eta aurre-zutabea (Acquity UPLC BEH C18  $1,7\ \mu\text{m}$  VanGuard<sup>TM</sup>) erabili ziren  $40^\circ\text{C}$ -an. Erabilitako fluxu abiadura  $0,35\ \text{mL}/\text{min}$  izan zen eta injekzio bolumena, berriz,  $2,0\ \mu\text{L}$ . Fase mugikorra honela osatua zegoen: %0,1 azido azetikoa uretan (A) eta %0,1 azido azetikoa azetonitriloan (B). Bereizketa jarraian azaldutako baldintzetan burutu zen: 0,00-1,60 min, B %2; 1,60-2,11 min, B %15; 2,11-8,88 min, B %8; 8,88-9,80 min, B %8tik %10era gradiente lineal batean; 9,80-17,00 min, B %10; 17,00-22,00 min, B %10tik %20era gradiente lineal batean; 22,00-23,40 min, B %20tik %23era gradiente lineal batean; 23,40-54,20 min, B %23tik %60era gradiente lineal batean; 54,20-55,20 min, B %60tik %100era gradiente lineal batean; bukatzeko, zutabearen garbiketa eta berriz orekatzea egin ziren hurrengo injekzioaren aurretik. Lagin guztiak  $4^\circ\text{C}$ -an mantendu ziren analisisan zehar. PDA detektagailuaren uhin-luzera tartea 210-500 nm-koa zen (20 Hz,  $1,2\ \text{nm}$ -ko bereizmena). Azido bentzoikoak  $240\ \text{nm}$ -an aztertu ziren, flabanolak  $280\ \text{nm}$ -an, azido hidroxizinamikoak  $320\ \text{nm}$ -an eta flabonolak eta dihidroflabonolak  $370\ \text{nm}$ -an.

Masa espektroskopia (MS) SYNAPT<sup>TM</sup> G2 HDMS erabiliz landu zen, Q-TOF konfigurazioarekin eta elektro-esprai ionizazio (ESI) iturria modu positiboan eta negatiboan lan egiten. Tentsio kapilarra 1,0 kV-an finkatu zen bi kasuetan. Nitrogenoa desolbatazio eta kono gas moduan erabili zen 1000 L/h eta 10 L/h fluxu abiaduran, hurrenez hurren. Iturriaren tenperatura 120 °C-koa zen eta desolbatazio tenperatura berriz, 400 °C-koa. Leuzina-enzefalina soluzioa (2 ng/ $\mu$ L) azetonitrilo:ur nahastean (50:50 (v/v) + %0,1 azido formikoa) erabili zen kontrol-masaren zuzenketarako, eta soluzio honetan, masa-karga proportzioan (m/z) 556,2771 eta 278,1141 ioiak, ionizazio modu positiboan aztertu ziren (0,3 s-ko ekorketa-denbora, 10 s-ko tarte, batz besteko 3 ekorketa,  $\pm$  0,5 Da-ko masa leihoa, 30 V-ko kono tentsioa, 10  $\mu$ L/min-ko fluxu abiadura). Datuak 50-1200 m/z masa tartean hartu ziren bereizmen moduan (FWHM  $\approx$  20.000), 0,1 s-ko ekorketa-denbora eta ekorketen arteko 0,024 s-ko atzerapenarekin. Lortutako espektro guztiak automatikoki zuzendu ziren kontrol-masan oinarriturik. Analisia egin aurretik, masa espektrometroa sodio ioduro soluzioa erabiliz kalibratu zen.

MS<sup>E</sup> moduko analisia egiteko, kono tentsioa 20 V-an finkatu zen eta lehenengo tetrapoloak (Q1) RF banda zabal batean bakarrik lan egin zuen. Automatikoki tartekatutako bi eskuratzeko funtzio ezberdin eta independente sortu ziren. Lehen funtzioak, normalean T-uhinaren tranpa-gelaxkan 6 eV-an 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-ko talka gradientea erabiliz. Bi kasuetan, argoi gasa erabili zen talkak eragindako disoziazioan (CID) eta datuak zentroide moduan gorde ziren.

MS<sup>2</sup> produktu ioi espektroa protonaturako [M+H]<sup>+</sup> 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.

Konposatu fenoliken identifikazioa UV-Vis espektroa aztertuz eta talde fenoliken esleipena eginez burutu zen (Abad-García et al., 2009); talka energia baxuko MS<sup>E</sup> espektroa modu positiboan pisu molekularrak zehazteko eta talka energia altuko MS<sup>E</sup> eta MS<sup>2</sup> produktu ioi espektroa aglikona protonatuak [Y<sub>0</sub>]<sup>+</sup> esleitu eta zatikatzeak behatzeko erabili ziren, beste egitura zehaztasun batzuk argitzeko.

## **2.3 SOJA-PROTEINAN OINARRITUTAKO PRODUKTUEN PRESTAKETA**

### **2.3.1 Soluzio- eta konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmak**

5 g soja-proteina 100 mL ur distilatuan dispersatu ziren eta nahastea 30 minutuz berotu zen 80 °C-an nahaste magnetikoa erabiliz. Ondoren, plastifikatzailea gehitu zen eta dispersioa beste 30 minutuz mantendu zen aurreko baldintza berdinetan. NaOH (1 M) erabili zen pH-a 10era egokitzeko. Dispersioa Petri ontzietan isuri zen eta giro temperaturan 48 orduz ura lurruntzen utzi zen SPI-W filmak osatzeko.

SPI eta plastifikatzailea nahastu ziren, nahastea aluminiozko bi xaflen artean ipini zen eta 12 MPa-eko presio ezarri zitzaion 2 minutuz 150 °C-an berotuta zegoen prentsan. Lortutako filmak SPI-D gisa izendatu ziren.

Entseatu aurretik, lagin guztiak 25 °C-an eta %50eko hezetasun erlatiboan egokitu ziren 48 orduz ACS Sunrise 700V ganbera batean.

Filmen lodiera neurtzeko QuantuMike Mitutoyo mikrometroa erabili zen. Horretarako, lagin bakoitzean lodiera bost puntu desberdinetan neurtu zen eta ondoren batuz bestekoa kalkulatu zen. Kasu guztietan lodiera 80 eta 100  $\mu\text{m}$  bitartekoa zen.

### 2.3.2 Estrusioa

Hasteko, konposatu guztiak elkarrekin nahastu ziren Stephan UMC 5 nahasgailu batean 5 minutuz eta 1500 bira minutuko abiaduran. Nahastea elikadura-toberan sartu eta urarekin nahastu zen torloju bikoitzeko estrusio makina batean (MPF 19/25 APV Baker). Erabilitako estrusio makinaren diametroa 19 mm-koa zen eta luzera/diametro ratioa 25:1-koa. Estrusorako lau zonaldeen berokuntza guneen tenperaturak, sarreratik irteerara, 70, 80, 95 eta 100 °C-an finkatu ziren, eta amaierako tenperatura 100 °C-an, aurreko lan batean oinarrituta (Guerrero et al., 2012). Froga guztiak 2,68 g/min-ko (0,16 kg/h) ur abiadurarekin egin ziren, 504U MK ur ponpa peristaltiko bat erabiliz. Estrusio makinaren 250 bira minutu-ko abiadura zehaztu zen eta elikatze-abiadura 1 kg/h-koa izan zen. Estrusio makina 3 mm-ko irteerako gune bakar batekin hornituta zegoen eta bere ekoizpena 0,141 kg/h·mm<sup>2</sup> zen. Estrusioaren bidez lortutako pelletak konpresioaren bidez filmak edo injekzioaren bidez biokonpositeak lortzeko erabili ziren.

Pelletaren dentsitatea (PD) kalkulatzeko, estrusioaren bidez lortutako pelleten masa ( $W_{\text{lagina}}$ ) bere bolumenagatik zatitu ( $V_{\text{lagina}}$ ) zen. Bolumena, aldi berean, pelleten dimentsioak kontuan izanda kalkulatu zen (diametroa,  $d$ ; luzera,  $l$ ). Hamar laginen dimentsioak neurtu ziren (2 cm-ko altuera) eta PD hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$PD = \frac{W_{\text{lagina}}}{V_{\text{lagina}}} = \frac{4 \times W_{\text{lagina}}}{\pi \times d^2 \times l}$$

Hamar lagin neurtu ziren konposizio bakoitzeko.

Espantsio ratioa (ER) pelletaren zeharkako sekzioaren azalera eta estrusoraren irteera zuloaren zeharkako sekzioaren azaleraren arteko erlazioa da. Espantsio ratioa hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$ER = \frac{d^2}{d_{irteera}^2}$$

non  $d_{irteera}$  irteera zuloaren diametroa den eta  $d$  pelletaren diametroa (10 laginen batz bestekoa).

Laginen energia mekaniko espezifikoa (SME) hurrengo adierazpenarekin kalkulatu zen (Hernández-Izquierdo eta Krochta, 2008; Hu et al., 1993):

$$SME \left( \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{torlojuaren abiadura} \times \text{potentzia (kW)} \times \text{indar-parea (\%)}}{\text{torlojuaren abiadura max.} \times \text{ekoizpena} \left( \frac{\text{kg}}{\text{h}} \right) \times 100}$$

### 2.3.3 Injekzioa

Estrusioan lortutako pelletak, Type I ASTM laginetan eraldatu ziren Haake Minijet II injekziorako makina erabiliz. Saiakuntzak egiteko finkatutako presioa eta tenperatura 450 bar-ekoa eta 120 °C-koa ziren, hurrenez hurren. Entseatu aurretik, lagin guztiak 25 °C-an eta %50eko hezetasun erlatiboan egokitu ziren 48 orduz ganbera batean (ACS Sunrise 700V).



## 2.4 KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA

### 2.4.1 Hezetasun edukia (MC), ura xurgatzeko ahalmena (WU) eta disolbaturiko masa totala (TSM)

Hasteko, film bakoitzeko hiru lagin pisatu ziren ( $m_w$ ). Ondoren, laginak aire-zirkulazioko labe batean lehortu ziren 105 °C-an 24 orduz, eta berriro pisatu ziren ( $m_0$ ).

Hezetasun edukia kalkulatzeko hurrengo ekuazioa erabili zen:

$$MC (\%) = \frac{m_w - m_0}{m_w} \times 100$$

Ura xurgatzeko ahalmena kalkulatzeko, labetik ateratako laginak ( $m_0$ ) 30 mL ur distilatuan sartu ziren giro tenperaturan. Laginak lehenengo 8 ordutan, orduro, uretatik atera, lehortu, pisatu ( $m_t$ ) eta berriro uretan sartu ziren, 24 orduak bete arte. Azkenik laginak berriro pisatu ziren. WU balioak hurrengo ekuazioarekin kalkulatu ziren:

$$WU (\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100$$

Laginak 24 orduz uretan egon ostean, labean sartu ziren 105 °C-an beste 24 orduz. Azkenik, labetik ateratako filmak pisatu ziren ( $m_f$ ) eta disolbagarritasuna hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$TSM (\%) = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100$$

Kasu guztietarako hiru lagin neurtu ziren konposizio bakoitzeko.

### **2.4.2 Fourier-en transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)**

FTIR analisia Nicolet Nexus espektrofotometroan egin zen, Golden Gate Specac ATR osagarria erabiliz. Guztira, 32 ekorketa egin ziren  $4\text{ cm}^{-1}$ -ko erresoluzioarekin. Neurketak  $4000$  eta  $800\text{ cm}^{-1}$  arteko uhin zenbakietan gauzatu ziren.

## **2.5 KARAKTERIZAZIO TERMIKOA**

### **2.5.1 Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC)**

Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC), Mettler Toledo DSC 822 ekipoarekin egin zen.  $4\text{ mg}$ -ko lagina  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tik  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra berotu zen  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -ko berotze-abiadura erabiliz. Saiakuntzak nitrogenu ingurune geldoan egin ziren erreakzio termo-oxidatzaileak saihesteko. Saiakuntzan zehar gerta daitezkeen masa galerak saihesteko aluminiozko kapsula itxiak erabili ziren.

### **2.5.2 Analisi termograbimetrikoa (TGA)**

Analisi termograbimetrikoa (TGA) Mettler Toledo SDTA 851 ekipoarekin egin zen. Saiakuntzak giro tenperaturari hasi eta  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ -raino egin ziren,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -ko berotze-abiaduran. Neurketak nitrogenu ingurune geldoan egin ziren erreakzio termo-oxidatzaileak saihesteko.

### **2.5.3 Analisi mekaniko-dinamikoa (DMA)**

Neurketa termo-mekanikoak DMA Explorer 100 N Gabo Qualimeter (JM Toneu, Espainia) ekipoarekin egin ziren. Laginak  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tik  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra berotu ziren  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -ko berotze-abiaduran eta  $1\text{ Hz}$ -ko maiztasun konstantea erabiliz. Esfortzu anplitudea  $\%0,05$ ean finkatu zen.

## 2.6 PROPIETATE OPTIKOAK

### 2.6.1 Kolore neurketak

Filmen kolorea neurtzeko makina mugikor bat erabili zen (CR-400 Minolta Croma Meter). Laginak plater zuri baten gainean jarri eta neurketak egiten ziren CIELAB kolore-eskala erabiliz:  $L^* = 0$  (beltza)-tik  $L^* = 100$  (zuria)-ra,  $-a^*$  (berdexka)-tik  $+a^*$  (gorrixka)-ra,  $-b^*$  (urdinxka)-tik  $+b^*$  (horixka)-ra. Kalibrazioa plater zuriarekiko egin zen ( $L^* = 97,39$ ,  $a^* = 0,03$  eta  $b^* = 1,77$ ). Film bakoitzeko hamar neurketa egin ziren eta kolore-diferentzia totala ( $\Delta E^*$ ), kontrol-lagina erreferentziatzat hartuz, honako ekuazioaren bidez kalkulatu zen (Francis eta Clydesdale, 1975):

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

### 2.6.2 Distira neurketak

Distira 60 °-ko angeluarekin neurtu zen, ASTM D523-14 (ASTM, 2014) araua jarraituz, MultiGloss 268 Plus distirametroa erabiliz. Hamar lagin neurtu ziren formulazio bakoitzeko.

### 2.6.3 Espektroskopia ultramore-ikuskorra (UV-vis) eta gardentasuna (T)

Argiarekiko hesi-propietateak argi-absorbantzia neurtuz zehaztu ziren 200 eta 800 nm bitarteko uhin-luzeretan, V-630 UV-Jasco espektrofotometroa (U V-630) erabiliz. Gardentasuna (T) hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

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

non L film laginaren lodiera (mm) eta  $A_{600}$  argiaren absortzioa 600 nm-an diren. Hiru lagin errektangeluar moztu ziren film bakoitzeko.

## 2.7 HESI-PROPIETATEAK

### 2.7.1 Uraren kontaktu angelua (WCA)

WCA balioak giro tenperaturan eta Oca20 Dataphysics Instruments kontaktu-angelu makinarekin neurtu ziren. Filmaren ezaugarri hidrofiloa zehaztatzeko, lagina horizontala den plataforma mugikor baten gainean jarri eta 3  $\mu$ L-ko tanta bat filmaren gainazalean ezarri zen. Argazkiak SCA 20 softwarea erabiliz egin ziren. Bost lagin neurtu ziren formulazio bakoitzeko.

### 2.7.2 Ur-lurrunarekiko iragazkortasuna (WVP)

Materialen ur-lurrunarekiko iragazkortasuna (WVP) neurtzeko, tenperatura eta hezetasuna kontrolatzen dituen ganbera (PERMETM W3/0120) erabili zen eta ASTM E96-00 (ASTM, 2000) araua jarraitu zen. Saiakuntza egiteko filmak 7,40 cm-ko diametroa zuten zirkuluetan ebaki ziren, analisi-azalera 33 cm<sup>2</sup>-koa izanik. Finkatutako tenperatura eta hezetasun erlatiboa 38 °C-koa eta %90ekoa izan ziren, hurrenez hurren. Ur-lurrunaren transmisio-abiadura (WVTR) hurrengo adierazpenaren bidez kalkulatu zen:

$$\text{WVTR} \left( \frac{\text{g}}{\text{s cm}^2} \right) = \frac{G}{t \times A}$$

non G pisu aldaketa (g), t denbora (s), eta A analisi-azalera (cm<sup>2</sup>) diren. WVP honela kalkulatu zen:

$$\text{WVP} \left( \frac{\text{g}}{\text{cm s Pa}} \right) = \frac{\text{WVTR} \times L}{\Delta P}$$

non L film laginaren lodiera (cm) eta  $\Delta P$  filmean zehar ur-lurrunaren presio partzialaren diferentzia (Pa) diren. Hiru lagin neurtu ziren konposizio bakoitzeko.

### **2.7.3 Olioarekiko iragazkortasuna (OP)**

OP-a Hanani-k eta lankideek (2012) deskribatutako metodoa jarraituz kalkulatu zen. Laburbilduz, paperezko iragazkiak (70 mm-ko diametrokoak) 25 °C-an eta %50eko hezetasun erlatiboan egokitu ziren eta gero pisatu egin ziren. Laginak paperezko iragazkien gainean kokatu ziren eta olio tanta batzuk bota ziren biokonpositeen ertzak gailendu gabe. 24 ordu iragan ostean, laginak kendu eta iragazkiak berriz pisatu ziren. Hiru lagin neurtu ziren konposizio bakoitzeko.

### **2.7.4 Oxigenoaren transmisio-abiadura (OTR)**

Oxigenoaren transmisio-abiadura (OTR) neurtzeko MOCON OX-TRAN Model 2/21 gas-iragazkortasunaren neurgailua erabili zen eta ASTM D3985 (ASTM, 2010) araua jarraitu zen. Saiakuntza burutzeko finkatutako tenperatura, presioa eta hezetasun erlatiboa 23 °C-koa, 760 mm Hg-koa eta %50ekoa izan ziren, hurrenez hurren. Hiru lagin neurtu ziren formulazio bakoitzeko.

## **2.8 PROPIETATE MEKANIKOAK**

Modulu elastikoa (EM), trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB) MTS Insight 10 sistema elektromekaniko baten bidez aztertu ziren, ASTM D638-03 (ASTM, 2003) araua jarraituz. Lehenengo 4,75 mm × 22,25 mm-tako laginak moztu ziren eta ondoren trakzio saiakuntza 1 mm/min abiadurapean egin zen. Bost lagin entseatu ziren konposizio bakoitzeko.

## 2.9 KARAKTERIZAZIO MORFOLOGIKOA

### 2.9.1 Mikroskopia optikoa (OM)

Lagin bakoitzaren zeharkako sekzioaren morfologia behatzeko mikroskopia optikoa (Nikon Eclipse E600) erabili zen x500 magnitudearekin.

### 2.9.2 Ekorketazko mikroskopia elektronikoa (SEM)

Filmaren zeharkako sekzioaren morfologia Hitachi S-4800 ekorketazko mikroskopia elektronikoarekin aztertu zen. Hasteko, filmen zeharkako sekzioa kuter batekin moztu zen. Jarraian, laginak bi aldeetatik itsasgarria den zinta bat erabiliz metalezko zati batean kokatu ziren. JFC-1100 ekipoa erabili zen, argon ingurune geldoan, hutsuneaz baliatuz, urrezko estaldura batekin laginak gainestaltzeko. Lagin guztiak 15 kV-ko tentsio azeleratu batekin aztertu ziren.

## 2.10 X-IZPIEN ANALISIA

### 2.10.1 X-izpien difrakzioa (XRD)

XRD-ren azterketak 40 kV eta 40 mA-an egin ziren PANalytical Xpert PRO difrakzio unitate batekin. Erradiazioa Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) iturritik sortu zen. Difrakzio datuak  $2^\circ$  eta  $50^\circ$  tarteko  $2\theta$  balioetatik lortu ziren, non  $\theta$  laginarekiko X-izpiaren elektro-sortaren eraso-angelua den. Laginen kristalinitate indizea (CrI) hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$Cr_I = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100$$

non  $I_{110}$  intentsitate maximoa zen (1 1 0) planoan  $2\theta \cong 20^\circ$ -an eta  $I_{am}$  tarte amorfoaren intentsitatea  $2\theta \cong 16^\circ$ -an.

### **2.10.2 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektronikoa (XPS)**

XPS SPECS espektrometro batean burutu zen Al K $\alpha$  (1486,6 eV) zuen erradiazio monokromatikoa erabiliz. Lotura-energia Ag 3d $_{5/2}$  pikoarekin 368,28 eV-an kalibratu zen. Espektrua 90 °-an aztertu zen. Espektrua 1,0 eV pauso eta 40,0 eV pasatze energiarekin neurtu ziren eta erresoluzio altuko tartea 0,1 eV pauso eta 20,0 eV pasatze energiarekin. C 1s pikoak 284,6 eV-an erreferentzia giza hartu zen espektroaren maila guztientzako. CasaXPS 2.3.16 softwarearen bidez aztertu ziren eta pikoaren azalera Gaussian-Lorentzian prozeduraren bidez kuantifikatu ziren.

## **2.11 AKTIBITATE ANTIOXIDATZAILEA**

### **2.11.1 Fenoliken guztizko edukia (TPC)**

TPC-ren balioak Folin-Ciocalteu entsegua erabiliz lortu ziren. 4 mL-ko ontzi batean, 3,16 mL ur desionizatua laginaren 20  $\mu$ L-tara gehitu ziren. Ondoren, Folin-Ciocalteu errektiboaren 200  $\mu$ L gehitu ziren, soluzioa sutuki astinduz eta 3 minutuz utzi zen erreakzioa emateko. Jarraian, %20 sodio karbonato soluziotik 600  $\mu$ L gehitu ziren. Soluzioa 90 minutuz iluntasunean gelditu utzi zen, absorbantzia 765 nm-an neurtu aurretik. Azido galikoa erabili zen erreferentzia kurba egiteko; horrela, lortutako emaitzak mg azido galikoaren baliokide moduan azaldu ziren mL laginarekiko (mg GAE/mL lagin).

### **2.11.2 Aktibitate antioxidatzailearen determinazioa**

Laginen aktibitate antioxidatzailea Liu eta lankideek (2015) deskribatutako DPPH erradikalak ezabatze metodoaren bidez neurtu zen, hainbat aldaketekin. Hasteko, 63,4  $\mu$ mol/L DPPH-etanol soluzio bat prestatu zen. 4 mL-ko ontzi batean, 3,9 mL DPPH soluzioa eta 0,1 mL lagin gehitu ziren. Nahastea sutuki astindu zen eta

ondoren, giro tenperaturan 30 minutuz gelditu zen. Ondoren, lagin bakoitzaren absorbantzia neurtu zen 515 nm-an, Shimadzu 1700 UV/Vis espektrofotometroa erabiliz. Inhibizio portzentajea hurrengo ekuazioarekin kalkulatu zen:

$$\text{DPPH (inhibizio \%)} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{lagina}})}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

non  $A_{\text{DPPH}}$  DPPH soluzioaren absorbantzia 515 nm-an den, eta  $A_{\text{lagina}}$  lagin bakoitzaren absorbantzia 515 nm-an.

## 2.12 ERANTZUN GAINAZALEN METODOLOGIA (RSM)

### 2.12.1 Formulazioaren optimizaziorako diseinu esperimental

Konposatu fenoliken erauzketa maximoa lortzeko, RSM teknika erabili zen TPC eta DPPH erantzunetan hiru faktore askeen efektua aztertuz. Aukeratutako inputak disolbatzaile-kopurua, erauzkin-kopurua eta erauzketa-denbora izan ziren, eta hiru mailetan kodifikatu ziren: baxua (-1), ertaina (0) eta altua (+1). Aukeratutako balioak aurrez burututako lan batean oinarritu ziren: %30, 45 eta 60 disolbatzaile kontzentrazioarako; 1, 1,5 eta 2 erauzkin masak; eta 5, 10 eta 15 minutu erauzketa denborarako. Box-Behnken diseinua erabiltzea erabaki zen, izan ere diseinu honetan beharrezkoak diren entsegu esperimental kopurua baxua baita. **9.1. taulan (9. kapitulua)** lan honetan erabilitako aldagaiak aurkezten dira, kodifikatuak eta kodifikatu gabeak, erantzun aldagaiekin batera. Box-Behnken diseinua 12 entseguz osatuta dago, eta diseinuaren zentroan 4 entsegu gehigarri sartu ziren errore purua aztertzeko. Entsegu guztiak zorizko ordenan egin ziren. Erantzun aldagai bakoitzerako, modelo polinomial koadratiko oso bat garatu zen erregresio anizkoitz teknika erabiliz, bi erantzunak maximizatu egiten dituen formulazio optimoa zehazteko:



$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^n \sum_{i < j=2}^n b_{ij} x_i x_j$$

non  $b_0$  koefiziente konstantea zen,  $b_i$  lehenengo mailako koefiziente linealak ziren,  $b_{ii}$  koefiziente koadratikoak ziren, eta  $b_{ij}$  (non  $i \neq j$ ) bigarren mailako elkarrekintza koefizienteak ziren.

### 2.12.2 Analisi estatistikoa eta erantzunaren optimizazioa

Bariantza-analisia (ANOVA) modelo koadratikoaren egokitasuna aztertzeko egin zen. Erregresio koefizienteen esangura-maila ( $p < 0,05$ ) F balioa zehaztuz aztertu zen. Modeloa balioztatzeko, determinazio-koefizientea,  $R^2$ , modeloaren esangura-maila balioa eta egokitasun falta kalkulatu ziren. Fidagarria izateko, modelo estatistikoki esanguratsua izan behar zen %95 maila fidagarrira ( $p < 0,05$ ); doikuntza-falta berriz, ez-esanguratsua izan behar zen ( $p \geq 0,05$ ). Erantzun aldagaien maximo optimoa zehazteko, erantzunen aldagaien optimizazioa egin zen, bientzako ponderazio berdina utziz. Helburu horretarako Derringer eta Suich (1980) autoreek proposatutako funtzio hurbilketa erabili zen.

Analisi-data, ANOVA, erregresio lineala, baita erantzunen optimizazioa ere, Minitab 17 softwarea erabiliz egin zen.

### 2.13 INGURUMEN INPAKTUA

Egindako ingurumen-analisia ISO 14040 arauen arabera egin zen (ISO, 2006) eta SimaPro programa erabili zen. Alde batetik, polipropilenoazko (PP) filmen datuak lortzeko SimaPro softwarean eskuragarri dagoen Ecoinvent datu-basea erabili zen. Datu-base hori ere soja-proteinaren lehengaien eta konbertsio-prozesuen datuak lortzeko erabili zen. Beste aldetik, soja-proteinan oinarritutako filmei dagokienez, erabilitako

materialak eta manufaktura prozesuan kontsumitutako energia laborategian egindako lanaren bidez eskuratu ziren. Glizerola plastifikatzaile gisa erabili zen; hortaz, biodieselaren ekoizpen-prozesua kontuan hartu zen, soja-olioaren esterifikazioa, hain zuzen, metil esterra eta glizerola lortzeko. Datuak eskuratzeko Ecoinvent datu-basea erabili zen. Ikerketa honetan erabilitako unitate funtzionala 80  $\mu\text{m}$ -ko lodiera duen filmaren 1  $\text{m}^2$  izan zen.

Inbentarioko informazioan oinarrituta, ingurumen-eraginak Eco-Indicator 99ren bertsio hierarkikoren arabera ebaluatu ziren. 11 dira ebaluazio-metodo honetan aintzat hartutako inpaktu kategoriak: kartzinogenoak, organiko arnasgarriak, ez-organiko arnasgarriak, klima-aldaketa, erradiazioa, ozono-geruza, ekotoxikotasuna, azidotze/eutrofizazioa, lurraren erabilera, mineralak eta erregai fosilak. Normalizazioa maila europarrean gauzatu zen emisio garrantzitsuenak eguneratuak izanik (Goedkoop eta Spriensma, 2011) eta normalizazio-balioak karakterizazio-faktoreak inpaktu-kategoria bakoitzarentzako magnitudearekin zatituz zehaztu ziren.

## 2.14 ANALISI ESTADISTIKOA

Datuei faktore bakar baten bariantza-analisia (ANOVA) egin zitzaion SPSS softwarea (SPSS Statistic 23.0) erabiliz. Post hoc konparaketa anitzak Tukeyren edo Duncanen froga anizkoitzaren bidez egin ziren,  $p < 0,05$ -eko esangura mailarekin.

# 3.

## *kapitulua*

### **PLASTIFIKATZAILEAREN, pH-AREN ETA PROZESATZE-METODOAREN EFEKTUA SOJA-PROTEINAN OINARRITUTAKO FILMETAN**

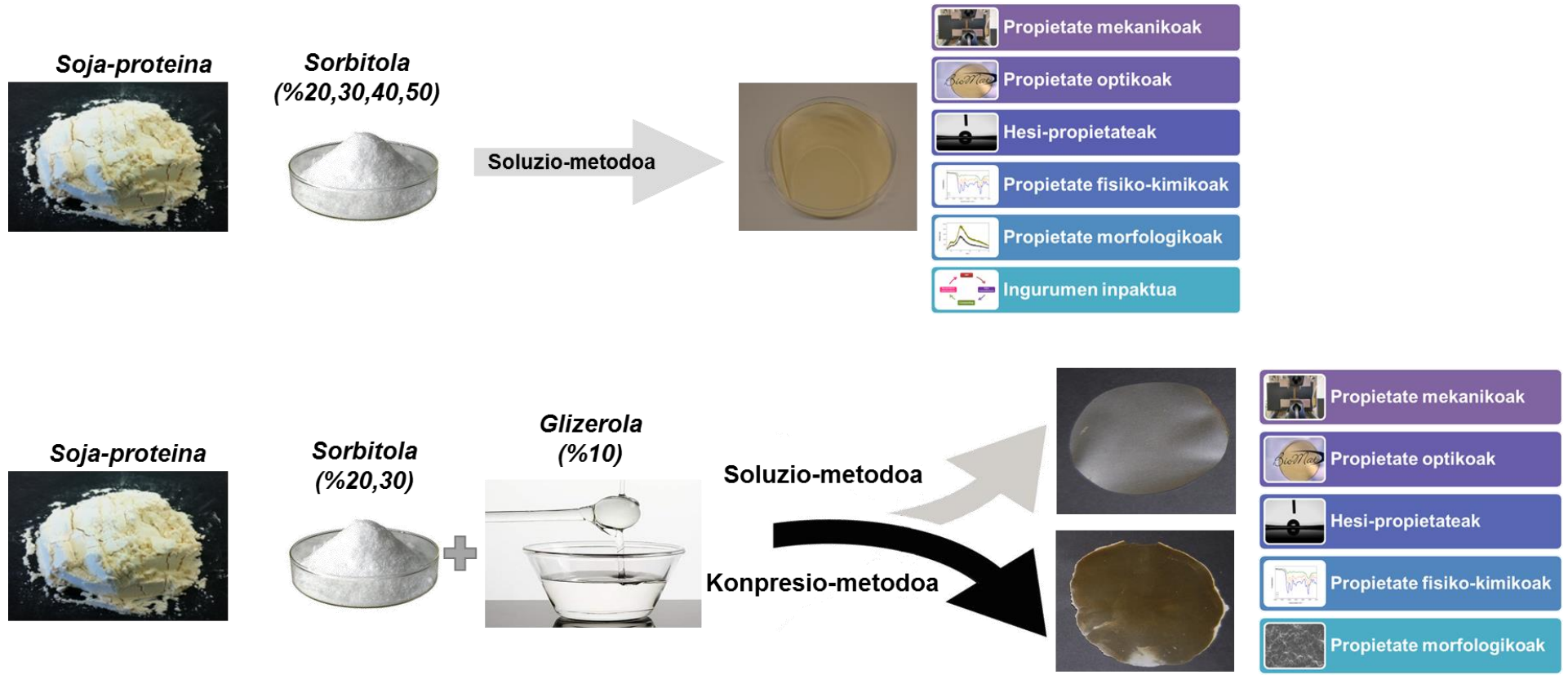
*Garrido T., Etxabide A., Leceta I., Cabezudo S., de la Caba K, Guerrero P. (2014)  
Valorization of soya by-products for sustainable packaging. Journal of Cleaner  
Production, 64, 228-233*

*Garrido T., Etxabide A., Peñalba M., de la Caba K, Guerrero P. (2013)  
Preparation and characterization of soy protein thin films: Processing-properties  
correlation. Materials Letters, 105, 110-112*



## LABURPENA

Naturatik eratorritako soja-proteina bezalako biopolimeroen erabilera irtenbide jasangarritzat jotzen da beraien jatorri berriztagarria eta izaera biodegradagarria dela eta. Gainera, ugariak, eskuragarriak eta filmak eratzeko gaitasun handia daukate. Hala ere, soja-proteinazko filmak, bestelako osagairik gabe, hauskorak dira eta horrek filmen prozesaketa zaila izatea egiten du. Film malguak lortzeko plastifikatzaileen gehikuntza konponbide eraginkorra da. Kapitulu honetan, soluzio-metodoaren eta konpresio-metodoaren bidez prestatutako soja-proteinan oinarritutako filmen amaierako propietateak aztertzeaz gain, prozesatze-baldintzen eta plastifikatzaile kantitatearen efektuak ikertu dira. Bestalde, ontziratze jasangarriak garatzeko ingurumen alderdiak aintzat hartu behar dira. Horretarako, bizi zikloaren analisisa (LCA) erabili da, produktu baten bizi zikloari lotu dakioken ingurumen eragina neurtzeko.



**I irudia.** 3. kapituluaren laburpen grafikoa

### 3.1 FILMEN PRESTAKETA

Alde batetik, 5 g soja-proteina isolatua (SPI) 100 mL ur distilatuan dispertsatu ziren, nahastea 30 minutuz berotu zen 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran eta %20, 30, 40 eta 50 sorbitol (Sor) gehitu eta dispertsioa beste 30 minutuz mantendu zen aurreko baldintza berdinetan. Soluzioaren pH-a 7 eta 10-era egokitu zen NaOH (0,1 M) erabiliz. Nahastea Petri ontzietan banatu eta giro tenperaturan ura lurruntzen utzi zen 48 orduz filma lortu arte. Prestatutako filmak Sor20, Sor30, Sor40 eta Sor50 gisa izendatu ziren.

Bestalde, 5 g soja-proteina 100 mL ur distilatuan dispertsatu ziren, nahastea 30 minutuz berotu zen 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran eta %20 edo 30 sorbitol eta %10 glizerol (Gly) gehitu ziren eta dispertsioa beste 30 minutuz mantendu zen aurreko baldintza berdinetan. Soluzioa Petri ontzietan isuri zen eta giro tenperaturan 48 orduz ura lurruntzen utzi zen, soluzio-metodoaren bidezko filmak osatzeko (W). Konpresio-metodoaren bidezko filmak lortzeko (D), %20 edo 30 sorbitol eta %10 glizerol soja-proteinarekin nahastu eta nahastea aluminiozko bi xaflen artean ipini zen eta bertan 12 MPa-eko presio ezarri zitzaion 2 minutuz 150 °C-an aurretik berotuta zegoen prentsan. Prestatutako filmak Sor20Gly10-W, Sor30Gly10-W, Sor20Gly10-D eta Sor30Gly10-D gisa izendatu ziren erabilitako sorbitol kantitatearen eta prozesatze-metodoaren funtziopean.

## 3.2 EMAITZAK

### 3.2.1 Filmen karakterizazioa

Hasteko, soluzio-metodoaren bidez eta sorbitolarekin plastifikatutako soja-proteinan oinarritutako filmen propietate funtzionalak aztertu ziren.

Propietate optikoek efektu garrantzitsua dute produktuaren kanpoko itxuran zuzeneko eragina dutelako (Monedero et al., 2009). Jakina den bezala, soja-proteinak horitasun kolore bereizgarri batekin dohatzen ditu filmak, **3.1. taulan** aurkezten den  $b^*$  parametroak erakusten duen bezala. Parametro hau, pH-arekin eta sorbitol kantitatearekin handitu zen. Gainera, kolore-desberdintasuna ( $\Delta E^*$ ) parametroaren bidez kolore totala aztertu zen eta filmen kolorea areagotu ( $p < 0,05$ ) zela ikusi zen, plastifikatzaile kantitatea eta pH-a handitu ahala. %20 sorbitolarekin eta pH 7an egindako filmak erreferentziatzat hartu ziren.

**3.1. taula.** SPI filmen kolore parametroen balioak sorbitolaren eta pH-aren funtziopean.

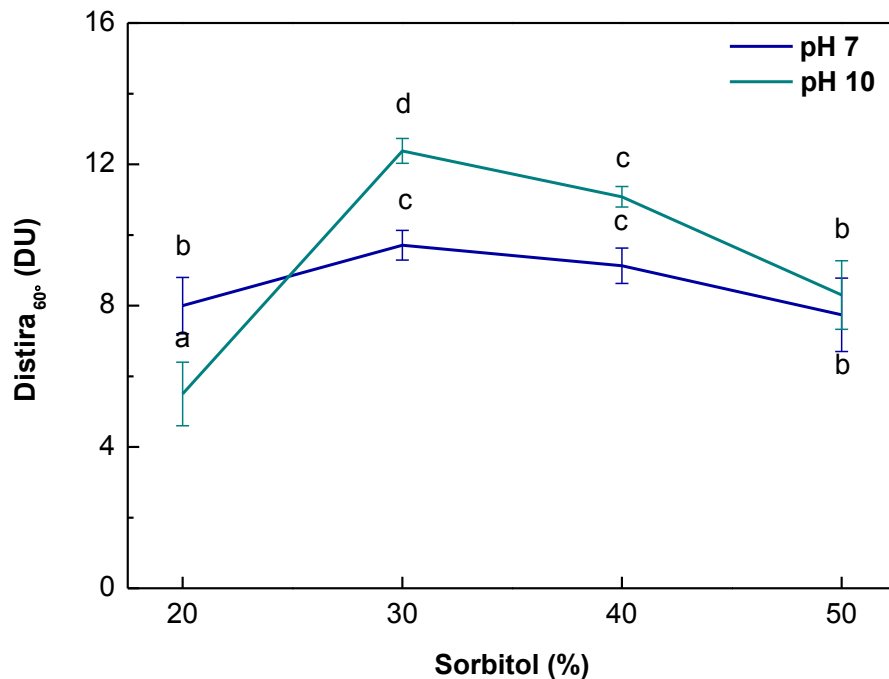
| pH | Filma | $L^*$                 | $a^*$              | $b^*$              | $\Delta E^*$ |
|----|-------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| 7  | Sor20 | $92,58 \pm 0,11^c$    | $0,05 \pm 0,05^d$  | $14,87 \pm 0,31^a$ |              |
|    | Sor30 | $93,22 \pm 0,45^c$    | $-0,42 \pm 0,07^c$ | $14,27 \pm 1,02^a$ | $0,99^a$     |
|    | Sor40 | $92,03 \pm 0,14^{bc}$ | $-0,01 \pm 0,04^d$ | $15,61 \pm 0,54^b$ | $0,92^a$     |
|    | Sor50 | $88,83 \pm 0,18^a$    | $0,36 \pm 0,13^c$  | $19,46 \pm 1,41^c$ | $5,94^c$     |
| 10 | Sor20 | $90,75 \pm 0,18^b$    | $-0,56 \pm 0,13^c$ | $17,85 \pm 0,70^c$ | $3,55^b$     |
|    | Sor30 | $89,07 \pm 0,16^a$    | $-0,96 \pm 0,04^b$ | $22,98 \pm 0,12^d$ | $8,89^d$     |
|    | Sor40 | $90,36 \pm 0,12^b$    | $-1,44 \pm 0,09^a$ | $21,25 \pm 0,47^c$ | $6,92^c$     |
|    | Sor50 | $89,31 \pm 0,13^a$    | $-1,11 \pm 0,07^b$ | $22,71 \pm 0,44^d$ | $8,57^d$     |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Distirak gainazalaren itxura ebaluatzen du eta gainazalak zuzeneko argia islatzeko duen gaitasuna deskribatzen du. Distira balioak 60 °-ko eraso-angeluan neurtu ziren eta emaitzak **3.1. irudian** aurkezten dira. Ikus daitekeen bezala, pH-ak ez zuen



filmen gainazalaren distiran eraginik izan ( $p < 0,05$ ). Balio guztiak 10 ingurukoak zirenez, filmak distira eskasekoak eta zimurtasun handikoak zirela esan daiteke.



**3.1. irudia.** Filmen distira balioak 60 °-an neurtuta, sorbitolaren eta pH-aren funtziopean.

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Propietate optikoei dagokienez, ultramore-ikuskor (UV-vis) espektroskopia filmen gardentasuna neurtzeko erabili zen. Balioak **3.2. taulan** erakusten dira. Film guztiek, batez ere plastifikatzaile kantitate altukoek, gardentasun balio altua zeukaten ( $p < 0,05$ ). Gardentasun balio hauek ontziratzeke erabiltzen den dentsitate baxuko polietilenoaren (LDPE) antzekoak dira.

UV-vis espektroskopia filmen argiarekiko erresistentzia neurtzeko ere erabili zen eta **3.2. taulan** argi transmisio balioak aurkezten dira. SPI-an oinarritutako filmek 200 nm-tik 280 nm-ra transmisio balio baxuak erakutsi zituzten eta horregatik UV tartean filmen hesi-propietate bikainak konfirmatu ziren. Honen arrazoia, proteinak

dituen zenbait kromoforoen presentzia da. Izan ere, tirosina (%3,79 Tyr), fenilalanina (%5,18 Phe) eta triptofano (%1,10 Trp) kromoforoek, 300 nm-tik behera argia absorbatzeko gaitasuna daukate (Li et al., 2004). Beraz, emaitza hauek soja-proteinan oinarritutako filmen prebentzio-ahalmena iradokitzen dute, UV argiak sortutako produktuaren oxidazioa atzeratu dezaketelako. Balio hauek film sintetikoak diren LDPE edo polipropileno orientaturenak (OPP) baino hobekak dira.

**3.2. taula.** SPI filmen gardentasun (T) ( $A_{600}/\text{mm}$ ) eta argi transmisio (%) balioak sorbitolaren eta pH-aren funtziopean, polimero sintetikoekin konparatuta.

| pH | Filma | Uhin-luzera<br>(nm) |        |        |        |        |        |        |        | T<br>( $A_{600}/\text{m}$ ) |
|----|-------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------|
|    |       | 200                 | 280    | 350    | 400    | 500    | 600    | 700    | 800    |                             |
| 7  | Sor20 | 0,007               | 0,013  | 2,153  | 7,549  | 10,485 | 11,604 | 12,199 | 12,497 | 6,929 <sup>d</sup>          |
|    | Sor30 | 0,011               | 0,030  | 2,473  | 7,250  | 9,877  | 10,992 | 11,681 | 12,109 | 6,801 <sup>d</sup>          |
|    | Sor40 | 0,016               | 0,026  | 3,084  | 10,661 | 15,653 | 18,178 | 20,029 | 21,403 | 3,939 <sup>a</sup>          |
|    | Sor50 | 0,005               | 0,010  | 0,896  | 4,442  | 6,995  | 8,064  | 8,730  | 9,171  | 4,173 <sup>a</sup>          |
| 10 | Sor20 | 0,006               | 0,014  | 1,772  | 6,089  | 12,578 | 14,260 | 15,167 | 15,592 | 5,754 <sup>c</sup>          |
|    | Sor30 | 0,008               | 0,018  | 1,582  | 6,296  | 13,657 | 15,397 | 16,274 | 16,626 | 5,079 <sup>c</sup>          |
|    | Sor40 | 0,004               | 0,019  | 1,477  | 6,033  | 13,660 | 15,418 | 16,291 | 16,654 | 4,562 <sup>b</sup>          |
|    | Sor50 | 0,017               | 0,019  | 1,023  | 4,167  | 9,355  | 10,572 | 11,197 | 11,471 | 4,497 <sup>b</sup>          |
|    | OPP   | 4,216               | 71,789 | 81,088 | 83,330 | 86,097 | 87,507 | 88,253 | 88,714 | 1,566                       |
|    | LDPE  | 0,452               | 27,645 | 35,760 | 39,976 | 45,530 | 49,807 | 53,237 | 56,329 | 4,263                       |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Filmak elikagaiak ontziratzeko erabili nahi badira, propietate optikoak ikertzeaz gain, urarekiko erresistentzia neurtzea garrantzitsua da. Urarekiko erresistentzia uraren kontaktu angelua neurtuz aztertu zen, filmak duen izaera hidrofoboaren/hidrofiloaren adierazlea delako. Izan ere, kontaktu angelua zenbat eta altuagoa izan, orduan eta altuagoa izango da filmaren izaera hidrofoboa. Testuinguru honetan, balioak 65 ° baino altuagoak badira filmek izaera hidrofoboa dutela esan daiteke (Vogles, 1998).

**3.3. taulan** SPI filmen kontaktu angeluaren balioak erakusten dira. pH 7ko zein pH 10eko filmen balioak 80 ° baino altuagoak zirenez, filmak hidrofoboak ziren. Gainera,

izaera hidrofoboa handitu zen bai plastifikatzailearen gehikuntzarekin ( $p < 0,05$ ) baita pH-aren handitzearekin ( $p < 0,05$ ) ere. Filmen portaera honek, proteinaren eta plastifikatzailearen arteko interakzioak pH basikoan hobeak direla iradokitzen du, gainazalean talde polar gutxiago daudelako.

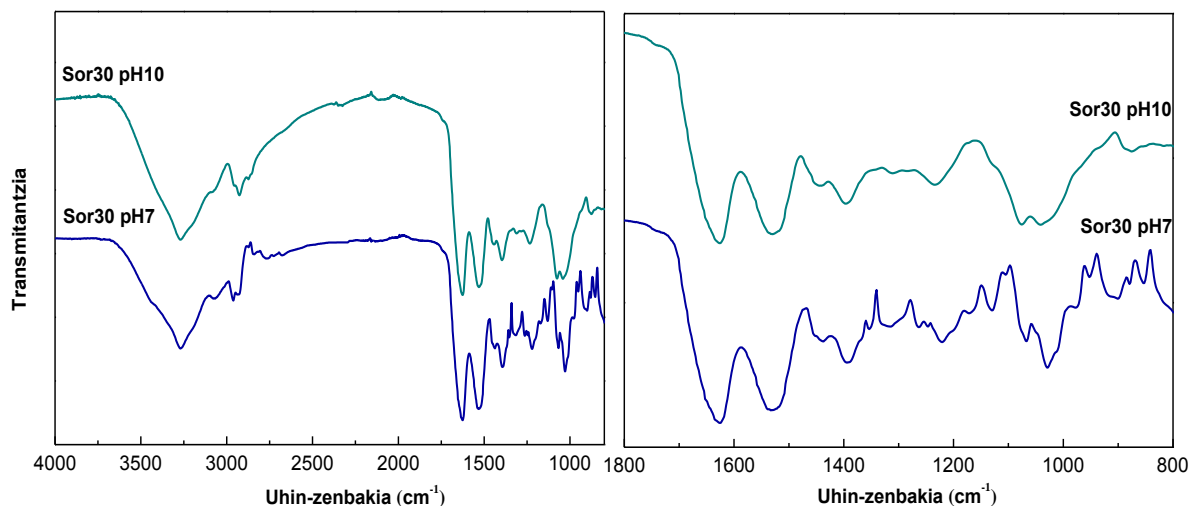
**3.3. taula.** SPI filmen uraren kontaktu angeluaren balioak sorbitolaren eta pH-aren funtziopean.

| pH | Filma | Uraren kontaktu angelua<br>(°) |
|----|-------|--------------------------------|
| 7  | Sor20 | 84,41 ± 3,65 <sup>ab</sup>     |
|    | Sor30 | 89,05 ± 6,01 <sup>abc</sup>    |
|    | Sor40 | 96,27 ± 3,60 <sup>bc</sup>     |
|    | Sor50 | 99,73 ± 1,44 <sup>cd</sup>     |
| 10 | Sor20 | 80,68 ± 7,68 <sup>a</sup>      |
|    | Sor30 | 92,68 ± 4,12 <sup>abc</sup>    |
|    | Sor40 | 101,33 ± 3,02 <sup>cd</sup>    |
|    | Sor50 | 112,03 ± 2,78 <sup>d</sup>     |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Soja-proteinaren eta plastifikatzailearen arteko bateragarritasuna FTIR analisiaren bidez ikertu zen. Espektroak **3.2. irudian** azaltzen dira. Absortzio banda nagusiak 800 eta 1630  $\text{cm}^{-1}$ -eko uhin zenbakien artean ikusi ziren. Hiru dira proteinaren absortzio-banda nagusiak: 1630  $\text{cm}^{-1}$ -ean, C=O loturaren luzatzearekin erlazionatutako banda (I amida); 1530  $\text{cm}^{-1}$ -ean, N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatutako banda (II amida); eta 1230  $\text{cm}^{-1}$ -ean, C-N loturaren luzatzearekin eta N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatutako banda (III amida) (Schmidt et al., 2005). Bestalde, bost dira sorbitolaren absortzio banda nagusiak: 850  $\text{cm}^{-1}$ -ean, 940  $\text{cm}^{-1}$ -ean eta 1000  $\text{cm}^{-1}$ -ean C-C loturarekin erlazionatutako bandak; eta 1050  $\text{cm}^{-1}$ -ean eta 1100  $\text{cm}^{-1}$ -ean C-O loturarekin erlazionatutako bandak (Basu et al., 2011). pH-aren aldaketak ez zuen proteinaren absortzio bandetan aldaketarik eraginik izan, hortaz, osagaien arteko erreakziorik gertatu ez zela egiaztatu zen. Hala ere, 1050 eta 1100  $\text{cm}^{-1}$ -een arteko

banden intentsitate erlatiboa aldatu zen, sorbitolaren eta proteinaren arteko interakzioak zeudela iradokiz.

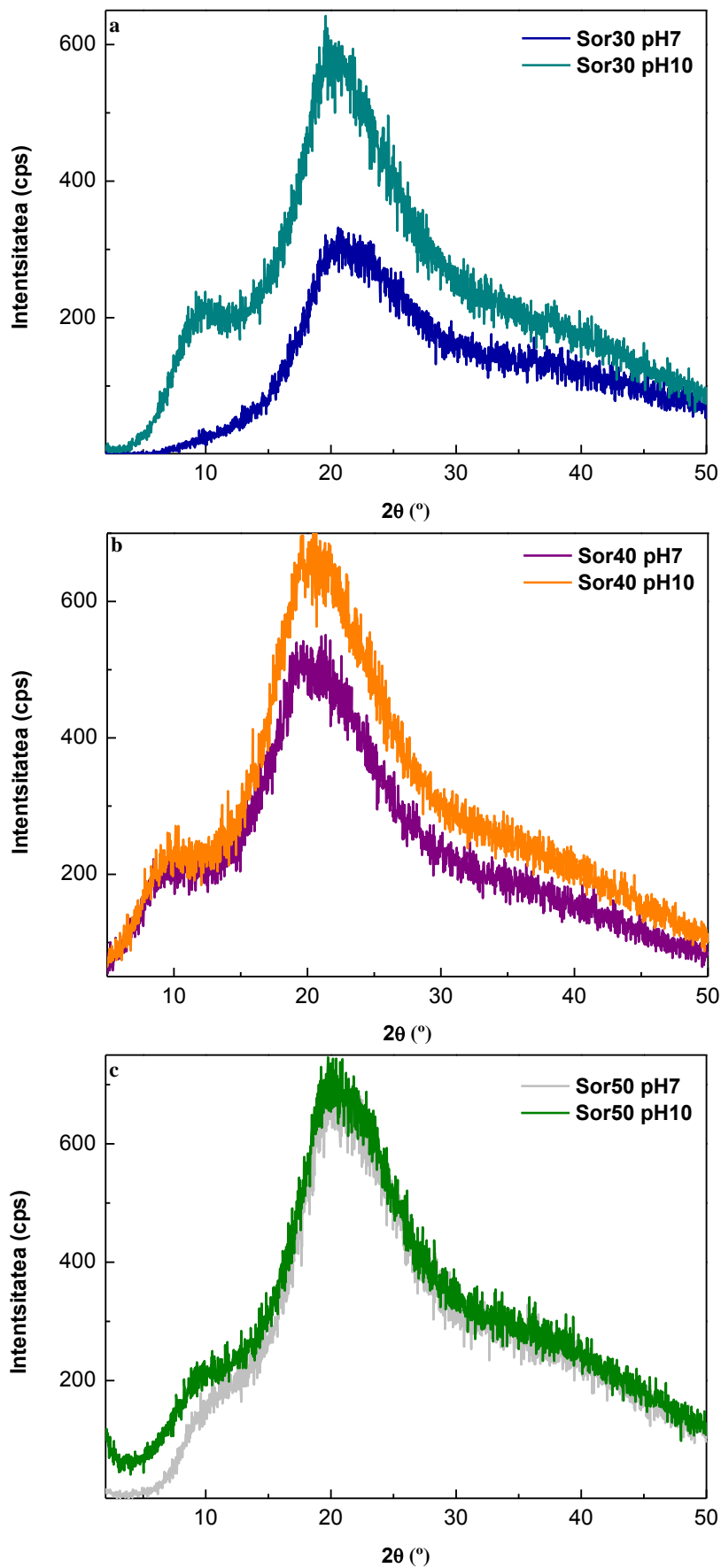


### 3.2. irudia.

%30 sorbitola duten SPI filmen FTIR espektroak pH-aren funtziopean.

Filmetan emandako egituraren aldaketak determinatzeko X-izpi analisia burutu zen. **3.3. irudian** ikusten denez, lagin guztiek  $2\theta = 21^\circ$ -an difrakzio-piko bat erakutsi zuten. Hau soja-proteinaren piko bereizgarria da eta proteinaren egitura ez ordenatuarekin erlazionatuta dago (Guerrero et al, 2011). Ikus daitekeenez, pH basikoan eta plastifikatzaile kantitate altuetan banda honen intentsitatea handitu zen. Intentsitate aldaketa horrek egituraren ordena handiagoa dela adierazten du, hortaz, proteinaren eta plastifikatzailearen arteko interakzioak zeudela berretsi zen, FTIR analisiaren bidez ikusi zen bezala.

Amaitzeko, filmen propietate mekanikoak **3.4. taulan** aurkezten dira. %20ko plastifikatzailea zuten filmak hauskorak zirenez, beraien propietate mekanikoak ezin izan ziren neurtu. Gainontzeko filmetan, nahiz eta proteinaren arteko interakzioek polimeroen kateen mugimendua murriztu, plastifikatzailearen gehikuntzak interakzio horiek apurtu zituen, molekularen mugimendua sustatuz.



**3.3. irudia.** a) %30 sorbitola (Sor30), b) %40 sorbitola (Sor40) eta c) %50 sorbitola (Sor50) duten filmen XPS analisia pH-aren funtziopean.

Horren ondorioz, trakzio-erresistentzia txikitu zen eta haustura-elongazioa handitu. Sorbitolaren portzentajea gora egin heinean, batez ere pH 10ean, haustura-elongazioa handiagoa ( $p < 0.05$ ) zen, izan ere, pH honetan proteinaren desnaturalizazioa handiagoa baita. Proteinaren desnaturalizazioak plastifikatzailearen hidroxilo taldeen eta proteinaren talde polarren arteko interakzioak errazten ditu, FTIR analisisian ikusi zen bezala. Ondorioz, kateen arteko bolumen librea handitu eta materialaren malgutasuna sustatu zirela ikusi zen. Gainera, sorbitolaren gehikuntzak filmen hezetasun-edukia handitu zuen, proteinaren kateen arteko indarrak ahulduz, Guerrero-k eta de la Caba-k (2010) pH desberdinekin garatutako soja-proteinazko filmetan erakutsi zuten bezala.

**3.4. taula.** SPI filmen trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB) sorbitolaren eta pH-aren funtziopean.

| pH | Filma | EB (%)               | TS (MPa)             |
|----|-------|----------------------|----------------------|
| 7  | 30Sor | $3,95 \pm 0,63^a$    | $5,91 \pm 0,27^{cd}$ |
|    | 40Sor | $48,79 \pm 7,64^c$   | $6,34 \pm 0,53^d$    |
|    | 50Sor | $24,91 \pm 10,62^b$  | $1,55 \pm 0,08^a$    |
| 10 | 30Sor | $29,66 \pm 9,11^b$   | $7,50 \pm 1,00^e$    |
|    | 40Sor | $105,61 \pm 5,21^c$  | $5,31 \pm 0,61^c$    |
|    | 50Sor | $117,83 \pm 22,92^d$ | $2,90 \pm 0,32^b$    |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Soluzio-metodoaren bidez eta sorbitolarekin plastifikatutako soja-proteinan oinarritutako filmen propietate funtzionalak aztertu ostean, emaitza hoberenak pH 10ean lortu zirela ondorioztatu zen, izan ere, pH horretan proteinaren desnaturalizazioa handiagoa da eta proteina eta plastifikatzailearen arteko interakzioak hobeto sustatzen dira. Gainera, ikusi zen %30 edo %40 izan zitezkeela plastifikatzaile kantitate optimoak filmen propietate egokiak lortzeko. Aurrekoa kontuan hartuz, SPI filmak prestatu ziren pH 10ean eta %20a edo %30a sorbitol eta %10a glizerol plastifikatzaileak gehitzen.

Plastifikatzaileaz gain, polimeroa prozesatzeko metodoa (soluzioa edo konpresioa) filmaren amaierako propietateak hobetzeko kontuan izan beharreko faktore garrantzitsua da. Soluzio-metodoaren bidez garatutako soja-proteinan oinarritutako filmen karakterizazioa beste ikerkuntza-lan batzuetan ikertu arren (Lee eta Kim, 2010; Rhim et al., 2006; Wang et al., 2012), bi prozesuen arteko konparaketa ez da sakon aztertu. Hau jakinda, kapitulu honetan prozesatze-metodo desberdinak erabiltzean lortutako filmen propietate optikoak, mekanikoak eta hesi-propietateak aztertu eta alderatu dira.

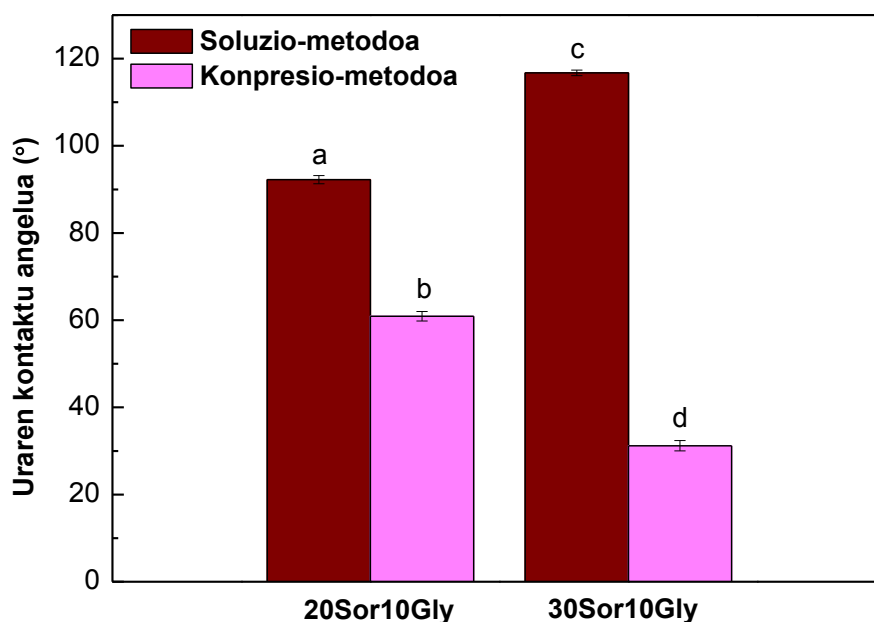
Hasteko, filmen propietate optikoak aztertu ziren eta kolorea, distira eta gardentasun balioak **3.5. taulan** erakusten dira. Jakina denez, temperaturak ere kolorean eragina du, horregatik konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmek soluzio-metodoaren bidez prestatutakoak baino  $b^*$  ( $p < 0,05$ ) eta  $\Delta E^*$  ( $p < 0,05$ ) balio altuagoak erakutsi zituzten. Bestalde, konpresio bidezko filmak distiratsuenak ( $p < 0,05$ ) ziren, presioaren eraginez zimurtasun txikiko gainazalak lortu zirelako. Gardentasunari dagokionez, konpresio-metodoaren bidez lorturiko filmek balio altuak erakutsi zituzten ( $p < 0,05$ ). Gardentasun balio hauek eta ontziratze erabiltzen den OPP-renak antzekoak dira.

**3.5. taula.** Soja-proteinan oinarritutako filmen propietate optikoak prozesatze-metodoaren funtziopean.

| Filma        | $L^*$                     | $a^*$                     | $b^*$                     | $\Delta E^*$       | Distira <sub>60°</sub><br>(DU) | T                 |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------|
| Sor20Gly10-W | 88,81 ± 1,37 <sup>a</sup> | -0,89 ± 0,06 <sup>a</sup> | 20,24 ± 0,49 <sup>a</sup> | 3,09 <sup>a</sup>  | 10,42 ± 0,61 <sup>a</sup>      | 6,57 <sup>a</sup> |
| Sor30Gly10-W | 90,01 ± 0,75 <sup>a</sup> | -1,78 ± 0,12 <sup>b</sup> | 21,43 ± 1,95 <sup>a</sup> | 3,86 <sup>a</sup>  | 9,36 ± 0,32 <sup>a</sup>       | 3,44 <sup>b</sup> |
| Sor20Gly10-D | 82,02 ± 0,56 <sup>b</sup> | 1,42 ± 0,61 <sup>b</sup>  | 45,20 ± 1,80 <sup>b</sup> | 28,77 <sup>b</sup> | 18,10 ± 3,83 <sup>b</sup>      | 2,06 <sup>c</sup> |
| Sor30Gly10-D | 79,53 ± 0,22 <sup>b</sup> | 2,93 ± 0,77 <sup>c</sup>  | 47,73 ± 1,89 <sup>b</sup> | 32,11 <sup>b</sup> | 17,40 ± 2,94 <sup>b</sup>      | 1,51 <sup>c</sup> |

<sup>a,c</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Filmek urarekiko duten erresistentzia neurtzeko uraren kontaktu angelua aztertu zen. Emaitzak **3.4. irudian** aurkezten dira. Ikus daitekeen bezala, soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmen balioak  $90^\circ$  baino altuagoak ( $p < 0.05$ ) ziren, gainazalaren ezaugarri hidrofoboa adieraziz. Soluzio-metodoa erabiltzerakoan, molekulek berrantolatzeke denbora gehiago dute eta horrek, proteina eta sorbitolaren arteko interakzioak sustatzen ditu filmaren hidrofobotasuna handituz. Gainera, ezaugarri hidrofoboa sorbitol kantitatearekin handitu zen ( $p < 0,05$ ), gainazalerantz talde polar gutxiago orientatuta daudela adieraziz.



**3.4. irudia.** Soja-proteinan oinarritutako filmen urarekiko kontaktu angeluak prozesatze-metodoaren funtziopean <sup>ad</sup>Lerro berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Soja-proteinan oinarritutako filmen propietate mekanikoak **3.6. taulan** aurkezten dira. Orokorrean, soluzio-metodoarekin prestatutako filmek konpresio-metodo bidez prestatutakoak baino haustura-elongazio balio altuagoak erakutsi zituzten, nahiz eta trakzio erresistentzia-balioak antzekoak izan ( $p < 0,05$ ). Bestalde, sorbitol kantitatea



handitu heinean, haustura-elongazioaren balio altuagoak ( $p < 0,05$ ) lortu ziren. Izan ere, plastifikatzaileak proteinaren kateen arteko interakzioak saihesten ditu, kateen arteko bolumen librea handituz eta ondorioz, material malguago bat lortuz.

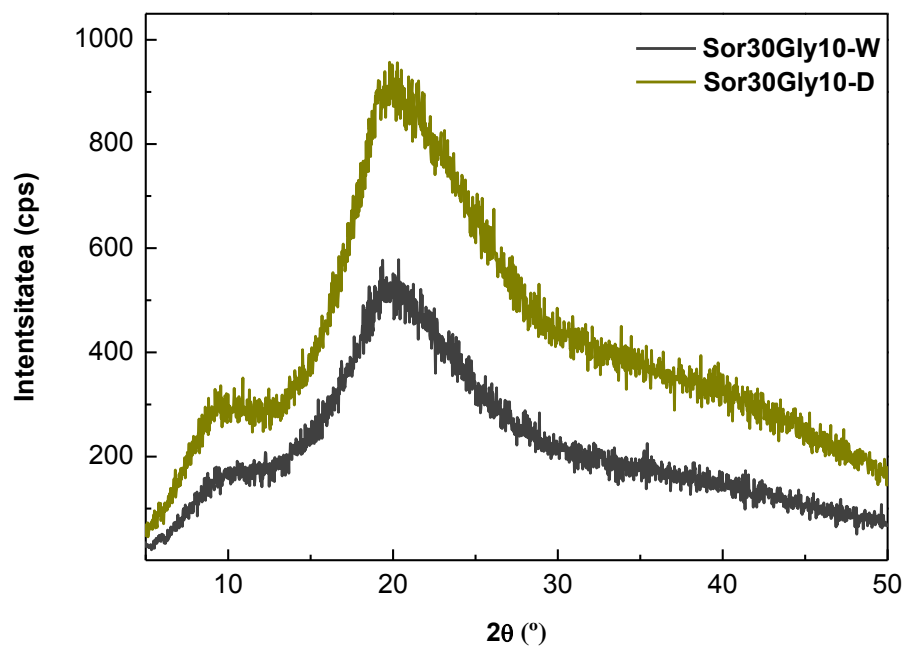
**3.6. taula.** Soja-proteinan oinarritutako filmen haustura-elongazio (EB) eta trakzio-erresistentzia (TS) balioak prozesatze-metodoaren funtziopean.

| <b>Filma</b>        | <b>EB<br/>(%)</b>          | <b>TS<br/>(MPa)</b>      |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Sor20Gly10-W</b> | 76,37 ± 5,40 <sup>b</sup>  | 8,49 ± 0,21 <sup>a</sup> |
| <b>Sor30Gly10-W</b> | 105,80 ± 6,74 <sup>a</sup> | 5,39 ± 0,96 <sup>b</sup> |
| <b>Sor20Gly10-D</b> | 11,61 ± 1,03 <sup>d</sup>  | 8,06 ± 0,70 <sup>a</sup> |
| <b>Sor30Gly10-D</b> | 34,55 ± 4,73 <sup>c</sup>  | 5,46 ± 1,46 <sup>b</sup> |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Amaitzeko, filmen egitura aztertzeko, X-izpien difrakzio teknika erabili zen.

**3.5. irudian** ikusten den bezala, lagin guztiek  $2\theta = 21^\circ$ -an maximoa duen piko bakar bat erakutsi zuten. Piko hau, soja-proteinaren orden eskasarekin erlazionatuta zegoen (Guerrero et al., 2012). Nahiz eta lan honetan ez den X-izpien difrakzioan analisi kuantitatiboa egin, konpresio-metodoaren bidez lortutako filmetan intentsitate handiagoko seinalea ikusi zen. Emaidza hauekin, konpresio-filmek orden handiagoko egitura zutela eta proteina eta plastifikatzailearen arteko interakzioak hobeak zirela ondoriozta daiteke, propietate mekanikoekin bat etorritz.



**3.5. irudia.** %30 sorbitola eta %10 glizerola duten soja-proteinan oinarritutako filmen X-izpien difrakzio patroia prozesatze-metodoaren funtziopean.

### 3.2.2 Ingurumen inpaktua

Soja azpiproduktutik sortutako filmen eta polipropilenoazko (PP) filmen arteko ingurumen ebaluazioa egiteko, Eco-indicator 99 metodoa erabili zen. Ebaluazio-metodo honek 11 inpaktu-kategoria ditu: kartzinogenoak, organiko arnasgarriak, ez organiko arnasgarriak, klima-aldaketa, erradiazioa, ozono-geruza, ekotoxikotasuna, azidotzea/eutrofizazioa, lurraren erabilera, mineralak eta erregai fosilak. Aztertutako sistemak lau etapa nagusi hartzen ditu barne: lehengaien erauzketa, filmen manufactura, erabilera eta bizi amaiera. Lan honetan lortutako soja-proteinan oinarrituriko filmak biodegradagarriak direnez, hondakinen kudeaketan konpostajea erabili zen. Bestalde, Eusko Jaurlaritzako Ingurumen eta Lurralde Politika Sailaren arabera (Eusko Jaurlaritza, 2008), Euskal Herriko hiri hondakin solidoen %21 birziklatzen da, %58 zabortegietan kudeatzen da, eta %21 erraustegietara doa; hortaz, PP-filmek ingurumen

inpaktua aztertzerakoan, aipatutako portzentajeak erabili ziren. Ikertutako inpaktu-kategorien garrantzi erlatiboa aintzat hartzeko, inpaktu balio normalizatuak **3.7. taulan** azaltzen dira. Normalizazioaren pausoan, karakterizazio-faktoreak magnitude batez zatitu ziren inpaktu-kategoria bakoitzeko. Nahiz eta ISO-k (International Organization for Standardisation) ez duen normalizazioa derrigorrezko pausotzat hartzen, SETAC-ek (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) hala gomendatzen du; izan ere, karakterizazioaren pausoan lortutako balioak unitate desberdinetan daude eta aldiz normalizazioaren pausoan lortutakoak ez dute unitaterik, balioen arteko konparaketa ahalbidetuz. Hau, kitosanoan oinarritutako filmentzat Leceta eta lankideek (2013) egindako lanean ikus daiteke.

**3.7. taula.** SPI eta PP filmen ingurumen ebaluazioaren emaitza normalizatuak aztertutako bizi amaieraren arabera.

| Inpaktu-kategoria    | PP<br>zabortegia      | PP<br>birziklapena    | PP<br>errausketa      | SPI<br>konpostajea    |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kartzinogenoak       | $4,50 \cdot 10^{-6}$  | $0,13 \cdot 10^{-6}$  | $0,38 \cdot 10^{-6}$  | $3,68 \cdot 10^{-6}$  |
| Org. arnasgarriak    | $1,12 \cdot 10^{-8}$  | $0,19 \cdot 10^{-8}$  | $1,12 \cdot 10^{-8}$  | $2,67 \cdot 10^{-8}$  |
| Ez-org. arnasgarriak | $2,08 \cdot 10^{-6}$  | $1,34 \cdot 10^{-6}$  | $2,14 \cdot 10^{-6}$  | $19,2 \cdot 10^{-6}$  |
| Klima-aldaketa       | $1,10 \cdot 10^{-6}$  | $0,44 \cdot 10^{-6}$  | $2,17 \cdot 10^{-6}$  | $2,03 \cdot 10^{-6}$  |
| Erradiazioa          | $1,32 \cdot 10^{-8}$  | $2,12 \cdot 10^{-8}$  | $1,32 \cdot 10^{-8}$  | $10,9 \cdot 10^{-8}$  |
| Ozono-geruza         | $0,73 \cdot 10^{-10}$ | $1,02 \cdot 10^{-10}$ | $0,69 \cdot 10^{-10}$ | $6,14 \cdot 10^{-10}$ |
| Ekotoxikotasuna      | $2,19 \cdot 10^{-7}$  | $0,83 \cdot 10^{-7}$  | $1,05 \cdot 10^{-7}$  | $3,09 \cdot 10^{-7}$  |
| Azido./Eutrof.       | $1,94 \cdot 10^{-7}$  | $1,13 \cdot 10^{-7}$  | $2,05 \cdot 10^{-7}$  | $9,95 \cdot 10^{-7}$  |
| Lurraren erabilera   | $1,69 \cdot 10^{-7}$  | $1,73 \cdot 10^{-7}$  | $1,59 \cdot 10^{-7}$  | $7,30 \cdot 10^{-7}$  |
| Mineralak            | $5,61 \cdot 10^{-8}$  | $6,34 \cdot 10^{-8}$  | $5,71 \cdot 10^{-8}$  | $19,4 \cdot 10^{-8}$  |
| Erregai fosilak      | $3,84 \cdot 10^{-5}$  | $0,73 \cdot 10^{-5}$  | $3,84 \cdot 10^{-5}$  | $1,65 \cdot 10^{-5}$  |

PP filmek ez-organiko arnasgarrien, klima-aldaketaren eta erregai-fosilen kategorietan ingurumen kalte handiena erakutsi zuten. Inpaktu-kategoria hauen balio altuak lehengaiaren erauzketa prozesuagatik izan ziren. PP-aren birziklatzeak, aipaturiko hiru inpaktu-kategorietan balio baxuagoak erakutsi zituen. Bestalde, soja-proteinan oinarritutako filmen kasuan, fase kutsatzaileena SPI lortzeko sojaren laborantza izan zen. Izan ere, fase honek dieselaren erabilera, makinak, ongarrizko

gaiak eta pestizidak kontuan hartzen ditu. Gainera, lurren hornitzea eta eraldatzea eta erabilitako makinariaren emisioak inpaktu-iturri nagusienak zirela ikusi zen.

## ONDORIOAK

Soja-proteinan oinarritutako filmak prestatu ziren sorbitola plastifikatzaile gisa erabiliz. Film gardenak lortzeaz gain, UV argiarekiko hesi-propietate bikainak zituztela ikusi zen. Oro har, emaitza hoberenak pH 10ean prestatutako filmetan lortu ziren, pH honetan proteinaren egitura errazago zabaldu zen, proteina eta plastifikatzailearen arteko interakzioak sustatuz. Interakzio hauek, espektro infragorriaren bidez ikusi ziren eta bertan amidako banden intentsitate erlatiboaren aldaketak hauteman ziren. Gainera, distira balio baxuak eta uraren kontaktu angelu altuak lortu ziren, filmen zimurtasuna eta izaera hidrofoboa erakutsiz, hurrenez hurren.

Behin plastifikatzaile kantitate optimoa aztertuta, soja-proteinan oinarritutako filmak soluzio- eta konpresio-metodoen bidez prestatu ziren sorbitola eta glizerola plastifikatzaile gisa erabiliz. Ikusi den moduan, erabilitako prozesatze-metodoaren arabera filmen propietate funtzional desberdinak lortu ziren. Propietate optikoei dagokienez, konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmak gardenagoak eta distiratsuagoak ziren; aldiz, soluzio-metodoaren bidez prestatutakoak malguagoak eta hidrofoboagoak ziren. Horren ondorioz, filmen aplikazioaren arabera metodo bat edo bestea erabil daiteke.

Ingurumen analisiari dagokionez, SPI filmen ingurumen karga murriztu behar dela ondorioztatu zen. Hortaz, erauzketa prozesua eta filmen prestaketa optimizatzea lagungarria izango lirateke, ingurumenarekiko abantailak areagotzeko eta jasangarriak diren material hauek petroliotik lortutako filmak ordezkatzeko.



# 4.

*kapitulua*

## **SOLUZIO-METODOA VS KONPRESIO- METODOA: FILM JASANGARRIAK GARATZEA**

*Garrido T., Leceta I., Cabezudo S., Guerrero P., de la Caba K. (2016)*

*Tailoring soy protein film properties by selecting casting or compression as processing methods. European Polymer Journal, 85, 499-507*

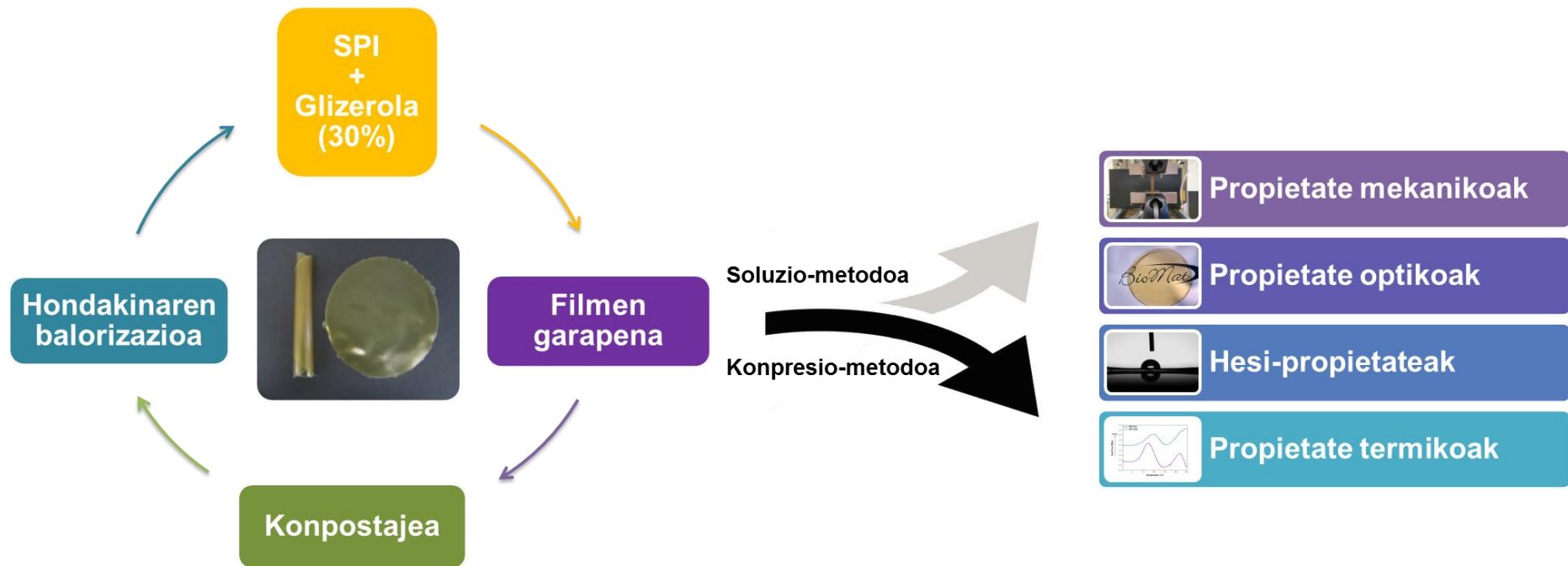




## LABURPENA

Plastifikatzaile kantitatea, mota eta prozesaketa baldintzak aztertuta ostean, kapitulu honetan, %30eko glizerolarekin plastifikatutako filmen azterketa sakon bat erakusten da; izan ere, prozesaketa-metodoa filmen propietateetan eta ingurumen inpaktuetan duen efektua aztertu da. Horretarako, propietate termikoetan, optikoetan, hesi-propietateetan eta propietate mekanikoetan gertatutako egitura aldaketak aztertu dira, baita filma sortzean parte hartzen duten indar barne-molekularrak ere. Soluzio-metodoa eta konpresio-metodoa izan dira aztertutako bi prozesatze-metodoak.

Filmek propietateez gain, manufaktura-prozesu desberdina jasan duten filmek ingurumenean eragiten dituzten inpaktuak aztertzeak informazio gehigarria eman dezakeenez, kapitulu honetan ere bizi zikloaren analisia egin da filmek prozesaketa desberdinen artean aukera hobea hautatzeko.



**I irudia.** 4. kapituluaren laburpen grafikoa

## 4.1 FILMEN PRESTAKETA

Soja proteina (SPI) filmen prestaketan bi prozesatze-metodo ikertu ziren. Alde batetik, metodo hezea (W) aztertu zen. Horretarako, 5 g soja-proteina 100 mL ur distilatuan dispertsatu ziren eta nahastea 30 minutuz berotu zen 80 °C-an berogailu magnetikoa erabiliz. Ondoren, %30 glizerola (Gly) gehitu zen eta dispertsioa beste 30 minutuz mantendu zen aurreko baldintza berdinetan. Soluzioa Petri ontzietan isuri zen eta giro tenperaturan ura lurruntzen utzi zen SPI-W filma osatzeko.

Beste aldetik, metodo lehorra (D) aztertu zen. Kasu honetan, SPI eta glizerola 5 minutuz eta 1500 bira minutuko abiadurarekin nahastu ziren Stephan UMC 5 nahasgailua erabiliz. Nahastea aluminiozko bi xaflen artean ipini zen eta 12 MPa-eko presio ezarri zitzaion 2 minutuz 150 °C-an aurretik berotutako prentsan.

## 4.2. EMAITZAK

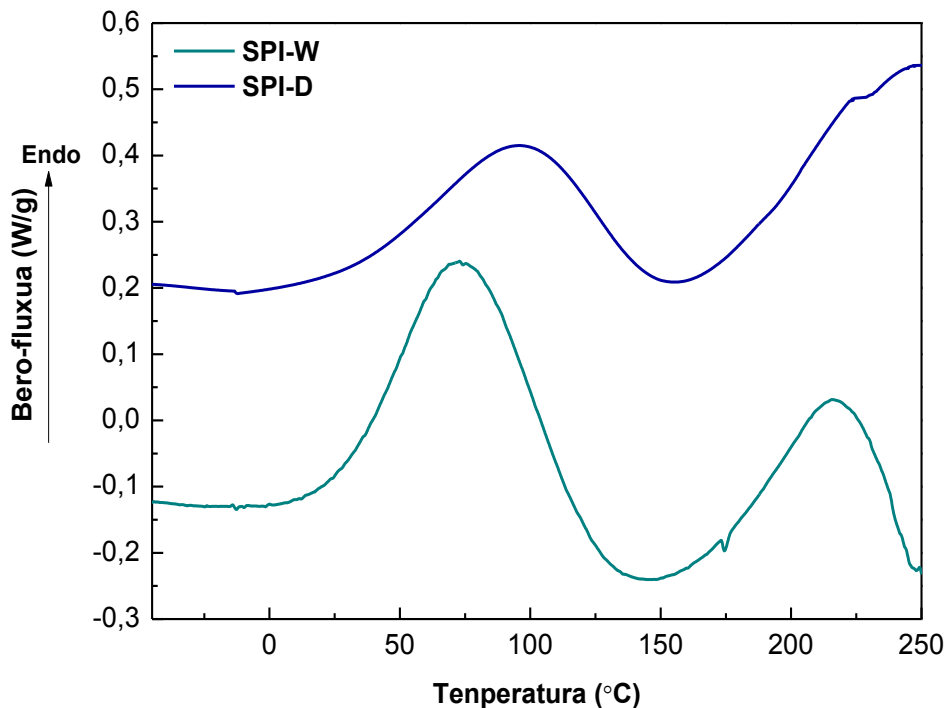
Prozesatze-metodo desberdinak erabiltzen direnean filmen propietateak aldatzen dira. Horren arrazoia, filma osatzen den bitartean erabilitako prozesatze-denbora eta temperatura desberdinen ondorioz gertaturiko proteina-kateen kokapen desberdina da. Prozesatze-parametro hauek elkarrekintza barne-molekularrak eta molekulen arteko interakzioak eragiten dituzte, filmen propietateetan eraginez.

### 4.2.1 Filmek karakterizazioa

Prozesatze-metodoek filmek propietateetan duten eragina aztertzeko desnaturalizazio-maila ezagutzea garrantzitsua da; izan ere, proteinaren elkarrekintza barne-molekularrak eta molekulen arteko interakzioak proteinaren kateen zabaltzearen eta desnaturalizazioaren erantzuleak dira. Desnaturalizazio-maila DSC termograman ikusten diren pikoen intentsitatearekin erlazionatuta dago. Soluzio-metodoaren eta konpresio-metodoaren bidez garatutako SPI filmek termogramak **4.1. irudian** erakusten dira.

SPI-ren frakzio nagusiak 2S, 7S, 11S eta 15S dira. Hala ere, 7S kongluzinak eta 11S gluzinak proteina osoaren %70a osatzen dute (Tansaz eta Boccaccini, 2016). **4.1. irudian** ikusten denez, 90 °C inguruan piko endotermiko bat agertu zen pisu molekular baxuko frakzioaren (7S) desnaturalizazio termikoari zegokiona. 225 °C-an, aldiz, pisu molekular altuko frakziorik (11S) zegokion pikoa ikusi zen (Mo eta Sun, 2012). Desnaturalizazio tenperatura alderantziz erlaziona daiteke hezetasun edukiarekin, hau da, hezetasun edukia txikitu ahala, desnaturalizazio tenperatura handituz doa. Gauzak horrela, SPI-D filmetan ikusitako bi pikoek tenperatura altuetara jo zuten; izan

ere, bere hezetasun edukia txikiagoa zen SPI-W filmekin konparatuz, **4.1. taulan** ikusten den bezala.



**4.1. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen DSC termogramak.

DSC analisisian ikusi zenez, prozesuan zehar erabilitako temperatura altuek SPI-D filmen desnaturalizatzeko-maila handitu zuten, proteinaren eta plastifikatzailearen arteko interakzioak sustatuz, elkarrekintzak handituz, hezetasun absorzioa murriztuz eta ondorioz, MC balio txikiagoak lortu ziren (Carpiné et al., 2015; Qu et al., 2015).

**4.1. taulan** ikusten den moduan, SPI-W filmek SPI-D filmek baino uraren kontaktu angelu balio handiagoak erakutsi zituzten. Horren arrazoia, prozesatze-denbora izan zen; izan ere, prozesatze-denbora luzeagoak erabiltzerakoan proteinaren kateen berrantolaketa sustatu zen eta talde ez-polarrek gainazalerantz orientatzeko gai izan ziren.

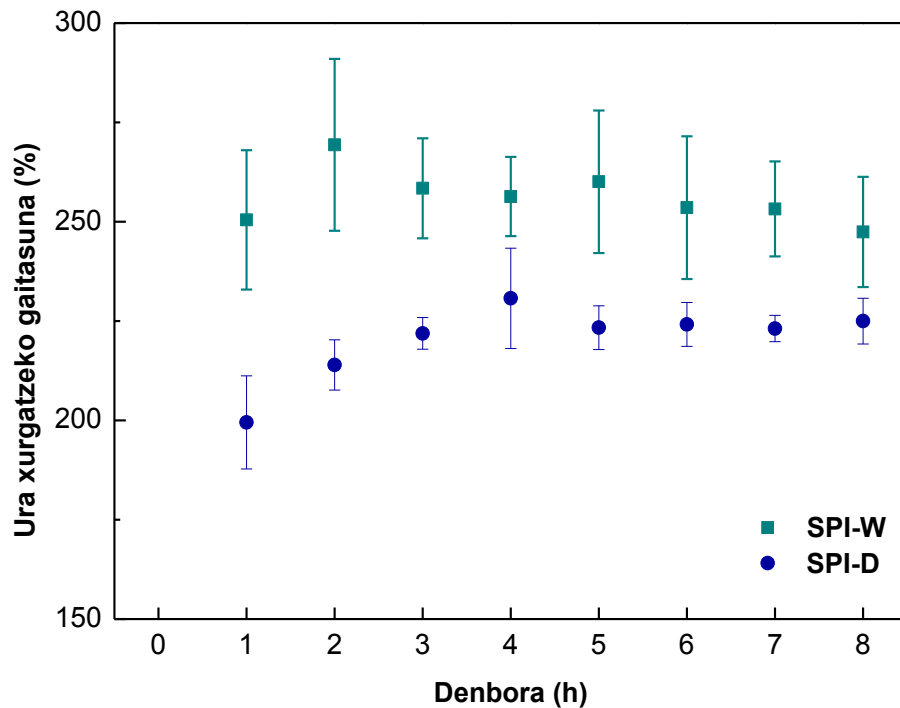
**4.1. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen hezetasun edukia (MC) eta uraren kontaktu angelua (WCA).

| <b>Filma</b> | <b>MC<br/>(%)</b> | <b>WCA<br/>(°)</b> |
|--------------|-------------------|--------------------|
| <b>SPI-W</b> | 17,5 ± 0,8        | 99 ± 2             |
| <b>SPI-D</b> | 11,6 ± 0,1        | 35 ± 4             |

Filmek ura xurgatzeko ahalmenari dagokionez (WU), kasu guztietan oreka egoera azkar samarra lortu zen. Emaitzak **4.2. irudian** erakusten dira. Filmek handitze egoera hori, dispartzioan dagoen disolbatzailearen potentzial kimikoa eta disolbatzaile librearen potentzial kimikoa berdinak direnean gertatzen da (Hamman eta Schmid, 2014). SPI-W kasuan, hau uretan murgildu eta WU balioak %250 inguruan konstante mantendu ziren lehenengo 8 orduetan. Bestalde, SPI-D filmek lehenengo 4 orduetan %225ko maximoa lortu zuten, gainontzeko orduetan balio hau konstante mantenduz. Emaitza hauek saretzearekin erlazionatu daitezke; izan ere, saretze-maila handia denean, SPI-D filmek kasuan gertatzen den bezala, egitura trinkoago bat lortzen da eta ura xurgatzeko gaitasuna murrizten da. Gertaera hau beste autore batzuek ere aztertua izan da (Jerez et al., 2007).

Beste aldetik, kolorea, distira eta gardentasuna aztertu ziren eta lortutako emaitzak **4.2. taulan** agertzen dira. Ikus daitezkeen bezala, SPI-W filmek argitasunarekin erlazionatuta dagoen  $L^*$  balio altuak erakutsi zituzten. SPI-D filmek, ordea,  $L^*$  balio baxuagoak erakutsi zituzten. Hala ere, argitasunaren murriztea  $a^*$  eta  $b^*$  balioen igoerarekin bat dator.  $a^*$  parametroari dagokionez, SPI-D filmak berdeagoak ziren, ordea, SPI-W filmek kolore gorrixkagoa zeukaten; izan ere, SPI-W filmek kasuan  $a^*$  parametroaren balioak handiagoak ziren. Aurreko kapituluan aipatu den moduan, soja-proteinak hori kolore bereizgarri batekin hornitzen dituzten filmak eta hau  $b^*$  parametroak erakusten du. Kasu honetan, konpresio-metodoaren bidez garatutako filmek  $b^*$  balio

altuagoak zituzten erabilitako temperatura altuak direla eta. Gainera, SPI-D filmak distiratsuagoak ziren.



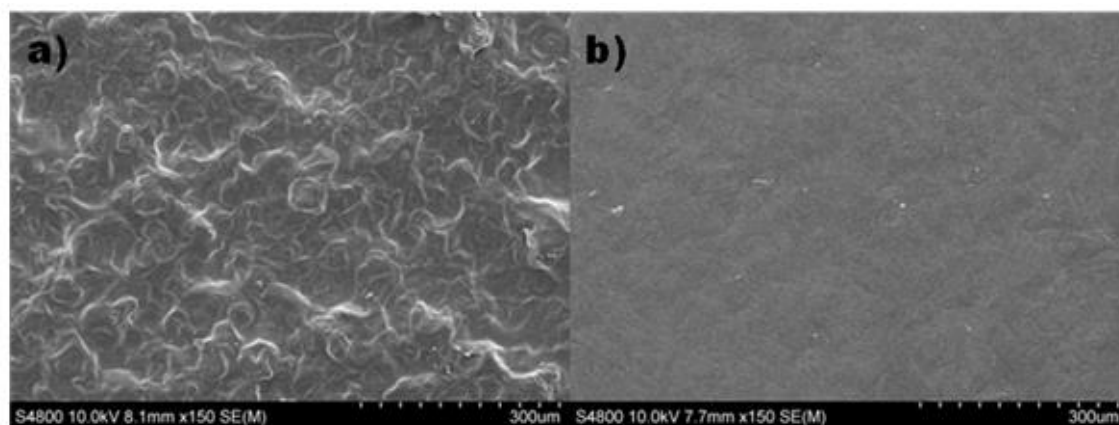
**4.2. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen ura xurgatzeko gaitasuna.

**4.2. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen kolorea ( $L^*$ ,  $a^*$  eta  $b^*$ ), distira eta gardentasuna.

| Filma | $L^*$            | $a^*$            | $b^*$            | Distira <sub>60°</sub><br>(DU) | T<br>( $A_{600/mm}$ ) |
|-------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------|
| SPI-W | $90,78 \pm 0,37$ | $-1,26 \pm 0,06$ | $20,98 \pm 0,27$ | $10,50 \pm 0,09$               | 8,71                  |
| SPI-D | $78,94 \pm 0,80$ | $2,84 \pm 0,60$  | $46,53 \pm 1,20$ | $33,60 \pm 1,23$               | 1,16                  |

Distira filmen gainazalaren zimurtasunarekin zuzenki erlazionatuta dagoenez (Villalobos et al., 2005), **4.3. irudian** agertzen diren SEM irudiak aztertu ziren. Ikusten denez, SPI-D filmek gainazal leunagoa aurkeztu zuten manufacturan ezarritako presioa dela eta.

Gardentasuna filmaren homogeneotasunaren eta osagaien arteko bateragarritasunaren adierazlea da. Film guztiak gardenak izan ziren baina SPI-D filmek T balio baxuagoak zituzten, hau da, bere gardentasuna altuagoa zen. Horren arrazoia, SPI-D filmetan proteina eta plastifikatzailearen arteko bateragarritasuna hobea izan zen. Emaitza hauek **4.3. taulan** agertzen diren propietate mekanikoen balioak berretsi zituzten.



**4.3. irudia.** a) SPI-W eta b) SPI-D filmen gainazalaren SEM irudiak.

SPI filmen erantzun mekanikoa ikertu zen eta horretarako haustura-elongazioa (EB), trakzio-erresistentzia (TS) eta modulu elastikoa (EM) aztertu ziren. Jakina den bezala, propietate mekanikoak filmak garatzeko erabilitako material motarekin eta osagaien arteko interakzioekin erlazionatuta daude. Hori dela eta, propietate mekanikoak prozesatze-metodoaren arabera aldatu daitezke (Tian et al., 2011). Ikusten den bezala, SPI-D filmek EB, TS eta EM balio altuagoak erakutsi zituzten; izan ere, DSC analisisian ikusi zen bezala, konpresio-metodoa erabiltzerakoan proteinaren desnaturalizatzeko-maila handiagoa zen, SPI eta glizerolaren arteko interakzioak sustatuz; horrela, hiru dimentsiotako sarea osatu zen eta propietate mekaniko hobeak lortu ziren.



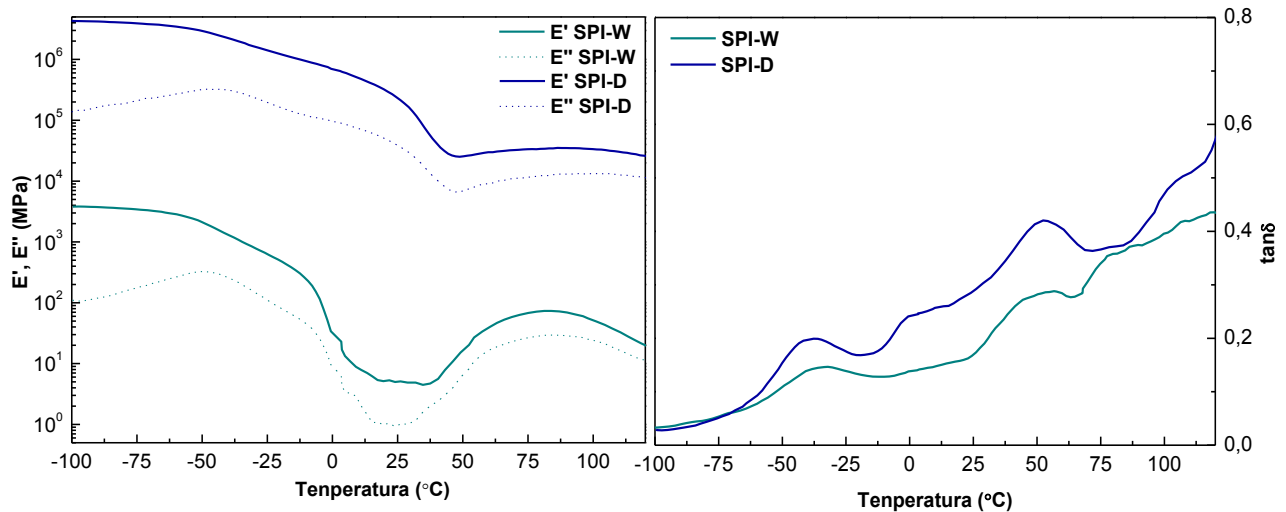
**4.3. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen haustura-elongazioa (EB), trakzio-erresistentzia (TS) eta modulu elastikoa (EM).

| <b>Filma</b> | <b>EB<br/>(%)</b> | <b>TS<br/>(MPa)</b> | <b>EM<br/>(MPa)</b> |
|--------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| <b>SPI-W</b> | 105,4 ± 13,3      | 4,1 ± 0,4           | 112,4 ± 5,3         |
| <b>SPI-D</b> | 140,6 ± 13,3      | 7,7 ± 0,6           | 120,5 ± 5,3         |

SPI filmen pilaketa modulua ( $E'$ ), galera modulua ( $E''$ ) eta galera faktorearen ( $\tan\delta$ ) kurbak tenperaturaren funtziopean aztertu ziren eta hauek **4.4. irudian** ageri dira. Orokorrean, lagin guztiek izaera elastikoa aurkeztu zuten; izan ere, ikertutako tenperatura tarte osoan  $E'$ -ren balioak  $E''$ -renak baino altuagoak izan ziren. Tenperatura igotzerakoan, pilaketa moduluen balioak txikitu egin ziren; SPI-W filmak bere balio minimoa 25 °C-an lortuz eta, berriz, SPI-D filmak 40 °C-an. Beste autore batzuk aztertu zuten moduan (Bengoechea et al., 2007), tenperatura altuagoetan, soluzio-prozesatze tenperatura konpresio-metodoan erabilitako tenperatura baino baxuagoa zenez, SPI-W filmetan moduluen balioen handitzea ematen zen. SPI-W filmek izaera termoeogonkorra erakutsi zuten disulfuro loturengatik. SPI-D filmetan moduluen handitzea hezetasunaren galerarekin erlazionatuta egon daiteke.

SPI-D filmek propietate biskoelastiko hobeak lortu zituzten eta hori moduluen balio altuagoetan ikusi zen. Galera faktorearen kurbari dagokionez, hau beira trantsizio tenperaturekin ( $T_g$ ) erlazionatuta dago. Bi prozesatze-metodoetan, glizerolak -40 °C-ko  $T_g$ -a erakutsi zuen. Tenperatura hori glizerol puruaren  $T_g$ -a (-75 °C) baino altuagoa zenez, glizerola eta proteinaren arteko interakzio onak konfirmatu zituen (Mathew eta Dufresne, 2002; Ogale et al., 2000). Gainera, interakzio horiek soja-proteinaren  $T_g$ -a jaitsi zuten. Hala ere, jaitsiera hau esanguratsuagoa izan zen SPI-D filmetan, hezetasun

maila baxuagoak soja-proteinaren eta glizerolaren interakzioak hobetzen zituela iradokiz (Chen eta Zhang, 2005a; Chen et al., 2005; Mo eta Sun, 2002).

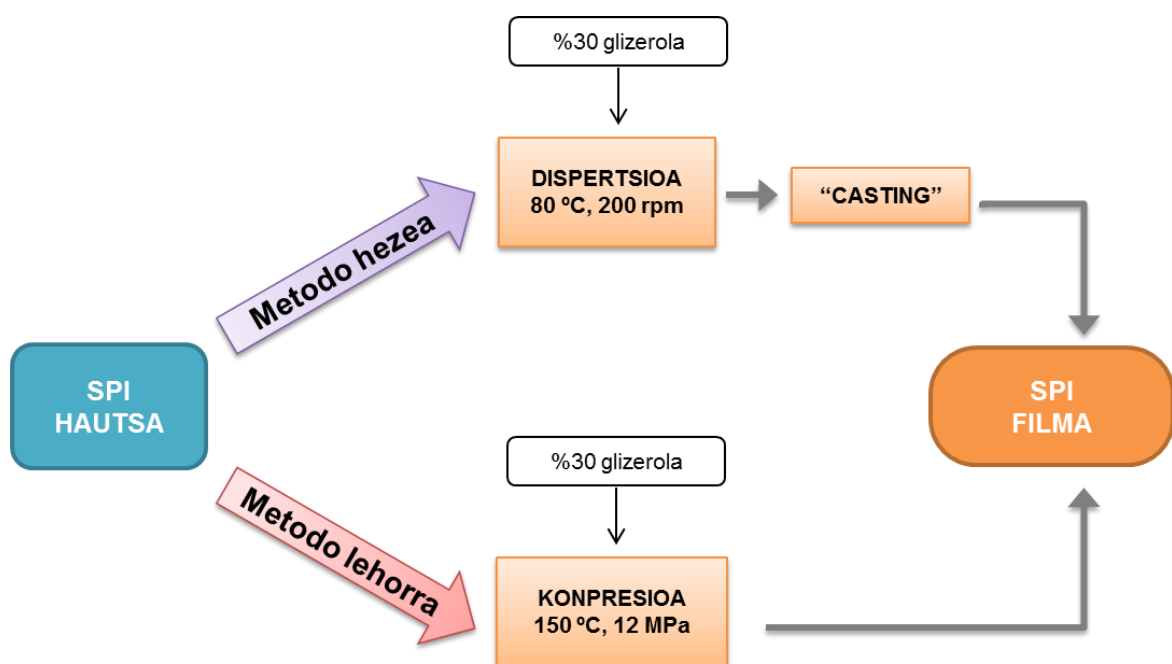


**4.4. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen pilaketa modulua ( $E'$ ), galera modulua ( $E''$ ) eta galera faktorea ( $\tan\delta$ ) temperaturaren funtziopean.

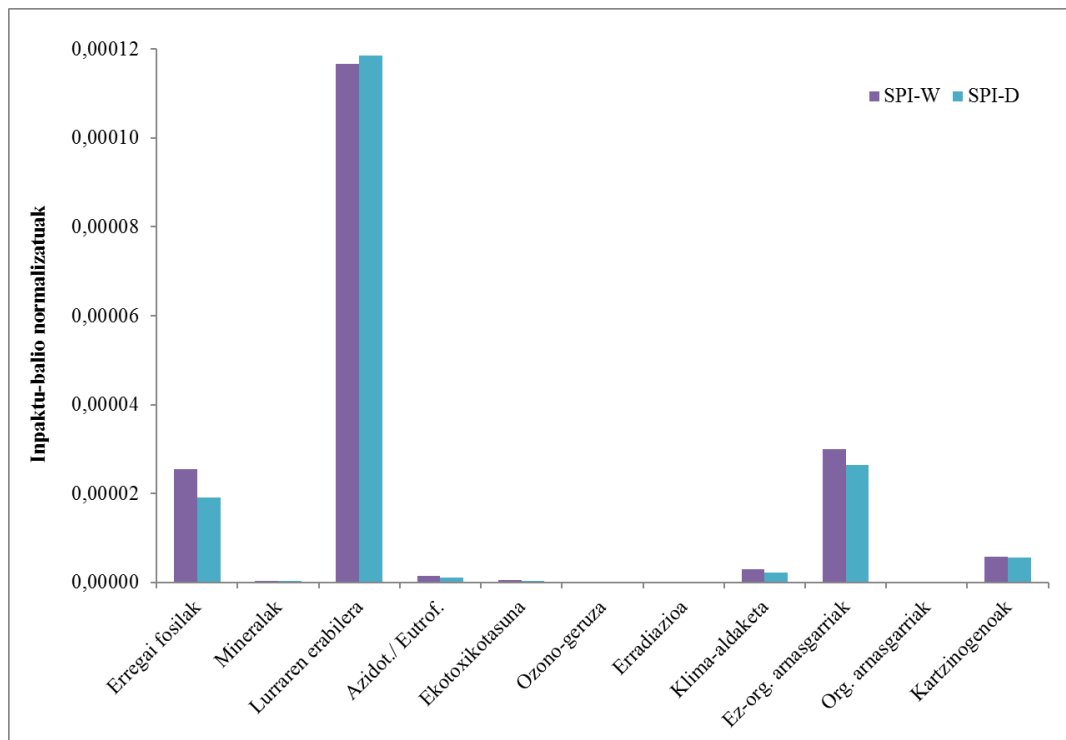
#### 4.2.2 Ingurumen inpaktua

Materialen prozesatze-metodoa aukeratzeko orduan, ingurumen ikuspegia kontuan hartu beharreko alderdia da. Kontutan izanik lehengaien erauzketa eta produktuen bizi amaierako faseak berdinak direla erabilitako prozesatze-metodoa edozein izanda ere, manufaktura-fasea soilik hartu zen aintzakotzat. Hala ere, aipatzekoa da nekazaritza-industrian lortutako azpiproduktuei balioa eman zaiela material horiekin filmak ekoiztu zirelako, baliabideen eraginkortasunari lagunduz. Gainera, soja-proteinan oinarritutako filmen hondakin agertokia konpostajea izan daitekeenez, filmak erabili ondoren hondakin bihurtzen direneko ingurumen arazoak eta arazo ekonomikoak murrizten dira. **4.5. irudian** erakusten da ezarritako sistemaren mugen diagrama.

Manufaktura-faseak lehengaiak film bihurtzean eragindako ingurumen-karga aintzat hartzen du. Prozesatze-metodo bakoitzerako, kontsumitutako energiak eta erabilitako gehigarriek eragiten duten ingurumen-karga kontuan hartu zen. **4.6. irudian** ikusten denez, bi prozesatze-metodoek inpaktu balio antzekoak erakutsi zituzten; hala ere, konpresio-metodoak ingurumen inpaktu txikiagoa erakutsi zuen, erabiltzen zuen prozesatze-denbora txikiagoa zelako. Bestalde, soluzio-metodoan kontsumitzen den energia nahastearen berokuntzarekin eta disolbatzailearen lurrinketarekin erlazionatuta dagoenez, aipatzekoa da dispersioa giro temperaturan lehortu zela filma osatzeko, metodo honi atxikitariko ingurumen inpaktua txikiaraziz. **4.6. irudian** erakusten denez, lurraren erabilerak, ez-organiko arnagarriek eta erregai fosilek ingurumen kalte handiena erakutsi zituzten kategoriak izan ziren.



**4.5. irudia.** Soluzio-metodoaren bidez (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmeko ezarritako sistemaren mugen diagrama.



**4.6. irudia.** Soluzio-metodoaren bidez (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen inpaktu-balio normalizatuak.

Lurraren erabileraren kategorian, filmen manufakturan erabilitako glizerolak kategoria honetan inpaktu altua izan zuen. Izan ere, soja-olioaren ekoizpenetik biodiesela lortzerakoan sortzen den azpiproduktua da glizerola. Prozesu horretan, lurraren eraldaketa eta sojaren laborantza aintzat hartzeaz gain, dieselaren erabilera, makinak, ongarrizeko gaiak eta pestizidak ere kontuan hartu ziren. Hori dela eta, kategoria honen ingurumen inpaktua zeharo handitu zen.

Era berean, ez-organiko arnasgarrien kategoriako erantzule nagusiak filmen manufakturan erabilitako elektrizitatea eta glizerolaren produkzioan sortutako emisioak izan ziren. Manufaktura-fasean kontsumitutako energiak ere ingurumen kalte handia eragin zuen erregai-fosilen kategorian. Orokorrean, soluzio-metodoaren prozesatze-denbora altuagoa denez, SPI-W filmen inpaktuak altuagoak izan ziren. Hori dela eta, filmen prozesatze-denboraren murrizketak kostuak eta ingurumen-inpaktuak murrizten lagunduko lukeela ondorioztatu dezakegu.

## ONDORIOAK

Kapitulu honetan, soluzioaren eta konpresioaren bidezko metodoak erabili ziren SPI filmak garatzeko. Konpresioaren bidez prestatutako filmek egonkortasun termiko eta mekaniko hobea erakutsi zuten, baita tentsio-erresistentzia eta haustura-elongazio balio altuagoak ere. Bestalde, konpresioaren bidezko filmak gardenagoak ziren eta haien gainazala leunagoa zen; izan ere, filmak prestatzeko erabilitako tenperatura altuagoak desnaturalizatzeko-maila altuagoa gauzatu zuen, soja-proteinaren eta glizerolaren arteko elkarrekintzak sustatuz. Horretaz gain, konpresioa industria-mailan prozesatze-metodo egokiagoa izan daiteke, erabilitako prozesatze-denbora motzagoa delako.

Azken ezaugarri honek kapitulu honetan aztertutako ingurumen inpaktuan eragin handia dauka. Lurraren erabilerak, ez-organiko arnasgarriek eta erregai fosilek ingurumen inpaktu altuenak erakutsi zituzten inpaktu-kategoriak izan ziren. Konpresioaren bidezko filmen kasuan, aipatutako inpaktuen balioak baxuagoak ziren, energia kontsumoa baxuagoa zelako, izan ere, prozesatze-metodo honek denbora gutxiago erabiltzen du. Bestalde, erabilitako bi prozesatze-metodoak laborategi eskalan gauzatu zirela aipatu beharra dago. Hori dela eta, manufaktura-fasearen optimizazioak energia kontsumoaren murrizketa ekarriko luke, SPI filmen ingurumen abantailak areagotuz. Gainera, filmen manufaktura prozesuaren hobekuntza honek merkatu-bideragarritasuna handi lezake, izan ere, soja-proteina zenbait industrietatik, esaterako elikagaien edo biodieselaren prozesaketatik lor daitekeen azpi-produktu ugaria eta eskuragarria da.



# 5.

## *kapitulua*

### **OILO-LUMEN BALORIZAZIOA SUFRE ITURRI GISA FILMEN PROPIETATEAK HOBETZEKO**

*Garrido T., Peñalba M., de la Caba K., Guerrero P. (2019)*

*A more efficient process to develop protein films derived from agro-industrial by-products. Food Hydrocolloids, 86, 11-17*

*Garrido T., Leceta I., de la Caba K., Guerrero P. (2018)*

*Chicken feathers as a natural source of sulphur to develop sustainable protein films with enhanced properties. International Journal of Biological Macromolecules, 106, 523-531*



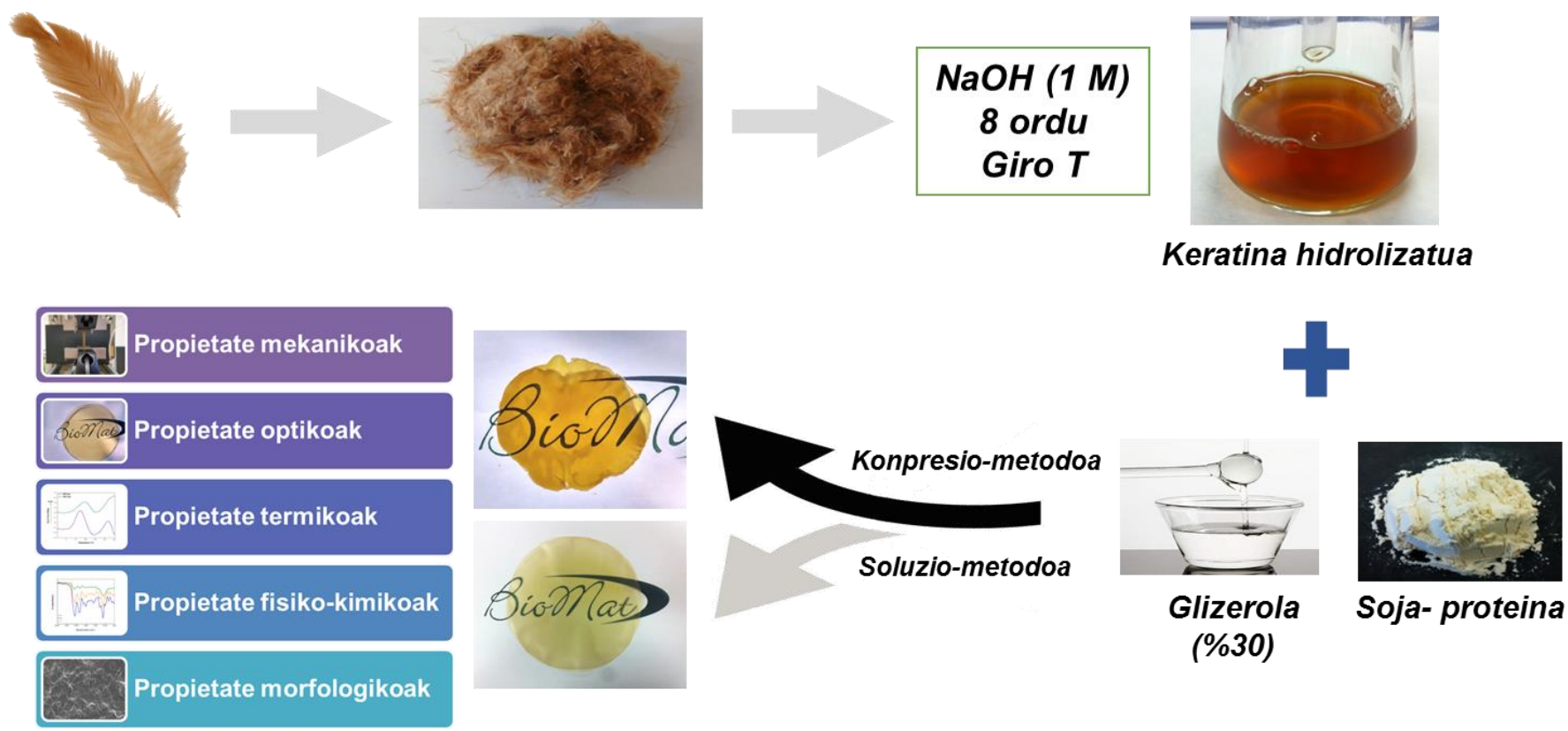


## LABURPENA

Aurreko kapituluetan, SPI-a erabili zen propietate fisiko-kimiko onak dituzten material jasangarriak garatzeko. Hala ere, jakina denez, SPI-ren aplikazioa mugatua da SPI-ak dituen erresistentzia eskasa eta hezetasun absortzio altuagatik. Horregatik, beste polimero biodegradagarri batzuk gehitzea irtenbide eraginkorra izan daiteke SPI-ak dituen desabantailak gainditzeko.

Testuinguru horretan, nekazaritza-industrian sortutako hondakinen balorizazioa izugarri areagotu da azkenengo urte hauetan filmen propietateak hobetzeko asmoz. Adibidez, oilo-lumak, hegazti-industrian sortutako hondakinak, lehengaien iturri gisa erabil daitezke zenbait aplikaziotarako, esaterako ontziratzeko, ehun-ingeniartzarako edo ur-garbiketarako. Lumak egiturazko proteina batez, keratinaz (> %90), osatuta daude gehienbat. Hau hondakin hidrofoboetan eta zisteinan aberatsa da eta lotura disulfurikoen arteko elkarrekintzak bultzatzen ditu, filmen egonkortasuna eta sendotasuna hobetuz. Beste lan batzuekin alderatuz, zeinetan keratina hidrolizatua lortzeko substantzia kimiko toxikoak edo metodo garestiak erabiltzen diren, kapitulu honetan, erraza, merkea eta ingurumenarekiko lagungarria den metodoa erabili zen.

Gainera, keratina hidrolizatu (HK) hau SPI-rekin batera erabili zen soluzioaren eta konpresioaren bidezko filmak egiteko eta film hauen propietate fisiko-kimikoak, termikoak, mekanikoak, optikoak eta morfologikoak aztertu ziren. Horrela, nekazaritza-industriatik sortutako hondakin hauen balorizazioa egiteaz gain, filma eratzeko formulazioan keratina hidrolizatua gehitzeak sufre kantitatea handitzea lortu zuen, modu horretan disulfuro loturak eratuz eta filmen eraginkortasun kimiko eta termikoa hobetuz.



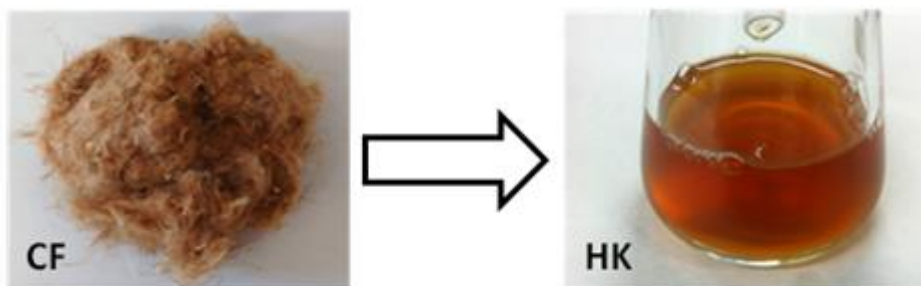
**I irudia.** 5. kapituluaren laburpen grafikoa.

## 5.1 FILMEN PRESTAKETA

Filmak soluzio-metodoa (metodo hezea, W) eta konpresio-metodoa (metodo lehorra, D) erabiliz prestatu ziren. Horretarako, 5 g soja-proteina (SPI) 100 mL HK soluziorekin nahastu ziren (2. kapituluan azaldu bezala). Oilo-lumen (CF) kontzentrazioa HK soluzioan %3, 6 eta 9an (ehunekoaren arabera pisua soja-proteina lehorrearekiko) finkatu zen. Nahastea pH 10era egokitu zen eta berogailu magnetiko batean 80 °C-an 30 minutuz berotzen utzi zen. Ondoren, %30 glizerol (soja-proteina lehorrearekiko) gehitu eta dispersioa beste 30 minutuz irabiatzen utzi zen aurreko temperatura berdinean. Gero, metodo hezearen kasuan soluzioa Petri ontzietara isuri, giro tenperaturari lehortu eta filmak ontzietatik desitsatsi ziren. Film hauek HK0-W (kontrola soluzio-metodoan), HK3-W, HK6-W eta HK9-W gisa izendatu ziren. Metodo lehorren kasuan, berriz, soluzioa liofilizatu zen Alpha 1-4 LD ekipoa erabiliz. Lortutako hautsa 2 minutuz termikoki prentsatu zen 12 MPa-eko presiopean aurretik 150 °C-ra berotutako laborategiko prentsa erabiliz. Film hauek HK0-D (kontrola konpresio-metodoan), HK3-D, HK6-D eta HK9-D gisa izendatu ziren.

## 5.2 EMAITZAK

Oilo-lumak baliiodun produktu batean bilakatzea erronka bat da keratinak egitura zurruna baitu disulfuro loturengatik. Ondorioz, disulfuro loturak murrizteko eta keratina disolbatzeko, tratamendu eraginkorrak erabiltzea beharrezkoa da. Potasio hidroxidoa baino merkeagoak diren sodio hidroxidoa bezalako agente erreduzitzaileak eraginkorrak dira disulfuro loturak apurtzeko 10-13 pH-eko tartean eta ondorioz, keratina disolbatzeko. Disolbagarritasuna denbora eta tenperaturarekin sustatu egiten da, eta prozesuan lumak polipeptido disolbagarrietan eta aminoazidoetan apurtzen dira (Ji et al., 2014). Kapitulu honetan, keratina disolbatzeko giro tenperaturan burututako tratamendu alkalino bat erabili zen, inbasio gutxiagoko eta ingurumenarekiko errespetagarriagoa den metodo bat garatzeko asmoz. **5.1. irudian** ikusten den bezala, oilo-lumak 1 M NaOH-rekin 8 orduz giro tenperaturan tratatzea nahikoa izan zen disulfuro loturak apurtzeko eta keratina disolbatzeko.

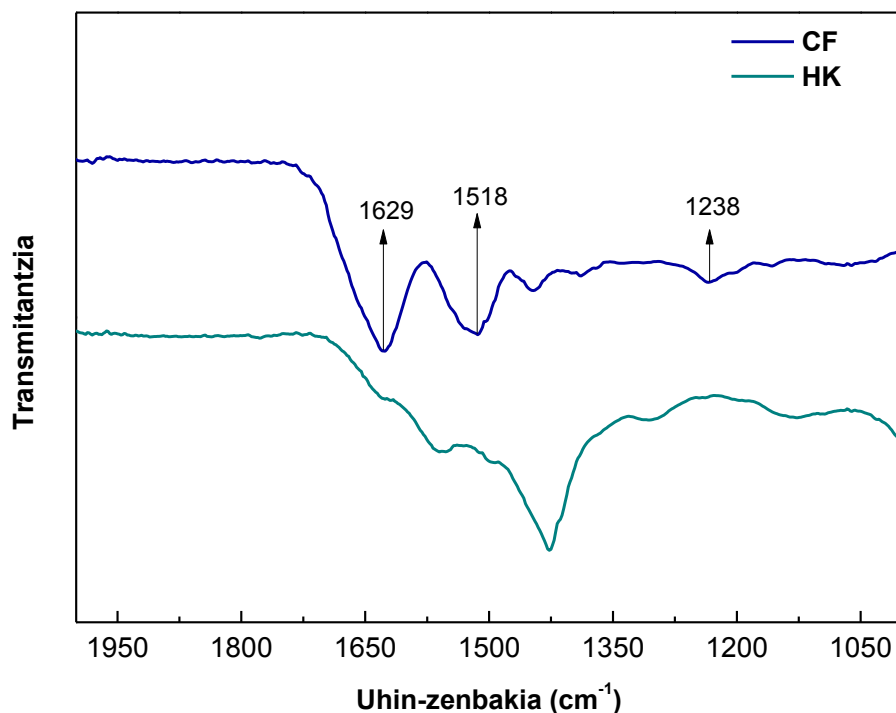


**5.1. irudia.** Aldez aurretik tratatutako oilo-lumak (CF) eta keratina hidrolizatuaren soluzioa (HK).

### 5.2.1 Keratina hidrolizatuaren karakterizazioa

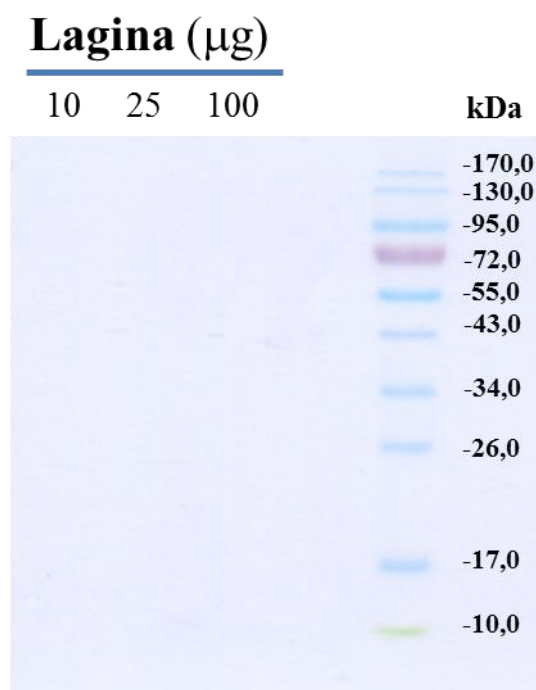
Tratamendu alkalinoaren ondorioz oilo-lumetan gertatutako aldaketa kimikoak ATR-FTIR teknikaren bidez ikertu ziren eta **5.2. irudian** aldez aurretik tratatutako oilo-lumen (CF) eta keratina hidrolizatuaren (HK) espektroak erakusten dira. Jakina denez,

oilo-lumak gehienbat proteinaz osatuta daude, %90a baino gehiago proteina baita (Cheung et al., 2009). Horrela, CF-ren espektroak proteinaren banda bereizgarriak erakusten ditu. Absortzio-banda hauek 1629, 1518 eta 1238  $\text{cm}^{-1}$ -ean agertzen dira eta amida I, amida II eta amida III bandekin elkartuta daude, hurrenez hurren. Amida I C=O loturaren luzatzearekin, amida II N-H loturaren tolestarekin eta amida III C-N loturaren luzatzearekin eta N-H loturaren tolestarekin erlazionatuta daude. Tarte honetan CF eta HK-ren espektroak alderatzen badira, tratamendu alkalinoak aipaturiko proteinaren banda ezaugarrietan eragindako intentsitate eta frekuentzia aldaketak garbi ikus daitezke. Aldaketa hauek, proteinaren egituraren aldaketa esanguratsuak gertatzen zirela adierazi zuten, tratamendu alkalinoak lotura peptidikoaren apurketa eragin zuelako. Emaitza hauek bat datoz **5.1. irudian** ikusten den disolbaturiko keratina soluzioarekin.



**5.2. irudia.** Aldez aurretik tratatutako oilo-lumen (CF) eta keratina hidrolizatuaren (HK) ATR-FTIR espektroak.

Tratamenduaren baldintzek HK-ren pisu molekularrean duten eragina ikertzeko, SDS-PAGE elektroforesi teknika erabili zen. **5.3. irudian** HK laginaren elektroforesi profila erakusten da proteina estandar bat erreferentziazat hartuta (eskuinean dagoen elektroferograma). 10 µg-ko HK-lagina gelean aplikatu zenean 10 kDa baino handiagoko frakzio proteinikorik ikusi ez zenez, analisia 25 eta 100 µg aplikatuz errepikatu zen. **5.3. irudian** ikusten den bezala, ez zen inolako bandarik ikusi HK kantitatea edozein erabilita ere. Honek, HK nagusiki peptidoz edo aminoazidoz osatuta zegoela adierazi zuen.



**5.3. irudia.** Laginen banaketa elektroforetikoaren patroia. 1. lerroa, 10 µg HK, 2. lerroa, 25 µg HK, 3. lerroa, 100 µg HK eta 4. lerroa, proteina estandarra.

Keratina hidrolizatua osatzen duten aminoazidoak eta hauen edukia ezagutzeko analisi elementala burutu zen. Horrela, HK-ren aminoazidoen konposizioa **5.1. taulan** agertzen da eta bertan soja-proteinaren aminoazidoen konposizioa ere ikus daiteke, alderaketa egiteko. Zisteina (%10,8), keratinkan dauden sulfuro taldeen presentziaren

arduraduna, prolina (%12,4), serina (%11,7) eta azido glutamikoa (%10,3) keratina hidrolizatuan aurkituriko aminoazido ugariak ziren. Bestalde, histidina (%0,2), metionina (%0,2) eta lisina (%0,8) aminoazido urrienak ziren. Peptido loturen eremuko funtsezko konposatuak diren alanina (%9,9) eta glizina (%9,8) kantitate adierazgarriak zeuden, matrize extrazelularren antzera (Yin, et al., 2013). Gainera, glizina eta prolinaren kantitate altuek oilo-lumen keratina  $\beta$ -xafla egituran aberatsa zela iradokitzen zuten (Tsuda et al., 2014). Beste aldetik, triptofanoa hidrolisi pausoan desagertu zela ikusi zen (Hill et al., 2010). Lan honetan lortutako aminoazido kontzentrazioak Reddyren (2015) lanean lortutako emaitzen antzekoak dira.

**5.1. taula.** Keratina hidrolizatuaren (HK) eta soja-proteina isolatuaren (SPI) aminoazido kontzentrazioak.

| Aminoazidoak     | Kontzentrazioak (%) |      |
|------------------|---------------------|------|
|                  | HK                  | SPI  |
| Azido aspartikoa | 7,7 <sup>a</sup>    | 11,5 |
| Treonina         | 1,8                 | 3,8  |
| Serina           | 11,7                | 5,4  |
| Azido glutamikoa | 10,3 <sup>b</sup>   | 19,2 |
| Prolina          | 12,4                | 5,2  |
| Glizina          | 9,8                 | 4,2  |
| Alanina          | 9,9                 | 4,2  |
| Zisteina         | 10,8                | 1,3  |
| Balina           | 5,8                 | 4,8  |
| Metionina        | 0,2                 | 1,3  |
| Isoleuzina       | 2,2                 | 4,8  |
| Leuzina          | 7,0                 | 8,0  |
| Tirosina         | 1,7                 | 3,8  |
| Fenilalanina     | 4,7                 | 5,4  |
| Histidina        | 0,2                 | 2,7  |
| Lisina           | 0,8                 | 6,4  |
| Arginina         | 2,9                 | 7,8  |

<sup>a</sup>Azido aspartiko eta asparaginarentzako balioak

<sup>b</sup>Azido glutamiko eta glutaminarentzako balioak

Analisi elementalari esker, keratina hidrolizatuaren eta soja-proteinaren sufre kantitatea %4,2 eta %0,3koa zela zehaztu zen, hurrenez hurren. Portzentaje hauek nagusiki zisteinatik eratorritako disulfuro loturekin erlazionatuak daude. Horren

ondorioz, keratina hidrolizatua filma eratzeko formulazioan gehitzerakoan, sufre kantitatea handituko da eta nahasteko konposatuen arteko interakzioak sustatuko dira. Horrela, zisteinan dauden tiol taldeek (-SH) sortutako disulfuro loturez eratutako sareak propietate hobegoko materialak sortu ditzake.

## 5.2.2 Filmen karakterizazioa

### 5.2.2.1 Propietate fisikoak

Filmek uraren presentzian duten portaera ikertzeak ingurumen hezeetan duten egonkortasunari buruzko informazioa eman dezake. Horrela, hezetasun edukia (MC), disolbaturiko masa totala (TSM), ur lurrunaren iragazkortasuna (WVP), ura xurgatzeko gaitasuna (WU) eta urarekiko kontaktu angelua (WCA) ikertu ziren. Hasteko, MC, TSM eta WVP balioak **5.2. taulan** agertzen dira. Jakina den bezala, hezetasun edukia ezagutzea garrantzitsua da, hezetasunak berak matrize polimerikoan plastifikatzaile bezala jokatzeko duelako. Ikusten denez, soluzio-metodoaren bitartez prestatutako filmen hezetasun edukiaren balioak altuagoak ziren. Hala ere, keratina hidrolizatua gehitu zenean balio hauek ez zuten aldaketa esanguratsurik ( $p > 0,05$ ) erakutsi. TSM balioei dagokienez, bi metodoekin garatutako filmetan balioen goranzko joera ikusi zen eta hauen handitzea keratina hidrolizatua gehitzerakoan eman zen. Joera hau filmetan zeuden beste konposatuekin lotura kobalenteen bidez elkartuta ez zeuden aminoazido askeen edo pisu molekular gutxiko peptidoen ondorioz izan zitekeen. Horrela, HK kantitatearen igoera filmen disolbagarritasunaren handitzearen emaitza da. Bestalde, WVP balioak hobekuntza ziren soluzio-metodoa erabili zenean. Hobekuntza hau, proteinaren kateen berrantolatzearen ondorioz gerta zitekeen, izan ere filmek lehortzeko denbora gehiago izaten zuten metodo hezea erabili zenean. HK-ren gehitzeari dagokionez, WVP balioak ez ziren esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) aldatu HK-W filmetan.



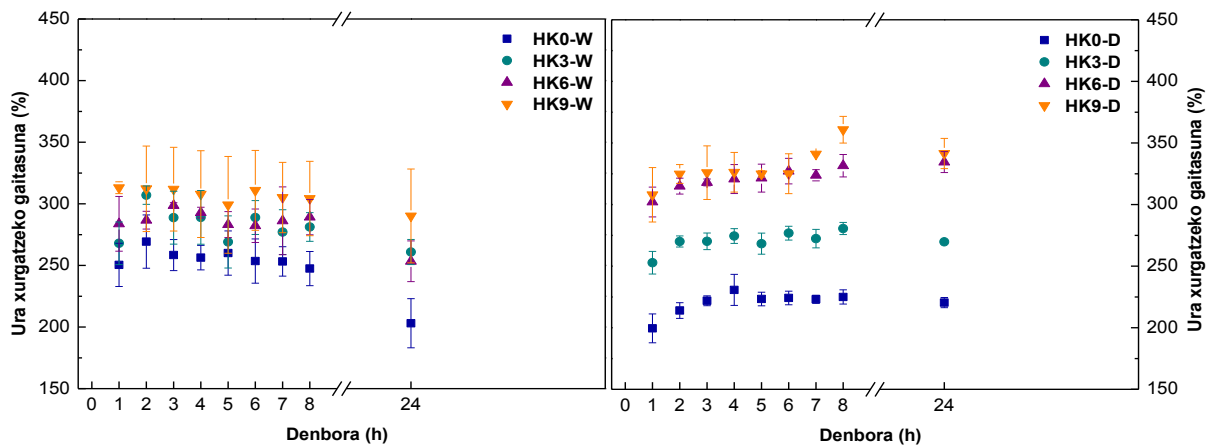
Hala ere, HK-ren gehikuntzak HK-D filmetan ur lurrunaren iragazkortasunaren handitzea eragin zuen.

**5.2. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) garatutako filmen hezetasun edukia (MC), disolbaturiko masa totala (TSM) eta ur lurrunaren iragazkortasuna, HK kantitatearen funtziopean.

| Filma | MC (%)                    | TSM (%)                    | WVP ( $10^{-12} \text{ g cm/cm}^2 \text{ s Pa}$ ) |
|-------|---------------------------|----------------------------|---|
| HK0-W | 17,45 ± 0,77 <sup>a</sup> | 29,06 ± 0,92 <sup>a</sup>  | 3,74 ± 0,24 <sup>a</sup>                          |
| HK3-W | 17,32 ± 1,57 <sup>a</sup> | 31,13 ± 3,02 <sup>a</sup>  | 3,45 ± 0,34 <sup>a</sup>                          |
| HK6-W | 17,03 ± 0,43 <sup>a</sup> | 32,11 ± 3,74 <sup>ab</sup> | 3,55 ± 0,17 <sup>a</sup>                          |
| HK9-W | 15,84 ± 1,44 <sup>a</sup> | 36,87 ± 2,47 <sup>b</sup>  | 3,54 ± 0,47 <sup>a</sup>                          |
| HK0-D | 11,58 ± 0,11 <sup>b</sup> | 28,57 ± 0,38 <sup>a</sup>  | 5,62 ± 0,14 <sup>a</sup>                          |
| HK3-D | 11,07 ± 0,02 <sup>a</sup> | 31,02 ± 0,29 <sup>b</sup>  | 5,82 ± 0,39 <sup>b</sup>                          |
| HK6-D | 11,67 ± 0,12 <sup>b</sup> | 33,03 ± 0,14 <sup>c</sup>  | 6,74 ± 0,15 <sup>b</sup>                          |
| HK9-D | 12,88 ± 0,25 <sup>c</sup> | 34,74 ± 0,04 <sup>d</sup>  | 6,76 ± 0,33 <sup>b</sup>                          |

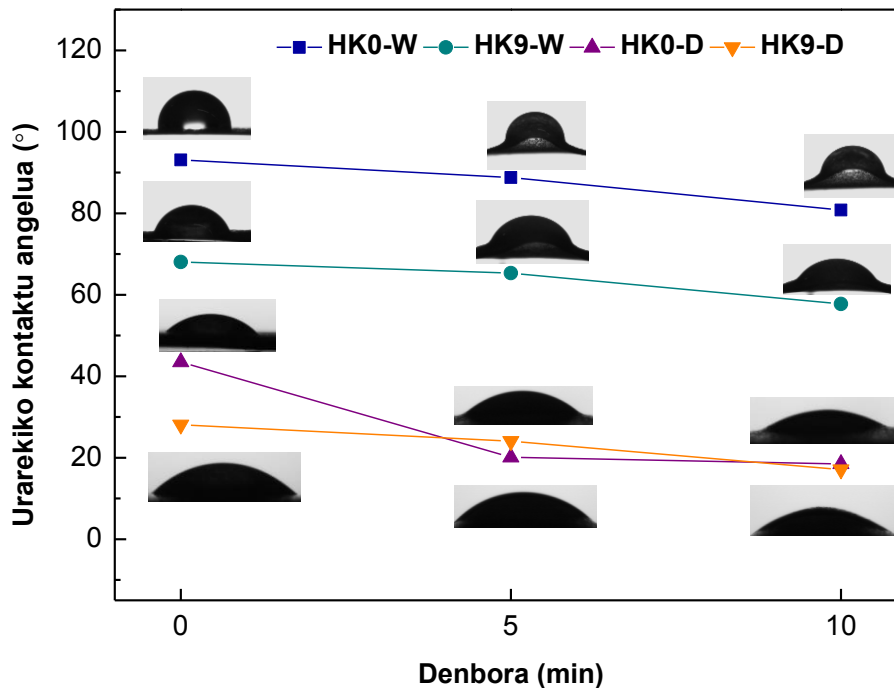
<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak, Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

Ura xurgatzeko ahalmenaren bidez filmen urarekiko erresistentzia azaldu daiteke. WU difusio prozesuarekin erlazionatuta dago. Prozesu horretan, molekula txikiak filmaren alde batetik bestera ausaz mugitzen dira eta molekulen difusio saretzearen, interakzio molekularren, kristalinitatearen eta betegarrien presentziaren eraginpean dago (Tanase eta Spiridon, 2014). Film guztietan, uraren xurgatzea azkarra izan zen lehenengo orduan eta ordu gutxiren ostean, egonkortasuna lortu zen (**5.4. irudia**). HK-W filmen kasuan, WU balioak txikitzen hasi ziren urperatzearen lehenengo 24 ordutan filmen desintegrazioa zela eta. Bestalde, konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmen ura xurgatzeko ahalmena konstante mantendu zen 24 orduren ostean, filmek egonkortasun handiagoa zutela iradokiz. Gainera, keratina hidrolizatuaren gehikuntzak ura xurgatzeko ahalmenean eragin zuela ikusi zen, WU balio altuagoak lortuz; %9 HK-ren kasuan WU balioak bikoiztu ziren.



**5.4. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez prestatutako soja-proteinan oinarritutako filmen ura xurgatzeko ahalmena, HK kantitatearen funtziopean.

Filmek hidrofobotasuna ezagutzeak, proteinaren desnaturalizazioagatik gertaturiko egitura molekularren aldaketengatik filmek gainazaleruntz bideratzen diren talde hidrofoboaren orientazio aldaketak detektatzen laguntzen du (Timilsena et al., 2016). Filmek izaera hidrofoboa edo hidrofila urarekiko kontaktu angeluaren bidez neurtu zen denboraren funtziopean eta balioak **5.5. irudian** aurkezten dira. Orokorrean, WCA balioak  $90^\circ$  baino altuagoak badira filmek izaera hidrofoboa dutela esan daiteke; hau da, filmek bustitze ahalmena baxua da (Karbowski et al., 2006). Soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmek konpresio-metodoaren bidez prestatutakoak baino balio altuagoak erakutsi zituzten eta HK0-W filmek  $90^\circ$  baino balio altuagoak erakutsi zituztenez, filmek izaera hidrofoboa baieztatu zen. Portaera hori, gainazalean talde polarren kontzentrazio baxuagoa izatearekin erlaziona zitekeen; izan ere, soluzio-metodoaren kasuan, denbora gehiago dago konposatuen arteko interakzioak sustatzeko. Beste aldetik, keratina hidrolizatuak filmek izaera hidrofila handitu zuen keratina hidrolizatuan dauden aminoazido hidrofiloen presentziagatik. Gainera, WCA balioak denborarekin txikitu ziren, filmek bustitze ahalmena adieraziz.



**5.5. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) garatutako kontrol filmen eta %9 HK duten filmen urarekiko kontaktu angelu balioak (°) 0, 5 eta 10 minututan bilduak.

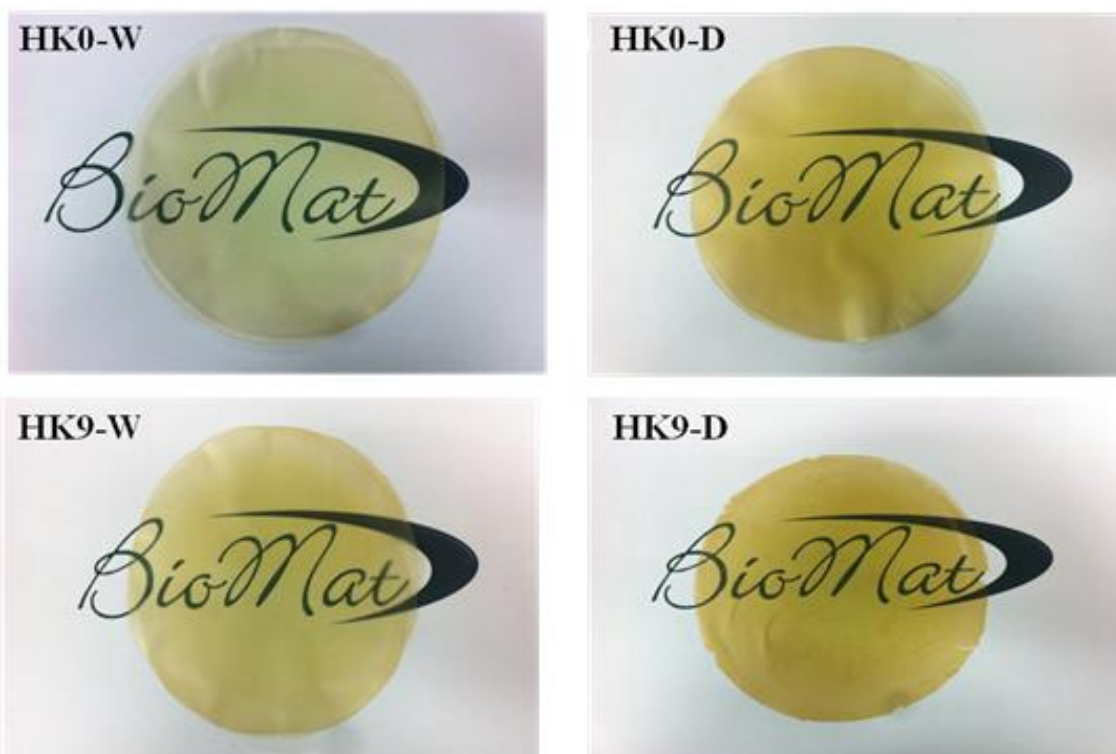
Propietate optikoei dagokienez, SPI-an oinarritutako filmen kolorea eta gardentasuna aztertu ziren eta lortutako emaitzak **5.3. taulan** agertzen dira. Soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmek,  $L^*$  balio altuagoak aurkezten zituzten, film argitsuagoak lortuz. Hala ere, HK-ren gehikuntzak filmak esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) ilundu zituen kontrol filmarekin konparatuz. Alderantzizko joera ikusi zen  $a^*$  eta  $b^*$  parametroetan. Izan ere,  $b^*$  parametroak balio altuak erakutsi zituen soja-proteinak filmari ematen dion kolore horixka bereizgarriagatik. HK gehikuntzarekin parametro hau handitu zen, filmari kolore horixkagoa emanez. Gainera, HK-ren edukiak filmen kolore gorrixka ( $a^*$ ) esanguratsuki ( $p < 0.05$ ) areagotu zuen, baita kolore-diferentzia ere ( $\Delta E^*$ ). Konpresio-metodoa erabiltzean aipatutako balioak handitu ziren prozesuan temperatura altuagoa erabiltzearen ondorioz.

**5.3. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) garatutako SPI filmen kolore ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  eta  $\Delta E^*$ ) eta gardentasun (T) balioak, HK edukiaren funtziopean.

| Filma        | $L^*$              | $a^*$              | $b^*$                 | $\Delta E^*$       | T<br>( $A_{600/mm}$ ) |
|--------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>HK0-W</b> | $90,78 \pm 0,37^a$ | $-1,26 \pm 0,06^a$ | $20,98 \pm 0,27^a$    |                    | $8,71^a$              |
| <b>HK3-W</b> | $86,03 \pm 0,37^b$ | $1,09 \pm 0,15^b$  | $27,84 \pm 0,75^b$    | $8,67 \pm 0,82^a$  | $7,81^b$              |
| <b>HK6-W</b> | $80,07 \pm 0,32^c$ | $4,26 \pm 0,17^c$  | $36,70 \pm 0,49^c$    | $19,81 \pm 0,54^b$ | $7,02^c$              |
| <b>HK9-W</b> | $76,43 \pm 0,20^d$ | $6,36 \pm 0,10^d$  | $40,11 \pm 0,14^d$    | $25,17 \pm 0,25^c$ | $6,83^c$              |
| <b>HK0-D</b> | $78,94 \pm 0,80^a$ | $2,84 \pm 0,60^a$  | $46,53 \pm 1,20^a$    |                    | $1,16^a$              |
| <b>HK3-D</b> | $71,19 \pm 0,79^b$ | $9,87 \pm 0,28^b$  | $53,37 \pm 0,72^b$    | $12,54 \pm 0,88^a$ | $1,17^a$              |
| <b>HK6-D</b> | $68,11 \pm 0,83^c$ | $11,72 \pm 0,42^c$ | $52,67 \pm 0,84^{bc}$ | $15,35 \pm 0,52^b$ | $1,25^{ab}$           |
| <b>HK9-D</b> | $66,65 \pm 0,24^d$ | $14,63 \pm 0,36^d$ | $54,42 \pm 0,37^c$    | $18,79 \pm 0,37^c$ | $1,35^b$              |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak, Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

Koloreaz gain, filmen gardentasun balioak ere **5.3. taulan** agertzen dira. Ikusten den moduan, prozesatze metodoak ere filmen gardentasunean eragina du. Film guztiak gardenak izan arren (**5.6. irudia**), konpresio-metodoren bidez prozesatutako filmak gardenagoak ziren; izan ere, T balio baxuek gardentasun altuagoa adierazten dute (Nawab et al., 2017). Hala ere, HK gehitzerakoan balioak ez ziren aldatu HK kantitatea edozein izanda ere. Konpresioaren bidez lortutako filmen gardentasun balioak polipropileno orientatuaren (OPP) gardentasun balioen antzekoak ziren (Guerrero et al., 2011). Bi metodoekin lortutako T balioen desberdintasunak konpresio-metodoan aplikaturiko tenperaturarengatik izan daitezke, zeinak SPI-ren desnaturalizazioa faboratzen duen, HK-rekin sortzen diren interakzioak sustatuz eta bi konposatuen arteko bateragarritasuna handituz.

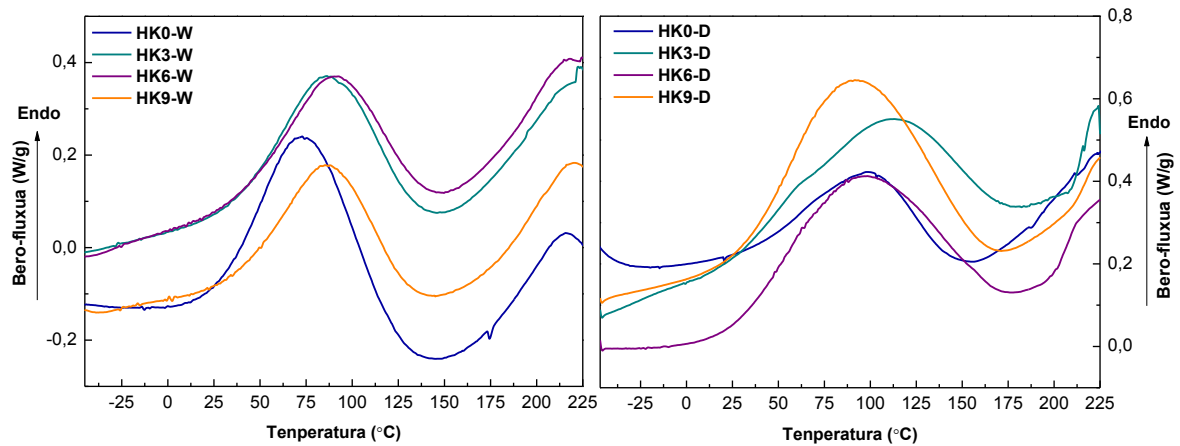


**5.6. irudia.** %0 eta %9 keratina hidrolizatua duten soluzio-metodoaren (HK0-W eta HK9-W) eta konpresio-metodoaren bidez (HK0-D eta HK9-D) prestatutako filmen irudiak.

#### 5.2.2.2 Propietate termikoak

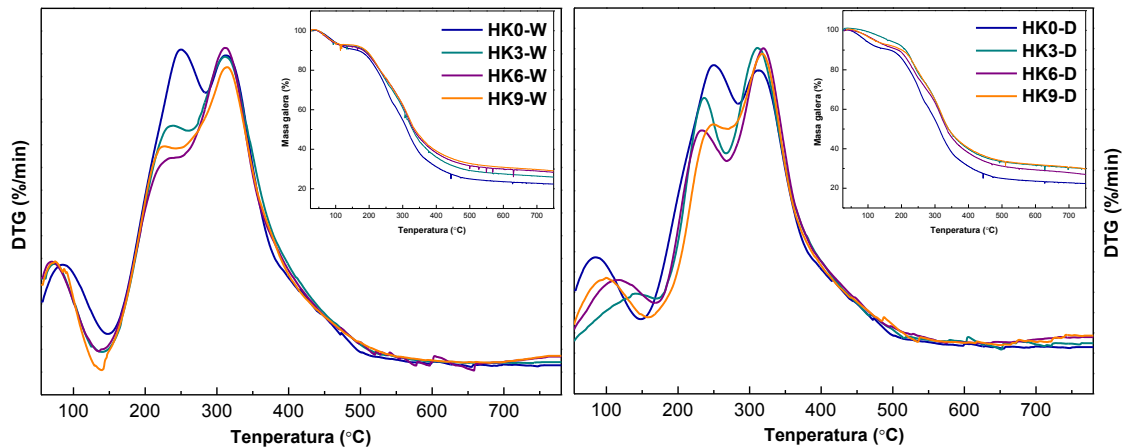
Filmek portaera termikoa ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC) eta analisi termograbitrikoaren (TGA) bidez aztertu zen eta emaitzak **5.7. irudian** eta **5.8. irudian** agertzen dira. DSC termograman seinale endotermiko bat antzeman zen. Seinale hori SPI-an aurkitzen den proteina globular ugarienaren desnaturizazioarekin erlazioa daiteke, hau da,  $\beta$ -konglizininaren (7S) desnaturizazioarekin (Denavi et al., 2009). Soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmek kasuan, trantsizio termiko hori 80 °C inguruan gertatu zen, baina balio hori 100 °C-raino igo zen konpresio filmetan. Jakina denez, 7S globulinaren desnaturizazio-tenperaturak mendekotasun handia dauka hezetasun-edukiarekiko. Horrela, tenperatura altuagoak lortu ziren hezetasun-eduki txikiarekin (Koshy et al., 2015). **5.2. taulan** ikusten denez, konpresio-filmek MC balioak soluzio-metodoarekin garatutako filmek baino baxuagoak izan ziren. Hori

DSC emaitzekin bat dator. Gainera, keratina hidrolizatuaren gehikuntzak 7S globulinarekin erlazionatutako seinalea temperatura altuagotara desplazatu zuen, filmen egonkortasun termikoa handituz.



**5.7. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren bidez (D) garatutako SPI filmen DSC termogramak, HK kantitatearen funtziopean.

**5.8. irudiko** TGA kurbek degradazio termikoa hiru etapetan gauzatu zela erakusten dute. Lehenengo etapa ( $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) xurgatutako hezetasunari dagokio. Soluzio-metodoaren bidez garatutako filmek %10eko masa-galera izan zuten tarte horretan, konpresio filmek, berriz, %5ekoa. Hau MC emaitzekin lotu daiteke, konpresiozko filmek MC balio baxuagoak azaldu baitzituzten. Bigarren etapa,  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ -an hasten dena, plastifikatzaile bezala erabilitako glizerolaren lurrunketari dagokio. Beste ikerketa batzuetan ikusienez (Mo eta Sun, 2002; Tian et al., 2012), proteina eta glizerolaren arteko bateragarritasun egokiak glizerolaren lurrinketa temperatura,  $182\text{ }^{\circ}\text{C}$ -koa, igotzen du. Hirugarren etapa  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  inguruan agertzen da eta soja-proteinaren degradazio termikoari dagokio. Ikusienez, kontrol filmek (HK0-W eta HK0-D)  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ -an gainontzeko filmek baino masa-galera handiagoa zuten. Emaitza horiek ikusita, keratina hidrolizatuak egonkortasun termikoa hobetzen zuela esan zitekeen disulfuro lotura gehiago egoteari esker.



**5.8. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen TGA eta DTG kurbek, HK kantitatearen funtziopean.

### 5.2.2.3 Propietate mekaniko dinamikoak eta trakzio propietateak

Hainbat HK eduki zituzten SPI filmen propietate mekanikoak aztertu ziren trakzio erresistentzia (TS), haustura elongazioa (EB) eta modulu elastikoa (EM) neurtuz. Emaitzak **5.4. taulan** agertzen dira. Konpresioaren bidez garatutako filmek soluzio-metodoaren bidez prestatutakoekin konparatuz, trakzio erresistentzia hobeazaldu zuten. Gainera, HK-ren gehikuntzak TS balioak esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) handitu zituen 7,47 MPa-etik 9,52 MPa-era HK9-D filmetan. Aldi berean, konpresio-filmek haustura elongazio balio altuagoak ere erakutsi zituzten; HK gehitzerakoan balio hauek %131tik %94ra txikitu ziren, HK edukia %0tik %9ra handitu zenean. Modulu elastikoari dagokionez, konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmen kasuan balioak zertxobait handiagoak ziren, baina keratina hidrolizatua gehitzerakoan ez zen aldaketarik ikusi. Filmek portaera mekanikoaren aldaketa horiek HK gehikuntzaren ondorioz gertatutako sufre kantitate handitzearekin erlaziona zitezkeen. Literaturan ikusi zenez (Visschers, 2005), proteinen disulfuro loturak pH basikoan (lan honetan erabilitakoa) sustatzen dira, eta tenperatura mesedegarria izaten da proteinaren desnaturalizaziorako. Horrek azaltzen du konpresio filmetan TS balio altuagoak lortzea.

Saretzeak kateen mugikortasuna mugatzen duenez, trakzioa handituz eta elongazioa txikituz, **5.4. taulan** aurkezten diren balioekin bat etortzen dira emaitza hauek.

**5.4. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen trakzio erresistentzia (TS), haustura elongazioa (EB) eta modulu elastikoa (EM), HK kantitatearen funtziopean.

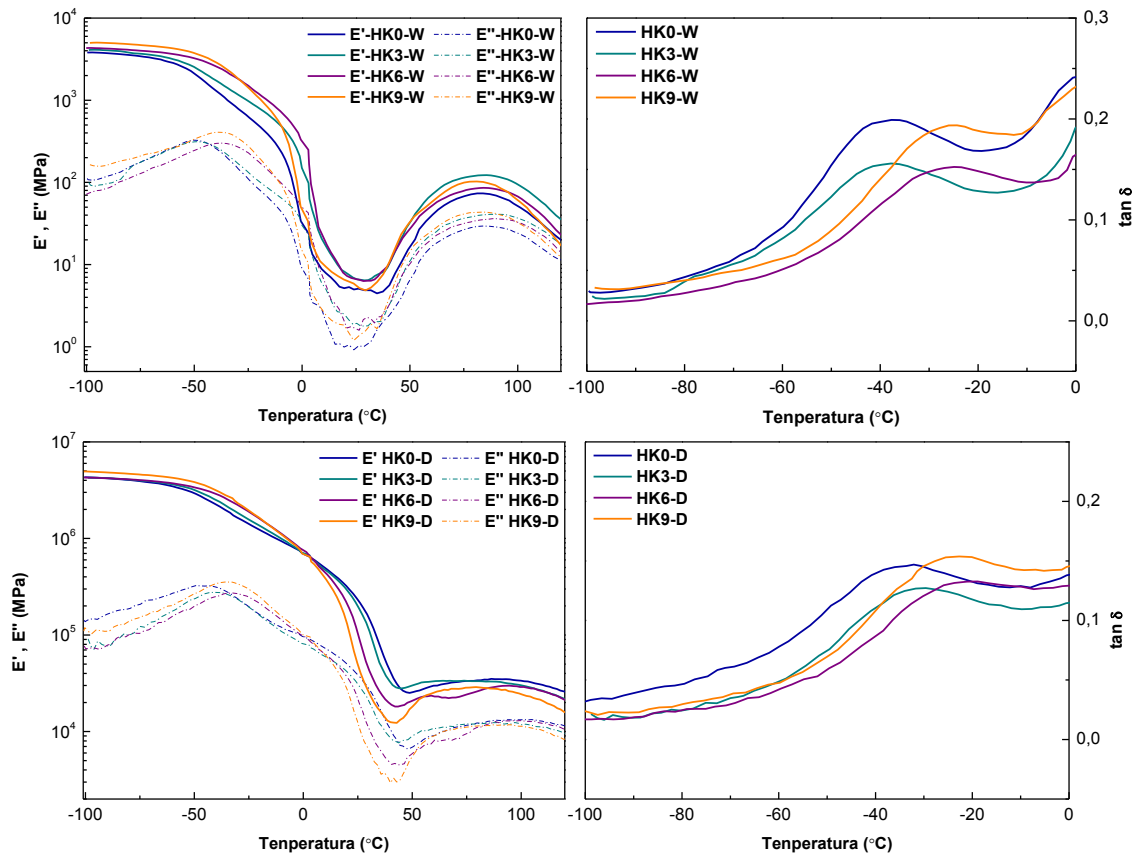
| Filma        | TS<br>(MPa)               | EB<br>(%)                   | EM<br>(MPa)                 |
|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>HK0-W</b> | 4,03 ± 0,14 <sup>a</sup>  | 103,92 ± 10,10 <sup>a</sup> | 113,79 ± 4,42 <sup>a</sup>  |
| <b>HK3-W</b> | 4,83 ± 0,27 <sup>b</sup>  | 97,80 ± 7,44 <sup>a</sup>   | 104,25 ± 13,19 <sup>a</sup> |
| <b>HK6-W</b> | 5,12 ± 0,66 <sup>bc</sup> | 98,03 ± 8,49 <sup>a</sup>   | 99,28 ± 10,06 <sup>a</sup>  |
| <b>HK9-W</b> | 5,59 ± 0,53 <sup>c</sup>  | 97,68 ± 8,99 <sup>a</sup>   | 97,29 ± 10,87 <sup>a</sup>  |
| <b>HK0-D</b> | 7,47 ± 1,01 <sup>a</sup>  | 131,37 ± 7,83 <sup>a</sup>  | 112,68 ± 9,62 <sup>a</sup>  |
| <b>HK3-D</b> | 8,09 ± 0,83 <sup>ab</sup> | 110,44 ± 8,23 <sup>b</sup>  | 109,40 ± 10,04 <sup>a</sup> |
| <b>HK6-D</b> | 8,92 ± 0,56 <sup>bc</sup> | 101,34 ± 2,65 <sup>bc</sup> | 104,19 ± 5,99 <sup>a</sup>  |
| <b>HK9-D</b> | 9,52 ± 0,90 <sup>c</sup>  | 94,27 ± 9,78 <sup>c</sup>   | 101,58 ± 8,95 <sup>a</sup>  |

<sup>ac</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak, Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

Aurreko atalean azaldu den katearen mugikortasunaren efektua berresteko, hainbat HK kantitate dituzten soluzio-metodoaren eta konpresio-metodoaren bidez prestatutako SPI filmen pilaketa modulua (E'), galera modulua (E'') eta galera faktorearen ( $\tan\delta$ ) kurbak temperaturaren funtziopean aztertu ziren eta hauek **5.9. irudian** ageri dira. **5.9a. irudian** eta **5.9c. irudian** ikusten denez, konpresio-metodoaren bidez egindako filmetan E' eta E'' balioak altuagoak ziren, DSC analisian azaldu den bezala egonkortasun termiko altuago bat iradokiz. Lagin guztientzat eta temperatura eremu osoan, pilaketa modulua galera modulua baino altuagoa zen. Hala ere, temperaturaren igotzeak filmen portaera termo-mekanikoan eragin zuen. Temperatura igotzen zen heinean, moduluen balioek behera egin zuten balio minimo bat lortuz: 45 °C ingurukoa konpresio-filmetan eta 30 °C ingurukoa soluzio-filmetan. Horren ondoren, eta 80 °C arte, igoera bat ikusi zen. Beste ikerkuntza-lan batzuetan ikusi denez, moduluen handitze hori proteinetan gertatutako disulfuro loturen saretzearekin erlazionatuta egon daiteke (Fernández-Espada et al., 2016). Temperatura



horretatik aurrera 120 °C arte, soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmen modulu balioak txikiagotzen hasi ziren, konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmen balioak egonkorrak mantentzen ziren bitartean.



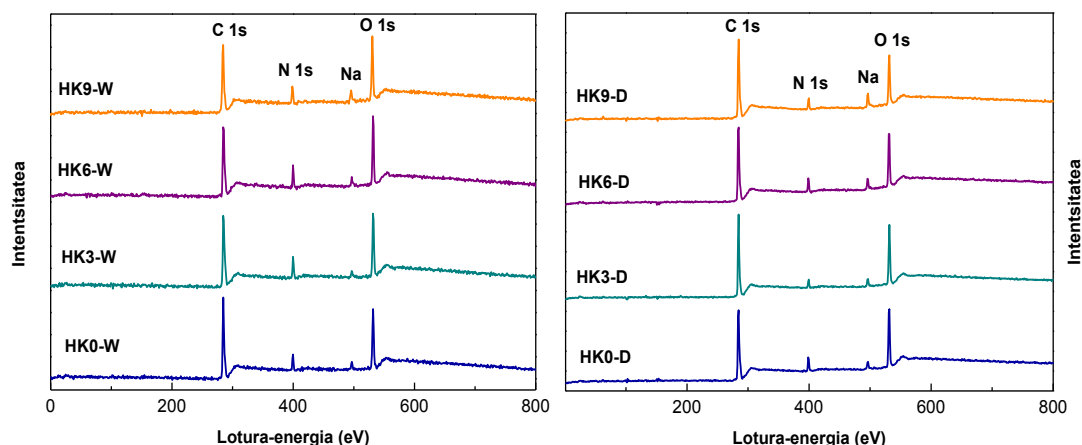
**5.9. irudia.** Soluzio-metodoaren (a eta b) eta konpresio-metodoaren bidez (c eta d) prestatutako SPI-an oinarritutako filmen pilaketa modulua ( $E'$ ), galera modulua ( $E''$ ) eta galera faktorearen ( $\tan\delta$ ) kurbak temperaturaren menpe eta HK kantitatearen funtziopean.

Propietate mekanikoak  $\tan\delta$ -rekin ere erlaziona daitezke eta  $\tan\delta$ -ren maximoak beira trantsizio temperatura ( $T_g$ ) definitzen du. Jakina denez,  $T_g$ -ren handitzea filmen erresistentzia handitzearen emaitza da (Moore et al., 2006). Testuinguru horretan, **5.9.b** eta **5.9.d irudietan**  $\tan\delta$ -rekin erlazionatutako kurbak erakusten dira. Irudietan bi trantsizio agertzen dira. Lehenengoa, HK0-W-rentzat -45 °C inguruan eta HK0-D-rentzat -40 °C inguruan, glizerolaren beira trantsizio temperaturarekin ( $T_{g1}$ ) erlazionatuta dago, non glizerola proteinarekin arinki lotuta dagoen. Bigarrena, HK0-W-rentzat 50 °C

inguruan eta HK0-D-rentzat 45 °C inguruan, proteinaren beira trantsizio temperaturarekin ( $T_{g2}$ ) erlazionatuta dago, non glizerolak hidrogeno-loturez sortutako egitura bat garatzen duen proteinarekin (Chen eta Zhang, 2005; Dou et al., 2016). HK-ren gehikuntzak,  $T_{g1}$  eta  $T_{g2}$  handitu zituen film guztietan. Handitze horrek TS balio handiagoak eta EB balio txikiagoak izatea bultzatu zuen, **5.4. taulan** agertzen diren balioekin bat eginez.

#### 5.2.2.4 Gainazal propietateak

Soja-proteinan oinarritutako filmetan keratina hidrolizatuaren gehikuntzak gainazalaren aldaketa kimikoetan duen efektua XPS bidez aztertu zen. **5.10. irudian** 4 seinale desberdin agertzen dira C 1s, N 1s, Na 1s eta O 1s-rekin erlazionatuta.



**5.10. irudia.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen XPS espektoak, HK kantitatearen funtziopean.

Sodia lumen hidrolisian erabilitako NaOH kantitatearekin dago erlazionatua. Horrela, seinalearen intentsitate handiagotze bat ikusi zen HK gehitu zenean. Jakina da, C eta O atomoen banda-frekuentzia aldatzen dela konposatuen arteko interakzioen ondorioz; hori dela eta, seinaleen intentsitate aldaketa bat gertatzea espero zen prozesatze-metodo desberdinak erabili zirenean, baita keratina hidrolizatuaren kantitate

desberdinak gehitzerakoan ere (Guerrero et al., 2013). HK0-W filmen kasuan, C 1s-ren intentsitatea O 1s-rena baino altuagoa zen. Hala ere, bi banden intentsitateak HK-ren gehikuntzarekin berdindu ziren. Konpresio-filmekin kontrakoa gertatu zen: C eta O atomoen seinaleen intentsitateak berdinak ziren keratina hidrolizatua ez zenean gehitu.

**5.10. irudian** agertzen den informazioa osatzeko, **5.5. taulan** filmen gainazaleko C 1s, O 1s eta N 1s atomoen kontzentrazioa eta O/C eta N/C ratioak agertzen dira. Goian azaldu den bezala, film batetik bestera gainazalaren konposizioa aldatzen da, erabilitako prozesatze-metodoaren zein gehitutako keratina hidrolizatuaren arabera. Konpresio-metodoaren bidez prestatutako filmen kasuan, aldaketak esanguratsuagoak izan ziren. HK gehikuntzarekin, C-aren kontzentrazioa handitu zen O-arena txikitzen zen bitartean, **5.10. irudian** ikusten den bezala. Horrela, O/C ratioa 0,34tik 0,23ra aldatu zen HK kantitatea %0tik %9ra handitu zenean. N kantitateari dagokionez, bere kontzentrazioa HK kantitatearekin handitu egin zen soluzio filmetan, konpresio filmetan, ordea, txikitu egin zen; horren ondorioz, N/C ratioa handitu zen soluzio filmetan eta konpresio filmetan txikitu. Gertaera horrek, gainazalean zeuden amino taldeen edukia soluzio-metodoaren bidez prestatutako filmetan altuagoa zela adierazten du.

**5.5. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen XPS analisiaren bidez lortutako konposizioari buruzko informazioa, HK kantitatearen funtziopean.

| Filma | C (%) | O (%) | N (%) | O/C  | N/C  |
|-------|-------|-------|-------|------|------|
| HK0-W | 72,29 | 20,91 | 6,45  | 0,29 | 0,09 |
| HK3-W | 68,81 | 21,61 | 9,26  | 0,31 | 0,13 |
| HK6-W | 70,22 | 21,09 | 8,16  | 0,30 | 0,12 |
| HK9-W | 70,47 | 20,86 | 8,03  | 0,29 | 0,11 |
| HK0-D | 69,08 | 23,41 | 6,95  | 0,34 | 0,10 |
| HK3-D | 72,16 | 22,89 | 4,33  | 0,32 | 0,06 |
| HK6-D | 73,88 | 19,80 | 5,49  | 0,27 | 0,07 |
| HK9-D | 75,85 | 17,26 | 5,14  | 0,23 | 0,07 |

C 1s seinalea 3 seinale desberdinetan banatu zen: C1 (C-C eta C-H), C2 (C-O eta C-N) eta C3 (C=O). C1-ek filmaren izaera hidrofoboa definitzen du; C2 eta C3, ordea, gainazalaren bustitzea laguntzen duten talde funtzionalei dagozkie (Li et al., 2015; Zhao et al., 2011). **5.6. taulan** ikusten den bezala, konpresio-filmetan C1 edukia altuagoa zen. Gainera, C1 balioak HK gehikuntzarekin handitu ziren, filmen hidrofobotasuna handituz, WCA balioak berretsiz. Garbi ikus daiteke keratina hidrolizatua gehitzean gainazalean talde kimikoen antolakuntza berria sortzen dela, gainazalaren hidrofobotasunaren aldaketa sustatuz.

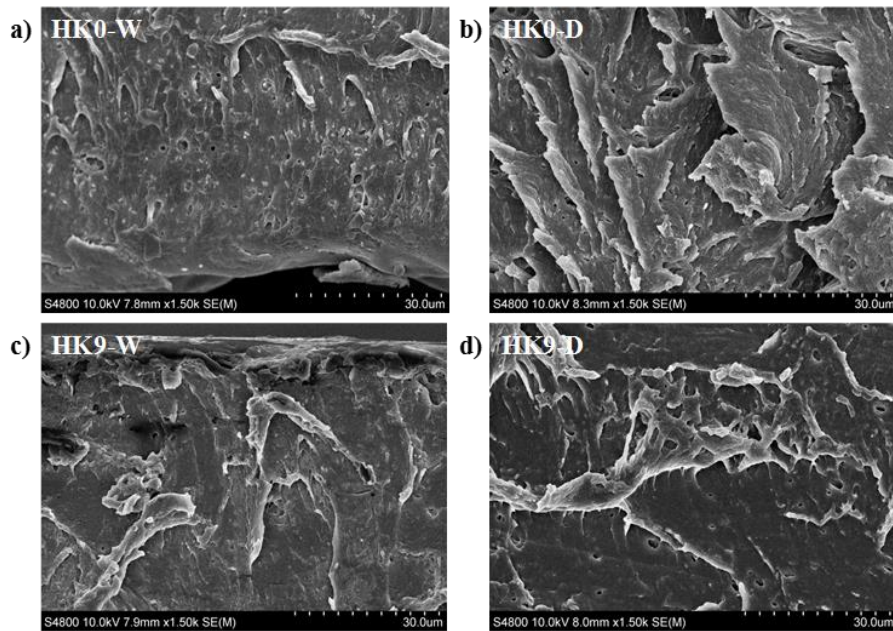
**5.6. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen XPS analisiaren bidez zehaztutako C1, C2 eta C3 edukiak, HK kantitatearen funtziopean.

| Filma | C1 (%) | C2 (%) | C3 (%) |
|-------|--------|--------|--------|
| HK0-W | 52,82  | 12,66  | 6,78   |
| HK3-W | 45,78  | 13,31  | 9,69   |
| HK6-W | 46,76  | 15,43  | 8,02   |
| HK9-W | 48,68  | 14,08  | 7,71   |
| HK0-D | 44,75  | 16,61  | 7,72   |
| HK3-D | 50,65  | 15,96  | 5,55   |
| HK6-D | 51,91  | 15,20  | 6,76   |
| HK9-D | 55,09  | 14,49  | 6,27   |

**5.7. taula.** Soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmen distira balioak, HK kantitatearen funtziopean.

| Filma | Distira <sub>60°</sub> (DU) |
|-------|-----------------------------|
| HK0-W | 10,60 ± 0,11 <sup>a</sup>   |
| HK3-W | 8,20 ± 0,05 <sup>b</sup>    |
| HK6-W | 5,50 ± 0,04 <sup>c</sup>    |
| HK9-W | 4,40 ± 0,11 <sup>d</sup>    |
| HK0-D | 33,60 ± 1,23 <sup>a</sup>   |
| HK3-D | 6,60 ± 0,36 <sup>d</sup>    |
| HK6-D | 10,60 ± 2,61 <sup>c</sup>   |
| HK9-D | 23,40 ± 1,17 <sup>b</sup>   |

<sup>ad</sup>Zutabe berean eta sekzio berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak, Duncanen froga anizkoitzaren arabera.



**5.11. irudia.** Soluzio-metodoaren (HK0-W eta HK9-W) eta konpresio-metodoaren bidez (HK0-D eta HK9-D) prestatutako 0 eta %9 keratina hidrolizatua duten filmen zeharkako sekzioaren SEM argazkiak.

Filmek gainazalaren propietateei buruzko informazio gehiago izateko, distiraren ebaluazioa gauzatu zen. Izan ere, distira filmek gainazalaren zimurtasunarekin zuzenki erlazionatuta dago, gainazala zimurra denean distira balio txikiagoak edukiz (Ward eta Nussinovitch, 2017). **5.7. taulan** soluzio-metodoaren (W) eta konpresio-metodoaren (D) bidez garatutako SPI filmek distira balioak agertzen dira. 70 °-ko balioa erreferentziatzat hartu zen eta hau baino balio altuagoak zituzten filmak gainazal leundun material distiratsu bezala definitu ziren (Trezza eta Krochta, 2000). Soluzioaren bidez prestatutako filmekin konparatuta, konpresioaren bidez prestatutako filmek distira balio altuagoak erakutsi zituzten gainazal leunagoa izateagatik. Horrek **5.11. irudian** agertzen diren SEM argazkiekin bat egiten du, prozesaketan aplikaturiko presioaren ondorioz. Gainera, keratina hidrolizatuaren gehikuntzak filmetan distira balioak esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) txikitu zituen. Hala nola, %9 HK gehitu zenean, soluzio-filmek distira balioak 10,60 °-tik 4,40 °-ra txikitu ziren. Konpresio-filmek kasuan, balio hauek 33,60 °-tik 23,40 °-ra arte txikitu ziren. Emaizta hauek, HK-rekin prozesatutako filmak

distiratsuagoak zirela baieztatzen dute. Horrek bat egiten du **5.11. irudian** ikusten den gainazal leunarekin.

## ONDORIOAK

Proteinan oinarritutako film berriztagarriak soluzio-metodoaren eta konpresio-metodoaren bidez prestatu ziren nekazaritza-industriako hondakinak eta azpiproduktuak lehengai gisa erabiliz, keratina oilo-lumetatik eta soja-proteina soja-olioaren produktiotik lortuz. Tratamendu alkalinoaren erabilera giro tenperaturan metodo egokia izan zen keratina hidrolizatu lortzeko. Proteina hau uretan disolbagarria zen eta sulfuro eduki naturala zuen, disulfuro loturak sustatzeko eta horrela proteinan oinarritutako formulazioan saretzea bultzatzeko egokia.

Oilo-lumetatik erauzitako keratinaren karakterizazio kimikoak zisteina edukiaren ugaritasuna konfirmatu zuen, baita proteinaren egituraren eragindako aldaketa esanguratsuak ere, proteinaren disolbagarritasuna sustatu zutenak. Soja-proteina/keratina hidrolizatuaren filmetan egindako beste analisi batzuk konposatuen arteko bateragarritasun ona erakutsi zuten eta horregatik, film gardenak lortu ziren. Konpresioaren bidez prestatutako filmek propietate mekaniko hobeak lortu zituzten trakzio-erresistentziari dagokionez, zeina keratina hidrolizatuaren gehikuntzarekin handitu zen. Ikusi zenez, filmen ura xurgatzeko ahalmena konstante mantendu zen 24 ordu ostean, egonkortasun handia iradokiz.

Ondorioz, soja-proteina formulazioan keratina hidrolizatuaren gehikuntzak aukera berriak irekitzen ditu egonkortasun handiagoa duten film jasangarriak garatzeko. Hauek elikadura aplikazioetarako eta aplikazio farmazeutikoetarako film aktibo eta biodegradagarriak garatzeko erabili daitezke.





# 6.

*kapitulua*

## **AGARRAREN EFEKTUA ESTRUSIOAREN BIDEZ LORTUTAKO PELLETTAN BAITA KONPRESIO FILMETAN ERE**

*Garrido T., Etxabide A., Guerrero P., de la Caba K. (2016)*

*Characterization of agar/soy protein biocomposite films: effect of agar on the extruded pellets and compression moulded films. Carbohydrate Polymers, 151, 408-416*

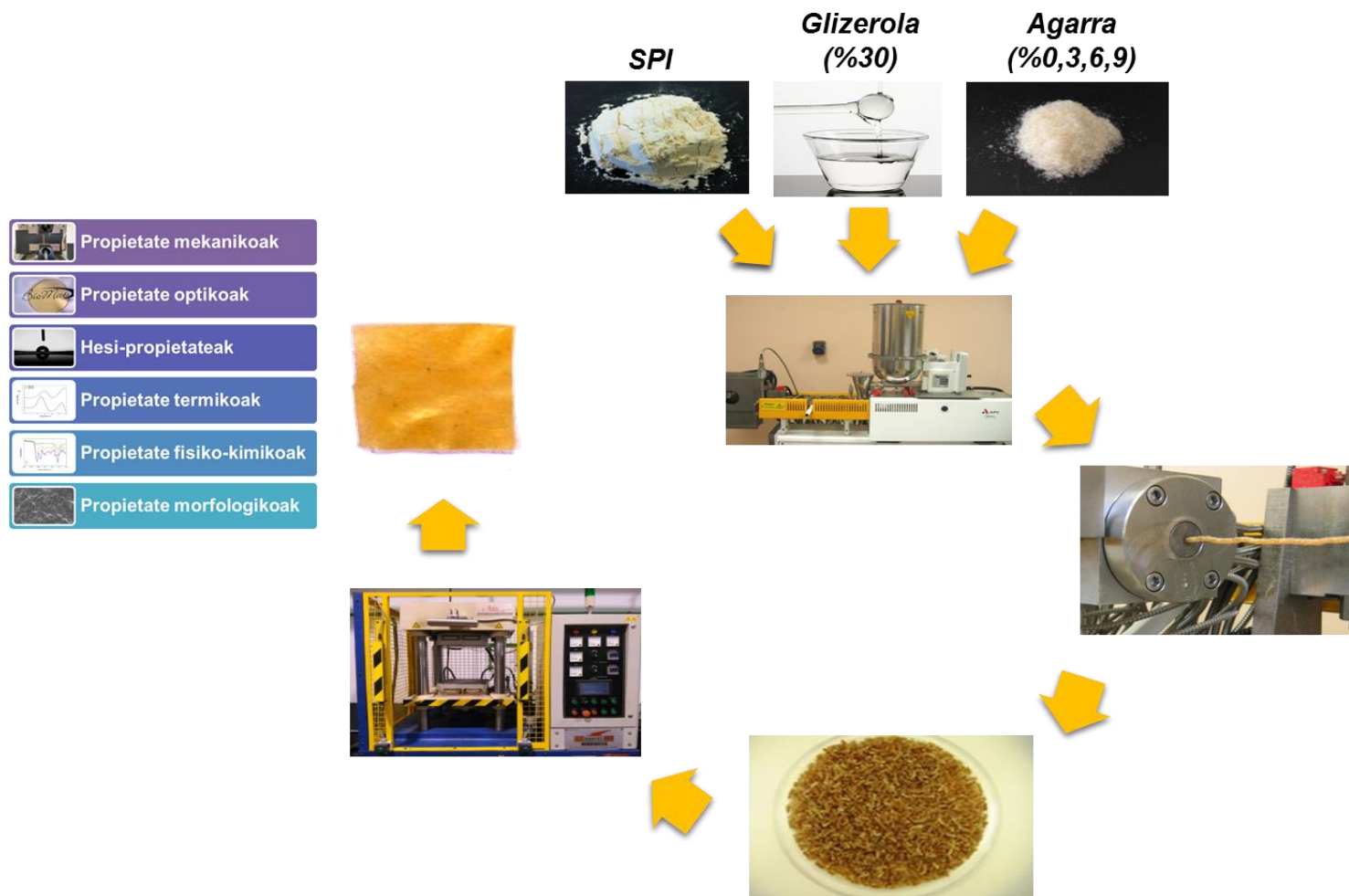


## LABURPENA

Biodegradagarriak eta berriztagarriak diren filmak, polisakaridoen eta proteinen arteko nahastura bidez prestatu daitezke. Oro har, biopolimeroen nahasteen bateragarritasunaren araberakoak dira amaierako propietate fisiko eta kimikoak. Izan ere, bateragarritasuna biopolimeroen molekulen zenbait ezaugarrien menpe dago, esaterako, egitura kimikoaren eta konformazioaren menpe. Testu inguru honetan, agarra itsasoko zenbait alga gorritik (*Gracilaria*, *Gelidium* eta *Pterocladia*) lortu daitekeen polisakaridoa da. Agarra agarosa eta agaropektinaren arteko nahaste bat da eta sulfatazio maila desberdina izan dezake alga motaren arabera baina, orokorrean, katearen osagai nagusiak  $\beta$ -1,3-lotura-D-galaktosa eta  $\alpha$ -1,4-lotura-3,6-anhidro-l-galaktosa dira. Polisakarido honek soja-proteinarekin elkarreagin dezake, sare interkonektatu bat osatuz eta filmen propietate fisiko-kimikoak hobetuz. Gainera, biopolimero hauen nahastetik sortzen den efektu sinergetikoak egitura funtzional berriak sortu ditzake eta ondorioz, aplikazio berriak sustatu.

Estrusio metodoari dagokionez, nahiz eta polisakarido batzuentzako pelletak ekoizteko teknika arrunta izan, ez daude ikerketa asko proteina/polisakarido nahasteen estrusio-bidezko ekoizpenean lan egiten dutenak. Aipatzekoa da, estrusio prozesuan zehar, energia mekanikoaren disipazio likatsua nagusitzen dela, batez ere hezetasun-maila baxuetan, teknika hau ekonomikoki eta energetikoki guztiz eraginkorra eginez. Jakina denez, estrusio prozesuak proteinaren desnaturalizazioa eragiten du, proteina-kateen eta beste polimero batzuen arteko elkarrekintzak erraztuz. Horrela, kapitulu honetan, soja-proteina/agarrez osaturiko filmak estrusioaren eta konpresioaren bidez lortu ziren. Gainera, helburu nagusia, estrusio prozesuan zehar gertatzen diren egitura-

aldaketak aztertzea izan zen, baita agarrak amaierako egituran izandako eragina analizatzea ere; izan ere, informazio gehiegirik ez dago biopolimeroen nahasketetan gertatzen diren aldaketa molekularrei buruz. Filmen propietate fisiko-kimikoak, optikoak, morfologikoak eta mekanikoak ere aztertu ziren.



**I Irudia.** 6. kapituluaren laburpen grafikoa.

## 6.1 PELLETEN ETA FILMEN PRESTAKETA

### 6.1.1 Pelleten prestaketa

Pelletak prestatzeko, soja proteina (SPI) eta glizerola (Gly) (%30) elkarrekin nahastu ziren Stephan UMC 5 nahasgailu batean 5 minutuz eta 1500 bira minutuko abiaduran. Agar (AG) gabeko lagin hau kontrol gisa erabili zen (AG0). SPI-a agarra erabiliz ordezkaturia izan zen, zehazki %3, 6 eta 9 masa portzentajetan; lortutako filmak AG3, AG6 eta AG9 gisa izendatu ziren, hurrenez hurren.

Nahastea elikadura-toberan sartu eta urarekin nahastu zen torloju bikoitzeko estrusio makina batean. Estrusorako lau zonaldeen berokuntza guneen tenperaturak, sarreratik irteerara, 70, 80, 95 eta 100 °C-an finkatu ziren, eta amaierako tenperatura 100 °C-an. Froga guztiak 0,16 kg/h-ko ur abiadurarekin egin ziren, ur ponpa peristaltiko bat erabiliz. Estrusio makinaren abiadura konstantea 250 bira minututan zehaztu zen eta elikatze abiadura 1 kg/h-tan. Estrusio makina 3 mm-ko irteera gunek bakar batekin hornituta zegoen eta bere ekoizpena 0,141 kg/h·mm<sup>2</sup> zen.

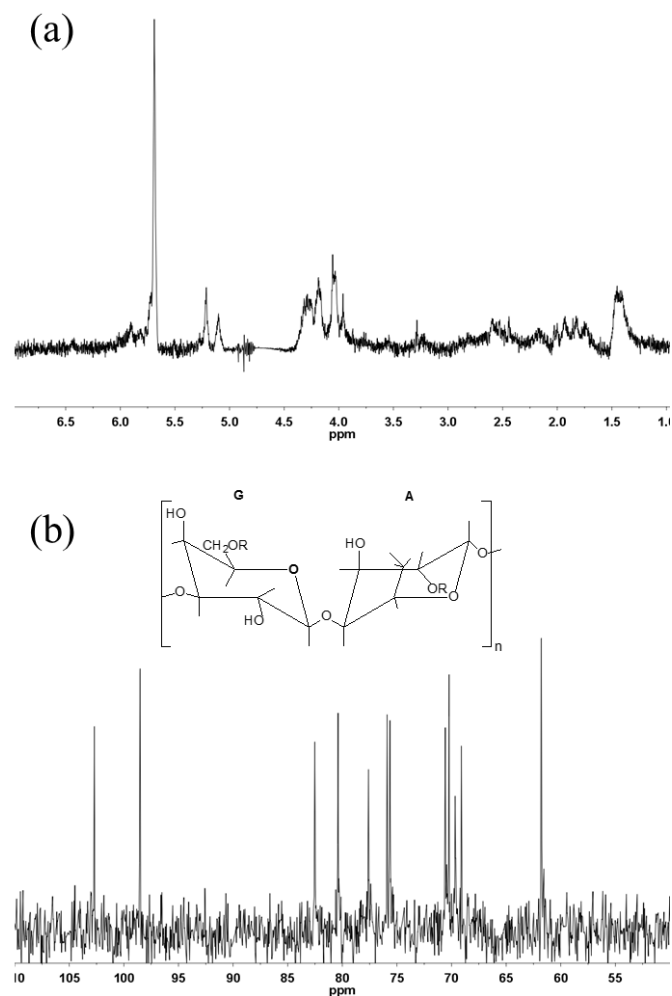
### 6.1.2 Filmen prestaketa

Estrusio prozesuan lortutako pelletak aluminiozko bi xaflen artean ipini ziren eta 130 bar-eko presioa ezarri zitzaien 2 minutuz 150 °C-an berotuta zegoen prentsan konpresio filmak lortzeko.

## 6.2 EMAITZAK

### 6.2.1 Agarraren karakterizazioa

*Gelidium sesquipedale*-tik erauzitako agarra aztertzeko NMR analisia egin zen. Agarraren  $^1\text{H}$  NMR espektroa **6.1a. irudian** aurkezten da. Metil protoiei dagokien seinalea 1,43 ppm-an agertu zen (Barros et al., 2013) eta 5,69 ppm-an agertutako seinalea, berriz, pirubatoa duen D-galaktosa hondarrarekin lotuta dagoen l-galaktosa hondarraren H-1-rekin erlazionatu zen (Murano et al., 1992). Metilazioagatik sortzen den seinalea (3,41 ppm) ez zen espektroan ikusi.



**6.1. irudia.** *Gelidium sesquipedale*-tik erauzitako agarraren. (a)  $^1\text{H}$  NMR eta (b)  $^{13}\text{C}$  NMR espektroak.

Agarraren  $^{13}\text{C}$  NMR espektroa **6.1b. irudian** aurkezten da. Espektro honetan 12 seinale ikusten dira: 6 seinale  $\beta$ -D-galaktopiranosarekin (G) erlazionatuta daudenak eta beste 6 seinale 3,6 anhidro- $\alpha$ -L-galaktopiranosarekin (A) erlazionatuta daudenak. Hondar bakoitzak kimikoki desberdinak diren sei karbono atomo ditu eta hurrengo moduan izendatu ziren: G1-G6 galaktopiranosilentzako eta A1-A6 anhidro galaktopiranosilentzako. **6.1b. irudian** ikusten denez, galaktosan dauden karbono atomo bakoitzeko seinaleak hurrengoak dira: G1 102,7 ppm-an, G2 70,6 ppm-an, G3 82,5 ppm-an, G4 69,1 ppm-an, G5 75,6 ppm-an eta G6 61,8 ppm-an. Azkenik, anhidro galaktosan dauden karbono atomoen seinaleak hurrengoak dira: A1 98,5 ppm-an, A2 70,2 ppm-an, A3 80,4 ppm-an, A4 77,6 ppm-an, A5 75,9 ppm-an eta A6 69,7 ppm-an (Usov et al., 1980). 98,5 eta 61,1 ppm-an dauden seinaleak 4-O-sulfato-D-galaktopiranosarekin erlazionatuta daudenez, egitura sulfatatuta dagoela esan daiteke (Rochas eta Lahaye, 1989). Gainera, O-metil taldearekin erlazionatuta dagoen 59,1 ppm-ko seinalea ez egoteak, agarosa egiturak metilazio maila baxua duela adierazten du (Usov et al., 1983).

### 6.2.2 Propietate fisiko-kimikoak

Energi mekaniko espezifikoa (SME), pelletaren dentsitatea (PD) eta espantsio ratioa (ER) kontuan hartu beharreko faktoreak dira amaierako propietateetan zuzeneko eragina dutelako (Guerrero et al., 2014). SME, PD eta ER balioak **6.1. taulan** ageri dira agar kantitatearen funtziopean. SME materialaren estrusiorako ekipoaren motorrak egindako lana da eta bere balioak estrusio prozesuan zehar gertatzen diren molekulen apurketen hedapena adierazten du (Zhang et al., 2015). Agarra gehituzerakoan, materiala likatsuagoa bihurtzen da agarraren eta proteinaren arteko elkarrekintzengatik (Rocha et al., 2014). Honek, estrusora barruan marruskaduraren handitzea dakar eta ondorioz momentuaren balioa handiagoa izatea beharrezkoa da. Hori dela eta, SME balioak



972 kJ/kg-tik 1044 kJ/kg-ra handitu ziren, proteinaren desnaturalizazioa hobetuz. Emaidza hauek DSC-ren bidez lortutako emaitzekin berretsi ziren. PD eta ER balioen kasuan, agarraren gehikuntzak ez zuen aldaketa esanguratsurik ( $p > 0,05$ ) eragin. Izan ere, agarraren eta proteinaren arteko elkarrekintzek ez zituzten prozesuan zehar burbuilak sortu eta, beraz, pelleten bolumena ez zen aldatu eta dentsitatea konstante mantendu zen. Oro har, estrusioaren bidez lortutako produktua jarraitua eta homogenea zen.

**6.1. taula.** Pelleten energia mekaniko espezifikoa (SME), dentsitatea (PD) eta espantsio ratioa (ER) agar kantitatearen funtziopean.

| Pelleta | SME<br>(kJ/kg)         | PD<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | ER                       |
|---------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| AG0     | 972 ± 12 <sup>a</sup>  | 1,63 ± 0,13 <sup>a</sup>   | 3,37 ± 0,14 <sup>a</sup> |
| AG3     | 972 ± 9 <sup>a</sup>   | 1,59 ± 0,10 <sup>a</sup>   | 3,32 ± 0,08 <sup>a</sup> |
| AG6     | 1008 ± 18 <sup>b</sup> | 1,55 ± 0,09 <sup>a</sup>   | 3,35 ± 0,10 <sup>a</sup> |
| AG9     | 1044 ± 16 <sup>c</sup> | 1,53 ± 0,15 <sup>a</sup>   | 3,35 ± 0,12 <sup>a</sup> |

<sup>a,c</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Agar/soja-proteina filmei dagokienez, beren hezetasun-edukia (MC) agarraren kontzentrazioaren funtziopean kalkulatu zen eta emaitzak **6.2. taulan** ageri dira. Agar kantitatea handitzean, MC balioak esanguratsuki handitu ziren ( $p < 0,05$ ) agarrak duen ezaugarri higroskopikoagatik. WVP balioen txikitzea ( $p < 0,05$ ) azaltzeko, ur-lurrunarekiko iragazkortasunean parte hartzen duten hiru mekanismoak kontuan hartu behar dira: filmaren gainazalean gertatzen den ur-lurrunaren adsortzioa, filmetik zehar gertatzen den ur-lurrunaren difusioa eta azkenik, filmaren gainazaletik gertatzen den ur-lurrunaren desortzioa. Agar/soja-proteina filmetan, agarraren higroskopikotasunak ur-lurrunezko molekulak filmen barruan atxikitzea eragin zuen, WVP balioak nabarmenki ( $p < 0,05$ ) txikituz.

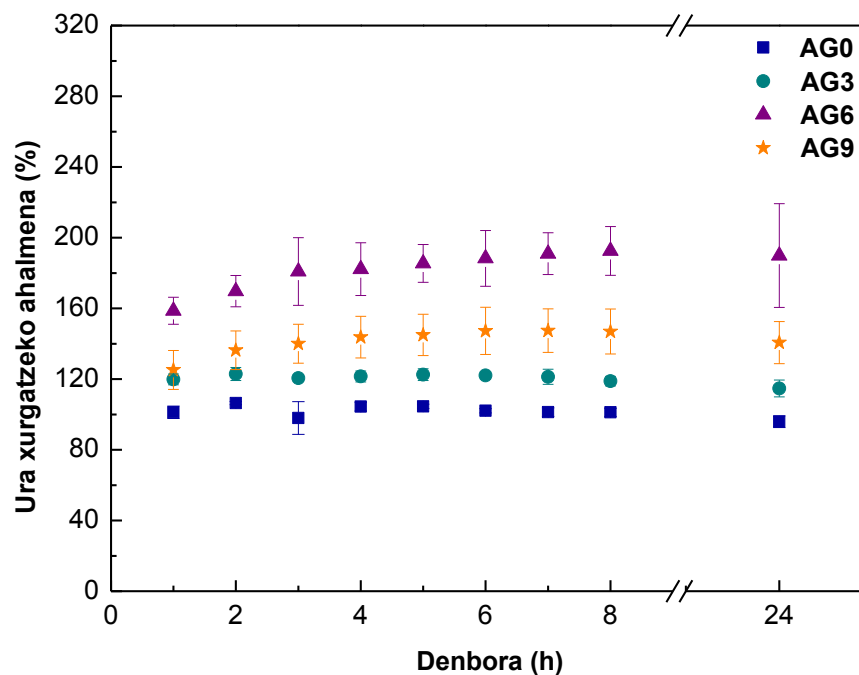
**6.2. taula.** Filmen hezetasun-edukia (MC), disolbagarritasuna (TSM) eta ur-lurrunarekiko iragazkortasuna (WVP) agar kantitatearen funtziopean.

| Filma | MC (%)                    | TSM (%)                   | WVP ( $10^{-12}$ g cm/cm <sup>2</sup> s Pa) |
|-------|---------------------------|---------------------------|---|
| AG0   | 17,32 ± 0,43 <sup>a</sup> | 30,45 ± 0,29 <sup>a</sup> | 8,57 ± 0,58 <sup>a</sup>                    |
| AG3   | 18,42 ± 0,27 <sup>b</sup> | 28,84 ± 0,25 <sup>b</sup> | 2,29 ± 0,18 <sup>c</sup>                    |
| AG6   | 20,49 ± 0,55 <sup>c</sup> | 27,74 ± 0,35 <sup>b</sup> | 2,95 ± 0,20 <sup>bc</sup>                   |
| AG9   | 21,51 ± 0,13 <sup>d</sup> | 26,91 ± 0,32 <sup>c</sup> | 3,88 ± 0,75 <sup>b</sup>                    |

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

**6.2. taulan** ikusten denez, agarraren gehikuntzak TSM balioak txikitu zituen. Filmen urarekiko erresistentziaren hobekuntza honek AG, SPI eta glizerolaren arteko elkarrekintzekin zerikusia du. Bestalde, filmen ura xurgatzeko ahalmenaren joera denboran zehar aztertu zen (**6.2. irudia**). Nahiz eta WU balioak agar kantitatearekin handitu ziren, kasu guztietan ura xurgatzeko ahalmenaren oreka aldi berean lortu zen. Ura xurgatzeko ahalmenaren prozesua filmaren hidratazioaren lehenengo etapan gertatzen da. Etapa honetan, ur-molekulek biopolimeroekin hidrogeno loturak eratzen dituzte, biopolimeroen kateen arteko elkarrekintzak murriztuz eta ondorioz, ura xurgatzeko ahalmena handitzen da (Madera-Santana et al., 2014).

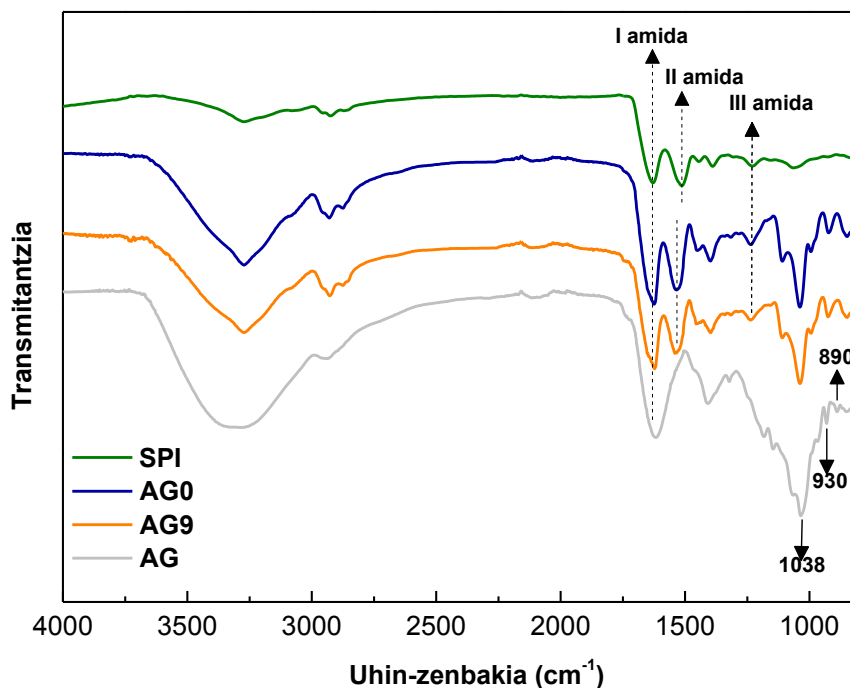
Bestalde, filmak garatzean osagaien artean sortutako elkarrekintzek filmaren egituraren eragin dezakete (Phan The et al., 2009); hortaz, FTIR analisiaren bidez elkarrekintza hauek aztertu ziren. SPI, AG, AG0 eta AG9 FTIR espektroak **6.3. irudian** azaltzen dira.



**6.2. irudia.** Filmen ura xurgatzeko ahalmenaren joera denboran zehar, agar kantitatearen funtziopean.

SPI osagaiaren kasuan, hiru dira proteinaren absortzio-banda nagusiak:  $1630\text{ cm}^{-1}$ -ean, C=O loturaren luzatzearekin erlazionatutako banda (I amida);  $1530\text{ cm}^{-1}$ -ean, N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatutako banda (II amida); eta  $1230\text{ cm}^{-1}$ -ean, C-N loturaren luzatzearekin eta N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatutako banda (III amida) (Su et al., 2008).  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ -eko tartean agerturiko banda zabala O-H eta N-H talde aske eta lotuei dagokie, eta talde hauek hidrogeno loturak eratu ditzakete proteinaren peptido loturen karbonilo taldearekin. Glizerol konposatuaren banda nagusiak,  $800\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ -era daudenak, AG0 eta AG9 espektroetan aurkitzen dira. Glizerolak bost absortzio-banda erakusten ditu, C-C eta C-O loturen bibrazioei dagozkienak.  $850$ ,  $925$  eta  $995\text{ cm}^{-1}$ -eko bandak C-C eskeletoaren bibrazioei dagozkie,  $1045\text{ cm}^{-1}$ -eko banda C1-en eta C3-n dauden C-O loturaren luzapenarekin erlazionatzen da, eta  $1117\text{ cm}^{-1}$ -eko banda C2-n dagoen C-O loturaren luzapenarekin erlazionatzen da. Agarraren kasuan,  $3300\text{ cm}^{-1}$ -ean agerturiko banda zabala O-H loturei dagokie eta

agarraren eta proteinaren hidroxilo taldeen arteko hidrogeno lotura berriak sortzeko ahalmena erakustez gain, agarraren hidroxilo taldeen eta proteinaren amino taldeen arteko loturak adierazten ditu ere. Gainera, agarrarekin erlazionatutako bandak 930 eta 890  $\text{cm}^{-1}$ -ean ikusi ziren, 3,6 anhidrogalaktoza zubiak eta  $\beta$ -galaktosaren C-H-rekin erlazionatu zirenak, hurrenez hurren (Freile-Pelegrín et al., 2007). 1038  $\text{cm}^{-1}$ -ean agerturiko banda zabala, polisakarido guztietan agertzen dena, C-O loturarekin erlazionatuta dago. 1617  $\text{cm}^{-1}$ -ean agerturiko bandak I amidaren bibrazioekin zerikusia dauka, agarrean geraturiko proteinari dagokiona. Agarraren gehikuntzarekin, 1038  $\text{cm}^{-1}$ -eko absortzio banda frekuentzia altuetara desplazatu zen eta 930 eta 890  $\text{cm}^{-1}$ -ean bandak, agar puruarekin erlazionatuta daudenak, agarra eta soja-proteinaren arteko elkarrekintzengatik desagertu ziren.



**6.3. irudia.** Filmen FTIR espektroak agar kantitate desberdinekin (AG0 eta AG9) eta konposatu puruen espektroak (SPI eta AG).

I amida banda proteinaren egitura sekundarioaren menpekoa da eta I amida profilean dauden zenbait osagaien banden kopurua eta posizioa zehazteko erabiltzen da. Gauzak horrela, kurbaren egokitze tratamendu bat egin zen, egitura sekundario mota definitzen duten osagaien proportzio erlatiboak kuantitatiboki kalkulatzeko. Banda honen deskonposizioari dagokionez, I amidaren profilak lau osagai nagusi ditu: eraztun aromatikoekin,  $\beta$ -xafla egiturarekin (2 osagai),  $\alpha$ -helize egiturarekin eta  $\beta$ -bira egiturarekin erlazionatuta egon daitezkeenak. Filmen FTIR espektroetan agertzen diren banden bigarren deribatuak **6.3. taulan** aurkezten dira agar kantitatearen funtziopean, eta banda hauek bat datoz proteinan dauden zenbait egitura sekundarioekin. Ikusten denez, espektroetan  $\alpha$ -helize ( $1649\text{ cm}^{-1}$ ) eta  $\beta$ -xafla ( $1620$  eta  $1675\text{ cm}^{-1}$ ) egitura sekundarioak nagusitu ziren, eta  $1690\text{ cm}^{-1}$  inguruan agertu zen  $\beta$ -bira egitura ez zen hain nabaria (Bonwell eta Wetzel, 2009). Agarraren gehikuntzak, alde batetik,  $\alpha$ -helize bandaren azalera handitu zuen eta, beste aldetik,  $\beta$ -xaflarena txikitu zuen. Portaera honek polisakaridoaren gehikuntzak proteinaren egitura sekundarioa aldatzen duela konfirmatu zuen, bi biopolimeroen arteko elkarrekintzen ondorioz.

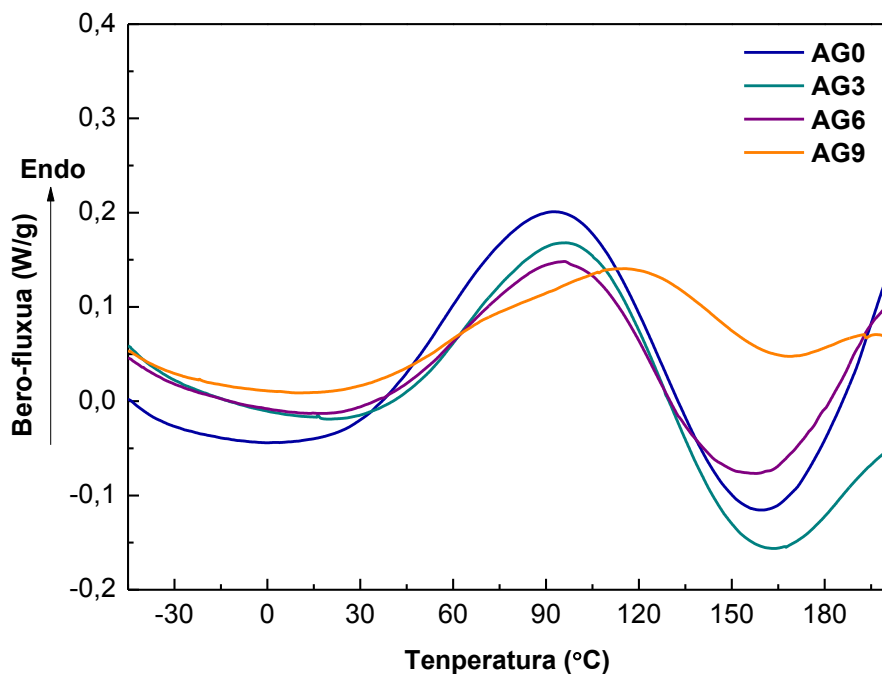
**6.3. taula.** I amida bandatik lortutako egitura sekundarioaren determinazioa agar kantitatearen funtziopean.

| Filma | Azalera (%)           |                       |                       |                       |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|       | $1620\text{ cm}^{-1}$ | $1649\text{ cm}^{-1}$ | $1675\text{ cm}^{-1}$ | $1690\text{ cm}^{-1}$ |
| AG0   | 35                    | 45                    | 19                    | 1                     |
| AG3   | 30                    | 50                    | 19                    | 1                     |
| AG6   | 29                    | 52                    | 17                    | 2                     |
| AG9   | 29                    | 53                    | 16                    | 2                     |

### 6.2.3 Propietate termikoak

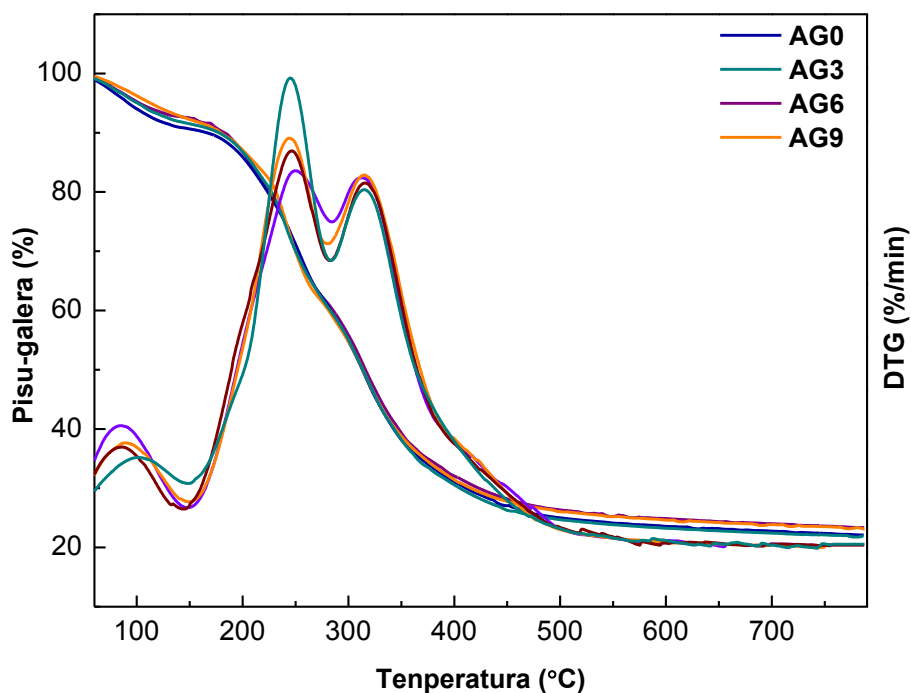
Filmen DSC termogramak agar kantitatearen funtziopean **6.4. irudian** aurkezten dira.  $90$  eta  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  artean piko endotermiko bat agertu zen, uraren lurrunketari

zegokiona eta soja-proteinaren 7S globulinen desnaturalizazioa erraztu zuena (Kumar et al., 2002). Desnaturalizazio termiko honek proteinaren molekulen arteko elkarrekintzen apurketa, zabaltzea eta agregazioa sustatu zituen. Ikusten denez, %9 agar zuen filmaren termograman aipaturiko seinalearen azalera nabarmenki txikitu zen beste filmekin alderatuz gero. Entalpia murrizketa hau proteinaren desnaturalizazio mailaren handitzearekin erlazionatu zen, desnaturalizazio-tenperatura 100 °C-tik 125°C-ra igotzea eragin zuena. Hau, agarrak duen proteina kantitatearekin erlazionatuta egon daiteke, FTIR eta kolore analisiak berretsi zuten moduan. Prozesatze-metodoari dagokionez, estrusio prozesuak proteina desnaturalizatzen laguntzen duela esan daiteke. Horrela izanda, desnaturalizazioaren eraginez zabaldutako proteina-kateek sistemari gehitutako osagaiekin erreakzionatu dezakete, eratutako sare polimerikoan aldaketak sustatuz (Guerrero et al., 2014).



**6.4. irudia.** Filmen DSC termogramak agar kantitatearen funtziopean.

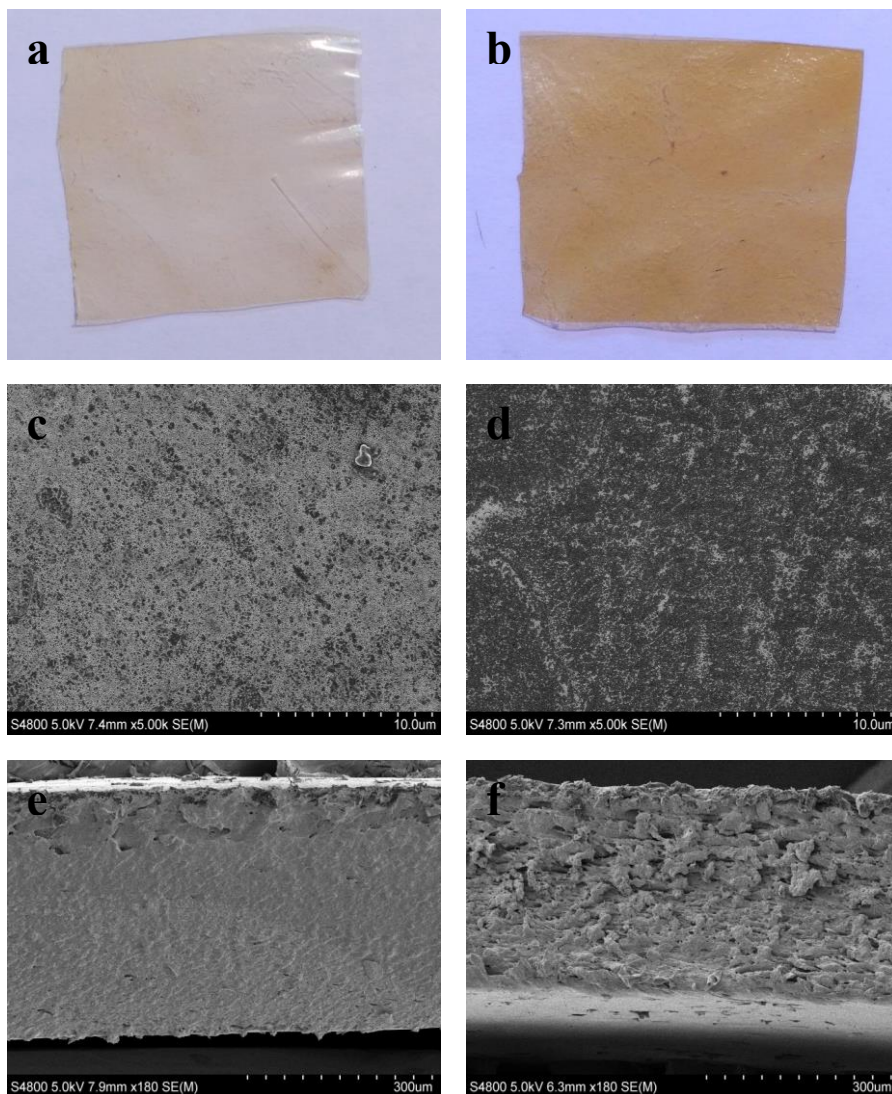
TGA saiakuntzak egin ziren filmen egonkortasun termikoa aztertzeko eta TGA eta DTG kurbak **6.5. irudian** azaltzen dira. Filmek portaera berdina aurkeztu zuten kasu guztietan, hiru etapa nagusi desberdinduz: lehenengo etapa, 90 °C inguruan ikus zitekeena, hezetasunaren lurrunketarekin erlazionatuta dago; bigarren etapa, 220 °C inguruan agertu zena, glizerolaren lurrunketari dagokio (Rhim et al., 2013). Temperatura hau, plastifikatzailearen irakite-tenperatura baino altuagoa denez (182 °C), glizerola eta biopolimeroen arteko interakzio-maila egokia baieztatzen da. Gainera, AG kantitatea handitzearekin piko honen intentsitatea handitu zela ikusi zen, glizerolaren eta agarraren arteko interakzioak berretsiz. Azkenik, hirugarren etapa, 300 °C inguruan, soja-proteinaren eta agarraren degradazioekin erlazionatuta dago (El-Hefian et al., 2012).



**6.5. irudia.** Filmek TGA termogramak agar kantitatearen funtziopean.

### 6.2.4 Propietate optiko eta morfologikoak

Produktu baten bildukiaren kanpoko itxura zuzenki erlazionatuta dago produktu hori onartzeko edo baztertzeko joerarekin; horregatik, propietate optikoen neurketa garrantzitsua da. **6.6a** eta **6.6b irudietan** ikusten denez, film guztiak gardenak ziren, nahiz eta AG9 filmek gainontzeko filmek baino kolore horixkagoa aurkeztu. Hala ere, **6.6c** eta **6.6d irudietan** ikusten denez, lagin guztiek azalera homogeneoa aurkezten zuten.



**6.6. irudia.** AG0 eta AG9 filmen itxura (a-b) eta filmen azaleraren (c-d) eta zeharkako sekzioaren (e-f) SEM irudiak.



Filmen kolorearen eta distiraren balioak **6.4. taulan** ageri dira. Soja-proteinazko filmen kolore hori bereizgarria  $b^*$  parametroarekin erlazionatua dago. Parametro hau, agarraren gehikuntzarekin esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) handitu zen, agarrak filmei urrekolorea eman baitzien.  $a^*$  parametroari dagokionez, kontrol-filmak kolore berdeagoa erakusten zuen agarra zuten biokonpositeek baino, filmak agarra gehitzean gorriagoak bihurtu zirelako. Kolore gorrixka hau, agarrak duen proteina kantitateari dagokio, eta hau FTIR analisiaren bidez ikusi zen (López-Simeon et al., 2012). Kolore-diferentzia totala ( $\Delta E^*$ ) agar kantitatearekin esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) handitu zen eta  $L^*$  parametroa, aldiz, esanguratsuki ( $p < 0,05$ ) txikitu zen. Portaera hau, SME balioekin erlazionatu zen, SME balioen handitzearekin produktu ilunagoak lortzen direla adieraziz (Fang et al., 2014). Hala ere, TGA-n ikusi denez, kolore ilunak ez du zerikusirik materialaren degradazio termikoarekin.

Distira filmen azaleraren morfologiarekin zuzenki erlazionatuta dago, zimurtasuna handitzean distira txikitzen delako. Gauzak horrela, filmak konpresio-metodoaren bidez prestatu direnez, konpresioak filmen gainazalean duen eragina distira neurtuz azertu zen (Ward eta Nussinovitch, 1997). Lagin guztien distiraren balioak distiraren balio estandarra (70 DU) baino baxuagoak ziren, filmak distira gutxikoak eta zimurtasun handikoak zirela adieraziz (Trezza eta Krochta, 2000). Gehituriko agar kantitatea handitzean, berriz, distira balioak txikitu zirela ikusi zen, agarrak filmen morfologian aldaketak sustatu zituela adieraziz. Morfologian gertatutako aldaketa hauek, filmen osagaien arteko elkarrekintzak konfirmatzen dituzte, FTIR analisisan ikusi zen moduan.

**6.4. taula.** Filmen kolore eta distiraren balioak agar kantitatearen funtziopean.

| Filma | L*                        | a*                        | b*                        | $\Delta E^*$              | Distira <sub>60°</sub><br>(DU) |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| AG0   | 89,30 ± 0,45 <sup>a</sup> | -0,26 ± 0,16 <sup>a</sup> | 19,54 ± 0,66 <sup>a</sup> |                           | 39,70 ± 9,15 <sup>a</sup>      |
| AG3   | 88,63 ± 0,21 <sup>b</sup> | 0,09 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 24,95 ± 0,05 <sup>b</sup> | 5,47 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 49,80 ± 9,23 <sup>a</sup>      |
| AG6   | 86,92 ± 0,37 <sup>c</sup> | 0,80 ± 0,07 <sup>c</sup>  | 29,36 ± 0,28 <sup>c</sup> | 10,16 ± 0,35 <sup>b</sup> | 27,70 ± 9,79 <sup>b</sup>      |
| AG9   | 81,57 ± 0,16 <sup>d</sup> | 3,47 ± 0,07 <sup>d</sup>  | 38,94 ± 0,17 <sup>d</sup> | 21,21 ± 0,19 <sup>c</sup> | 25,90 ± 6,81 <sup>b</sup>      |

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Gardentasunaren eta argi-transmisioaren balioak **6.5. taulan** aurkezten dira. Alde batetik, filmek 200 nm-tik 280 nm-ra UV argiaren absorbantzia altua erakutsi zuten eta hau proteinan dauden zenbait kromofororengatik (tirosina, fenilalanina eta triptofanoa) dela esan dezakegu, konposatu hauek 300 nm-tik behera argia absorbatzeko gaitasuna dutelako (Li et al., 2004). Beste aldetik, gardentasuna osagaien arteko bateragarritasunaren adierazlea da (Liu eta Zhang, 2006). Filmen gardentasuna altua zenez, agar, proteina eta glizerolaren arteko bateragarritasuna berretsi zen eta ondorioz, filmek eskala makroskopikoan egitura homogenea zutela baieztatu daiteke. Hala ere, polisakaridoaren gehikuntzarekin gardentasuna txikitu zen, filmetan agarrezko aglomerazioak eratu zirela iradokiz, SEM irudietan ikusi zen moduan.

**6.5. taula.** Filmen propietate optikoak agar kantitatearen funtziopean: argi transmisioa (%), eta gardentasuna (T) ( $A_{600}/\text{mm}$ ).

| Filma | 200 nm | 280 nm | 500 nm  | 600 nm  | T                 |
|-------|--------|--------|---------|---------|-------------------|
| AG0   | 0,0026 | 0,0088 | 65,5362 | 72,5163 | 1,11 <sup>a</sup> |
| AG3   | 0,0077 | 0,0100 | 54,0951 | 64,4303 | 1,64 <sup>b</sup> |
| AG6   | 0,0162 | 0,0116 | 51,0084 | 60,8420 | 1,72 <sup>b</sup> |
| AG9   | 0,0183 | 0,0164 | 46,4457 | 59,4931 | 1,56 <sup>b</sup> |

<sup>ab</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Osagaien arteko bateragarritasuna ekorketazko mikroskopio elektronikoaren bidez ikertu zen eta filmen zeharkako sekzioak **6.5e** eta **6.5f irudietan** ageri dira. Ikusten denez, filmen zeharkako sekzioak zimurrak ziren eta agarraren gehikuntzarekin sekzioak irregularragoak bihurtu ziren. Honek, AG kantitatea handitzean, molekulen

ordenamendu berria iradokitzen du konposatuen nahastean, agar eta soja-proteinaren arteko interakzioengatik, FTIR-en bidez ikusi den bezala. Izan ere, bi konposatuetan dauden hidroxilo taldeek molekulen arteko elkarrekintzak sustatzen dituzte hidrogeno loturen bidez eta, beraz, morfologia aldatu egiten da.

### 6.2.5 Propietate mekanikoak

Film guztiak mekanikoki erresistenteak ziren maneiatzerako orduan, baita egonkorrak biltegitratze ostean ere. Modulu elastiko (EM), trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazio (EB) balioak **6.6. taulan** aurkezten dira. AG9 filmen modulu elastikoaren balioen handitzeak filmen zurruntasunaren handitzea eragin zuen. Honen arrazoi nagusia, SEM irudietan ikusitako agar-agregazioak ziren eta ondorioz, TS eta EB balioak txikitu ziren. Hala ere, sistema honetan lortutako balioak beste proteina/polisakarido sistemetan lortutako balioak baino altuagoak ziren (Coughlan et al., 2004; Zárte-Ramírez et al., 2014). Tian eta lankideek (2011) adierazi zuten moduan, prozesatze-metodoek propietate mekanikoetan eragina dute. Autore hauek soluzio-metodoaren bidez garatutako agar/soja-proteina filmen eta konpresio-metodoaren bidez lortutako filmen propietate mekanikoen arteko konparaketa egin zuten eta emaitzak aztertuz, soluzio-metodoaren bidez egindako filmek propietate mekaniko hobeak zituztela ikusi zen, filmen egitura homogeenagoa zelako. Hala ere, metodo termomekanikoen erabilera merkatu-bideragarritasunarekin zuzenki erlazionatuta dagoenez, prozesatze-metodoak eta baldintzak optimizatu beharko liriateke propietate mekanikoak hobetzeko helburuarekin.

**6.6. taula.** Filmen haustura-elongazioa (EB), trakzio-erresistentzia (TS) eta modulu elastikoa (EM) agar kantitatearen funtziopean.

| <b>Filma</b> | <b>EB<br/>(%)</b>        | <b>TS<br/>(MPa)</b>     | <b>EM<br/>(MPa)</b>      |
|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>AG0</b>   | 65,1 ± 5,6 <sup>a</sup>  | 5,8 ± 0,4 <sup>a</sup>  | 75,0 ± 6,3 <sup>a</sup>  |
| <b>AG3</b>   | 48,4 ± 5,3 <sup>ab</sup> | 5,9 ± 1,0 <sup>a</sup>  | 83,0 ± 3,5 <sup>a</sup>  |
| <b>AG6</b>   | 48,7 ± 6,8 <sup>ab</sup> | 5,1 ± 0,8 <sup>ab</sup> | 87,5 ± 2,7 <sup>a</sup>  |
| <b>AG9</b>   | 28,6 ± 2,4 <sup>b</sup>  | 4,3 ± 0,5 <sup>b</sup>  | 100,2 ± 5,4 <sup>b</sup> |

<sup>ab</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

## ONDORIOAK

Estrusio- eta konpresio-metodoak plastikoen industrian erabiltzen diren teknika nagusiak izan arren, metodo hauek ez dira agar/soja-proteinazko filmak garatzeko askotan erabili. Hala ere, kapitulu honetan, agar eta soja-proteinazko filmak metodo hauen bidez garatu ziren. Teknika hauek erabiltzerakoan, agar eta proteinaren arteko elkarrekintzak sortzen zirela ikusi zen, proteinaren egitura sekundarioan konformazio aldaketak eraginez. Gainera, agarraren eta proteinaren arteko bateragarritasun onak film gardenak eta homogeenak lortzen lagundu zuen. Bestalde, agarraren gehikuntzak, filmaren disolbagarritasuna gutxitu zuen eta ura xurgatzeko ahalmena handitu. Propietate hauei esker, garatutako filmak industria farmazeutikoan edo elikadura-aplikazioetarako erabil litezke.



# 7.

*kapitulua*

## **ALGA HONDAKIN BETEGARRIZ GARATUTAKO SOJA-PROTEINAZKO BIOKONPOSITEAK**

*Garrido T., Peñalba M., de la Caba K., Guerrero P. (2016)*

*Injection-manufactured biocomposites from extruded soy protein with algae waste as a filler. Composites Part B, 86, 197-202*



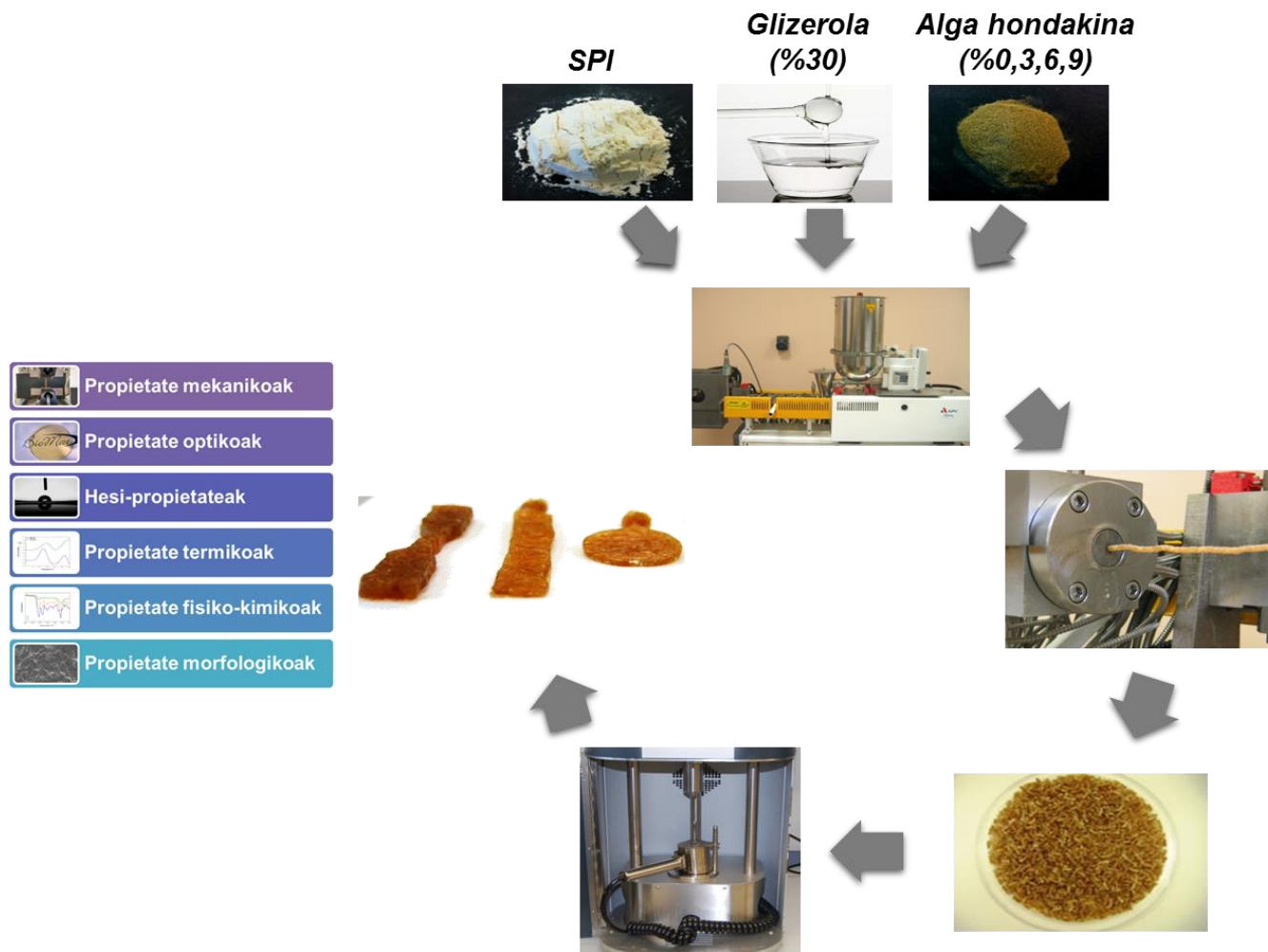


## LABURPENA

Proteinetan oinarritutako biokonpositeen bideragarritasun komertziala aplikazio industrialetan erabilitako teknikekin zuzenki erlazionatuta dago. Aurreko kapituluaren ikusi den moduan, estrusio metodoa erabili daiteke soja-proteinan oinarritutako biokonpositeak garatzeko. Kapitulu honetan, konposite sintetikoak garatzeko erabiltzen den beste teknika bat aztertu da: injekzioa. Prozesatze-metodo horren erabilerak, proteinetan oinarritutako biokonpositeen aplikazioa industria-mailan sustatu dezake.

Prozesatze-metodoaz gain, soja-proteinan oinarritutako biokonpositeak prestatu ziren agar-industria-hondakin natural batekin, betegarri gisa erabili zena. Hondakin horren erabilerak honako bi abantaila hauek izan ditzake: batetik, hondakina balorizatzea; eta, bestetik, koste baxuagoko lehengai erabiltzea. Hain zuzen, ekonomiarako eta ingurumenerako onurak ekar ditzake konposite jasangarriagoen garapenak.

Testuinguru honetan, kapitulu honen helburuak honakoak dira: (i) alga-hondakina betegarri gisa erabiltzea biokonpositeak garatzeko, (ii) soja-proteinan oinarritutako biokonpositeen garapenerako estrusio- eta injekzio-metodoak aztertzea, eta (iii) lortutako biokonpositeen karakterizazioa egitea.



**I irudia.** 7. kapituluaren laburpen grafikoa.

## 7.1 BOKONPOSITEEN PRESTAKETA

Biokonpositeak prestatzeko, soja proteina (SPI), glizerola (Gly) eta alga-hondakina (AW) elkarrekin nahastu ziren, 5 minutuz eta 1500 bira minutuko abiadura aldakorreko Stephan mixer, model UMC 5 batean. SPI-a, masa portzentajearen arabera, alga-hondakinen pisuko %3, %6 eta %9 portzentajearen ordezkatu zen eta laginak AW3, AW6 eta AW izendatu ziren. Aurreko lan batean lortutako emaitzen arabera (Guerrero et al., 2013), %30eko glizerol (proteinarekiko masa portzentajearen arabera) erabiltzea erabaki zen. Platifikatzailearen portzentaje hau, prozesu termo-mekanikoetan laginak ez hausteko erabili daitezkeen kantitate minimoa da. AW gabeko lagina, kontrol gisa erabili zen (AW0).

Nahastea elikadura-toberan sartu eta urarekin nahastu zen torloju bikoitzekeo estrusio-makina batean. Erabilitako estrusio-makinaren diametroa 19 mm-koa zen eta luzera/diametro ratioa 25:1-koa. Berokuntza gunearen lau zonaldeen temperatura, sarreratik irteerara, 70, 80, 95 eta 100 °C-an finkatu zen, eta amaierako temperatura 100 °C-an ezarri zen. Froga guztiak 0,15 kg/h-ko ur abiadurarekin burutu ziren, ur ponpa peristaltiko bat erabiliz. Estrusio-makinaren abiadura konstantea 250 bira minututan zehaztu zen, beharrezko energia 2 kW/h-tan eta elikatze abiadura 1 kg/h-tan. Estrusio-makina 3 mm-ko irteerako gune bakar batekin hornituta zegoen eta bere ekoizpena 0,141 kg/h·mm<sup>2</sup> zen.

Estrusioan lortutako pelletak, Type I ASTM trakziorako laginetan eraldatu ziren Haake Minijet II injekziorako makina erabiliz. Laginak lortzeko 450 bar-eko presioa eta 120 °C-ko temperatura erabili ziren.

## 7.2 EMAITZAK

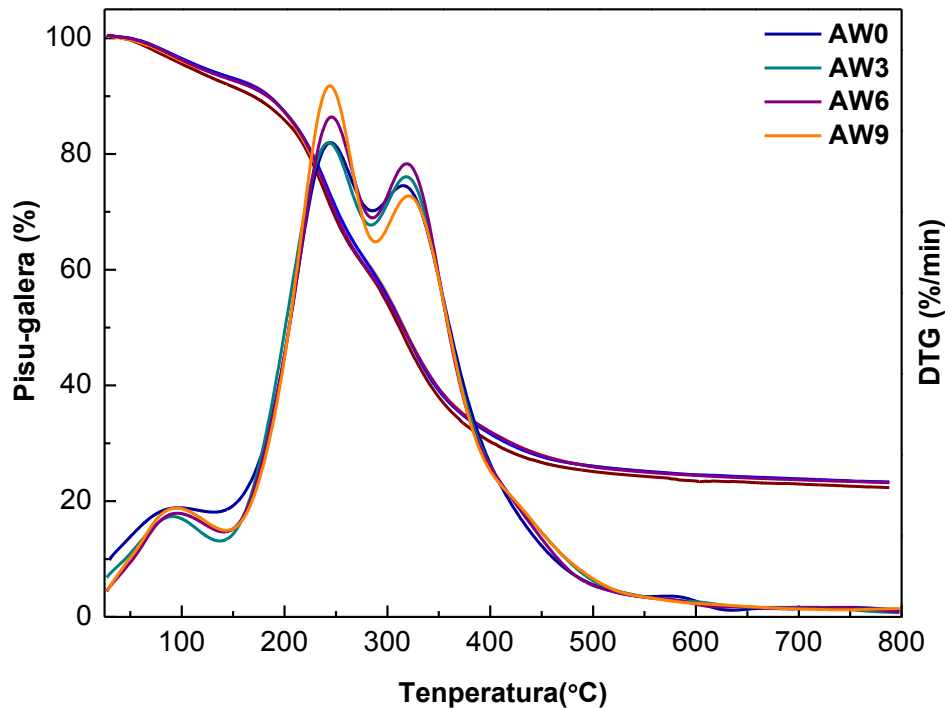
### 7.2.1 Estrusio-prozesua

Hasteko, TGA saiakuntzak egin ziren laginen temperaturarekiko portaera aztertzeko. TGA eta DTG kurbak **7.1. irudian** azaltzen dira eta lau etapa desberdintzen dira: 100 °C inguruan dagoen pisu-galera hezetan-galerari dagokio; 240 °C inguruan dagoen hurrengo pisu-galera glizerolaren lurrunketarekin erlazionatuta dago. Tenperatura hau plastifikatzailearen irakite-tenperatura (182 °C) baino altuagoa denez, SPI eta glizerolaren arteko interakzio-maila egokia dela adierazten du (Guerrero et al., 2011); hurrengo pisu-galera nagusia, 340 °C-an, bai soja-proteinen bai alga hondakinean dagoen proteinen degradazioari dagokio; azkeneko etapa 450 eta 600 °C bitartean gertatzen da eta betegarriak dituen metal lurrunkorren eta karbonatoen deskonposizioarekin erlazionatuta dago (Liu et al., 2007).

Behin ziurtatuta biokonpositeak prozesatuko diren tenperaturan materialaren degradazioa gertatzen ez dela, estrusio-makinan zehar materialaren jariora sorrarazteko behar den energia mekanikoa neurtu zen. SME balioak **7.1. taulan** aurkezten dira. Proteinetatik material termoplastikoak garatzeko, interakzio ez kobalenteak eta molekulen arteko elkarrekintzak kontrolatu behar dira. Plastifikatzailea proteinen kateen artean kokatzean biokonpositeen prozesaketa hobetzen da. Plastifikatzailearen efektua lubrikazioaren eta bolumen librearen handitzearekin erlazionatzen da.

Kapitulu honetan, ura eta glizerola erabili ziren plastifikatzaile gisa. Ura eta glizerola molekula txikiak direnez, proteinen kateen artean erraztasun handiz sartzen dira. Plastifikatzaile hauek aminoazido talde polarrekin elkarrekintzak sortzen dituzte hidrogeno loturen bidez, proteinen arteko interakzioak saihestuz eta materialaren plastifikazioa eraginez. Aurreko ikerkuntza-lan batean ikusi zen bezala, SME balio

baxuak erabili daitezke plastifikatzaile nahikoa erabiltzen bada (Guerrero et al., 2012; Harper, 1989).



**7.1. irudia.** Biokonpositeen TGA eta DTG kurbak alga-hondakinaren funtziopean.

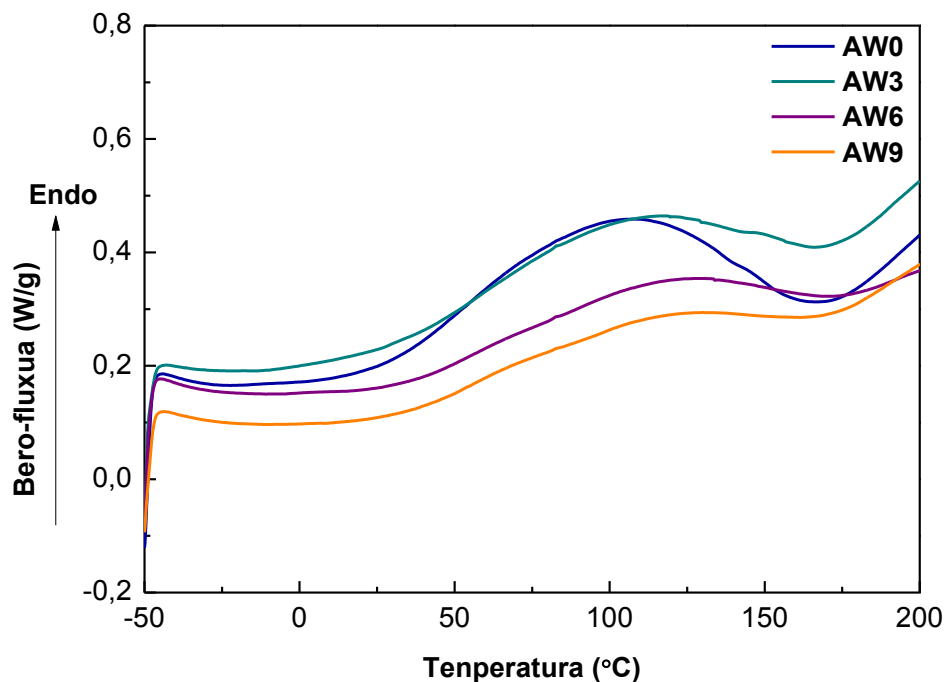
**7.1. taulan** erakusten denez, alga-hondakinaren gehitzeak SME balioen handitzea ( $p < 0,05$ ) eragiten du proteinaren desnaturalizatzeko-maila altuagoatik. Plastifikatzaileen erabilerak, proteinaren kateen arteko interakzioak txikitzen ditu (Guerrero et al., 2012) eta ondorioz, AW-ren difusioa hobetzen du eta beroak eragindako agregazioen formazio-abiadura moteltzen du. Laburbilduz, alga-hondakinak soja-proteinentzako desnaturatzaile gisa jokatzeko duela esan daiteke.

**7.1. taula.** Biokonpositeen energia mekaniko espezifikoa alga-hondakinaren funtziopean.

| <b>Filma</b> | <b>SME<br/>(kJ/kg)</b> |
|--------------|------------------------|
| <b>AW0</b>   | 972 ± 18 <sup>a</sup>  |
| <b>AW3</b>   | 990 ± 21 <sup>b</sup>  |
| <b>AW6</b>   | 1008 ± 24 <sup>c</sup> |
| <b>AW9</b>   | 1044 ± 17 <sup>d</sup> |

<sup>ad</sup>Zutabe berbera letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

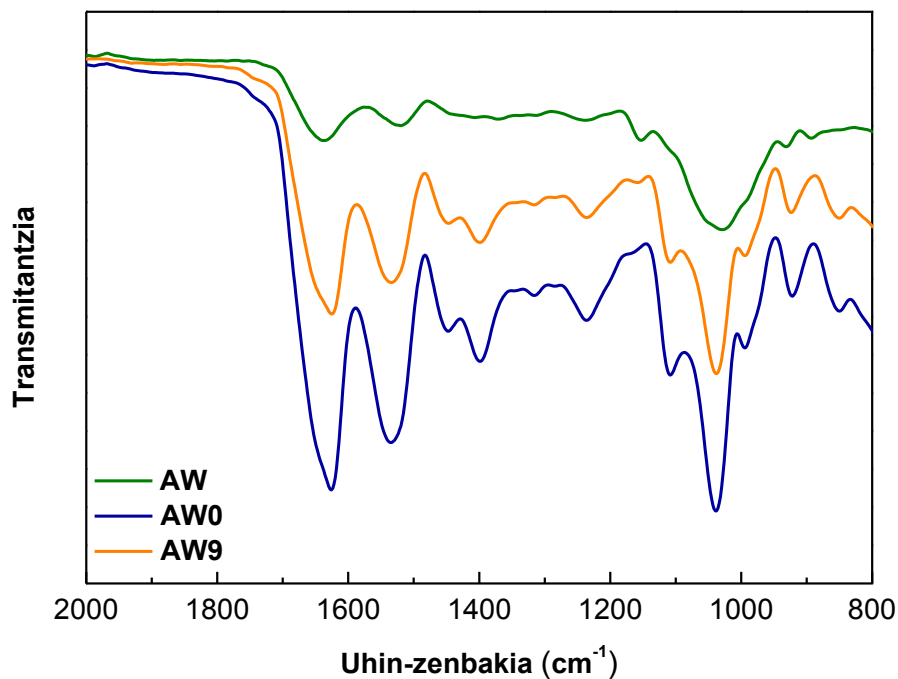
Ekorketa diferentzialeko kalorimetriaren bitartez, desnaturalizatzeko prozesua aztertu zen. Biokonposite bakoitzeko DSC termogramak **7.2. irudian** aurkezten dira. Ikusten denez, estrusio prozesuak ez zuen proteina guztiz desnaturalizatu baina 100 eta 125 °C artean piko endotermiko bat agertu zen, 7S globulinen desnaturalizaziori zegokiona (Liu et al., 2007). Desnaturalizatzeko prozesua molekulen arteko elkarrekintzen apurketarekin lotuta dagoenez, desnaturalizatzeko entalpien aldaketak loturen aldaketa horiekin erlazionatuta egon daitezke. Proteinek, zenbat eta lotura gutxiago edota ahulagoak izan, energia gutxiago behar dute desnaturalizatzeko prozesua emateko, eta horren ondorioz, termograman entalpiaren murrizketa ikusten da. Biokonpositeen kasuan, plastifikatzaile gisa erabili diren urak eta glizerolak proteinaren arteko elkarrekintzak txikitzen dituzte. Hori gertatzerakoan, alga-hondakina matrizean zehar erraztasun gehiagoz barreiatzen da, SPI-arekin interakzio onak sustatuz. **7.2. irudian** ikusten denez, alga-hondakina gehitzean kurba txikitzen da, edo beste modu batean esanda, betegarriaren kantitatea handitzen denean, bero fluxua txikitzen da. Gertaera horrek, betegarriak proteina desnaturalizatzen duela adierazten du. SME balioen igoerak ere desnaturalizatzeko efektua azpimarratzen du.



## 7.2. irudia. Biokonpositeen DSC termogramak alga-hondakinaren funtziopean.

Biokonpositeen osagaien arteko bateragarritasuna FTIR analisiaren bidez ikertzen. Espektroak **7.3. irudian** azaltzen dira. Hiru dira proteinaren absortzio-banda nagusiak:  $1630\text{ cm}^{-1}$ -ean, C=O loturaren luzatzearekin (I amida) erlazionatutako banda;  $1530\text{ cm}^{-1}$ -ean, N-H loturaren kurbadurarekin (II amida) erlazionatutako banda; eta  $1230\text{ cm}^{-1}$ -ean, C-N loturaren luzatzearekin eta N-H loturaren kurbadurarekin (III amida) erlazionatutako banda (Lodha eta Netravalli, 2005). Alga-hondakina proteinaz osatuta dagoenez, hiru absortzio-banda nagusi hauek biokonpositeen espektroetan ere ikusten dira. Bestalde,  $1038\text{ cm}^{-1}$ -ean agerturiko banda zabala, polisakaridoetan agertzen den C-O loturaren luzapenarekin erlazionatuta dago (Guerrero et al., 2014), alga-hondakinak duen zelulosa kantitatearen presentzia dela eta. Ikus daitekeenez, absortzio-banda hau frekuentzia altuetara ( $1045\text{ cm}^{-1}$ ) desplazatu egiten da, soja-proteina eta AW-ren artean interakzioak daudela adieraziz. Desplazamendu hau, SPI eta AW-ean dagoen

zelulosaren arteko hidrogeno-zubien eraketaren ondorioz gertatzen da. Portaera hau beste ikerketa-lan batzuetan ere ikusi daiteke (Guerrero et al., 2013; Tian et al., 2011).



**7.3. irudia.** Alga-hondakinaren (AW), kontrol-laginaren (AW0) eta %9 alga-hondakina duen laginaren (AW9) FTIR espektroak.

### 7.2.2 Hesi-propietateak

Biokonpositeen egonkortasuna ikertzeko, garrantzitsua da hesi-propietateen portaera aztertzea. Izan ere, olioarekiko iragazkortasuna, oxigenoaren transmisio-abiadura eta ur-lurrunarekiko iragazkortasuna neurtu ziren. Balioak **7.2. taulan** erakusten dira. Soja-proteinan oinarritutako biokonpositeek, lipidoen eta oxigenoaren kontrako hesi-propietate bikainak dituzte. Portaera hau SPI-aren ezaugarri hidrofiloagatik da. Gainera, soja-proteinan aminoazido polarren portzentajea %58koa da eta aminoazido hauek molekula ez polarrak absorbatzea ekiditen dute. Beste aldetik, prestatutako biokonpositeek, oxigenoarekiko hesi-propietate hobekak dituzte ontzigintzan erabiltzen diren polimero sintetiko batzuek baino; esate baterako,



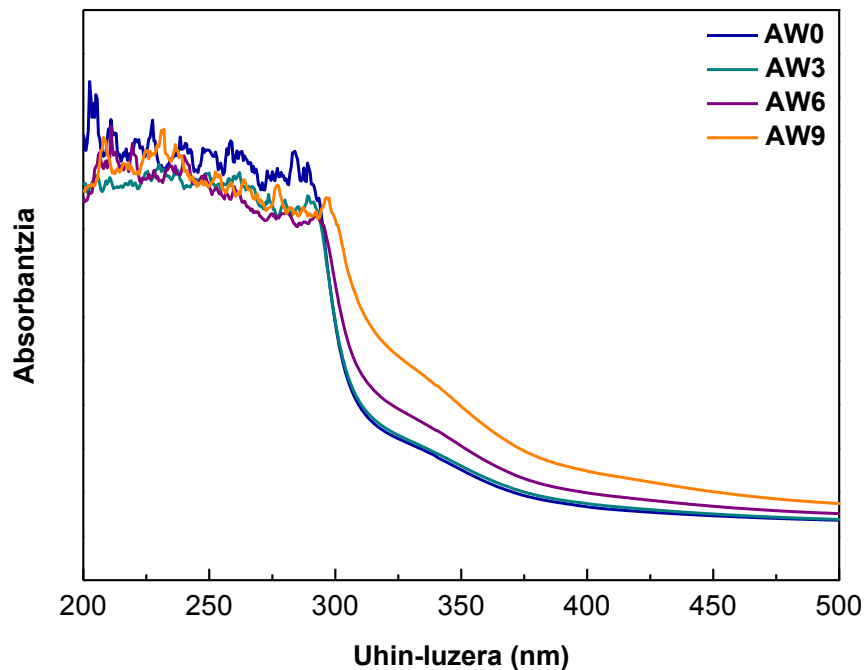
polietilenoa (PE) edo polietilen tereftalatoa (PET) (Norrahim et al.; 2013; Siró et al., 2010). Ur-lurrunarekiko iragazkortasunaren kasuan, balio altuak lortu ziren SPI-aren ezaugarri hidrofiloaren ondorioz. Alga-hondakina gehitzean berriz, osagaien arteko bateragarritasuna dela eta, hesi-propietateek ez zuten aldaketa esanguratsurik jasan ( $p > 0,05$ ). Ondorio hau, FTIR analisiaren bidez berretsi zen.

**7.2. taula.** Biokonpositeen olioarekiko iragazkortasuna (OP), oxigenoaren transmisio-abiadura (OTR) eta ur-lurrunarekiko iragazkortasuna (WVP) alga-hondakinaren funtziopean.

| Filma | OP (%)            | OTR ( $\text{cm}^3/\text{m}^2 \text{ day}$ ) | WVP ( $10^{-12} \text{g cm/cm}^2 \text{ s Pa}$ ) |
|-------|-------------------|--|--|
| AW0   | $0,38 \pm 0,02^a$ | $< 0,005$                                    | $8,2 \pm 0,3^a$                                  |
| AW3   | $0,37 \pm 0,03^a$ | $< 0,005$                                    | $8,6 \pm 0,5^a$                                  |
| AW6   | $0,38 \pm 0,01^a$ | $< 0,005$                                    | $8,6 \pm 0,4^a$                                  |
| AW9   | $0,37 \pm 0,02^a$ | $< 0,005$                                    | $8,6 \pm 0,3^a$                                  |

<sup>ad</sup>Zutabe berbera letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

SPI biokonpositeek duten UV argiarekiko erresistentzia neurtzeko, UV espektroskopia analisia erabili zen. Absorbantzia balioak **7.4. irudian** agertzen dira. SPI-an oinarritutako biokonpositeek, 200 nm-tik 280 nm-ra absorbantzia balio altuak erakutsi zituzten, proteinan dauden hainbat kromoforo direla eta. Kromoforo hauek (tirosina, fenilalanina eta triptofanoa) gai dira 300 nm-tik behera argia absorbatzeko (Li et al., 2004). Alga-hondakina gehituta, hesi-propietate bikainak mantendu ziren. Orokorrean biokonpositeek dituzten argiarekiko hesi-propietateak hobeak dira polipropilenoarenak (PP) edo polietilenoarenak (PE) baino (Guerrero et al., 2011b; Jakobsen et al., 2005). Lortutako emaitzek, biokonpositeen prebentzio-ahalmena iradokitzen dute; izan ere, UV argiak sortutako produktuaren oxidazioa atzeratu dezakete.



**7.4. irudia.** Biokonpositeen UV absorbantzia-kurbak alga hondakinaren funtziopean.

### 7.2.3 Propietate optikoak

Propietate optikoek nabarmen eragiten diote produktuaren kanpoko itxurari. Hori dela eta, biokonpositeen kolorea eta distira aztertu ziren. Distira balioak **7.3. taulan** agertzen dira. Kasu honetan, biokonpositeen distira balio guztiak 30 DU baino baxuagoak ziren, distira eskasa erakutsiz (Kible-Boeckler, 1996). Gainera, distira gainazalak duen zimurtasunarekin erlazioa daiteke, hau da, zimurtasuna handitu ahala, distira txikitzen doa (Villalobos et al., 2005). Gauzak horrela, biokonpositeek inprimatzeko gainazal egokia dute, bere zimurtasun handiaren ondorioz.

Koloreari dagokionez,  $a^*$  eta  $b^*$  parametroek garrantzi handia dute alga-hondakinaren berdetasun eta soja-proteinaren horitasun kolore bereizgarrien ondorioz. Parametro hauek, AW kantitatearekin areagotu ziren ( $p < 0,05$ ) eta kolore-aldaketak

( $\Delta E^*$ ), kontrolari dagokionez, joera bera jarraitu zuen ( $p < 0,05$ ) betegarriaren gehikuntzarekin.

### 7.3. taula. Biokonpositeen propietate optikoak alga-hondakinaren funtziopean.

| Filma | Distira <sub>60°</sub><br>(DU) | L*                      | a*                     | b*                      | $\Delta E^*$            |
|-------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| AW0   | 29,2 ± 2,3 <sup>a</sup>        | 72,2 ± 0,8 <sup>a</sup> | 6,3 ± 0,2 <sup>a</sup> | 39,1 ± 0,7 <sup>a</sup> |                         |
| AW3   | 28,6 ± 1,9 <sup>a</sup>        | 69,4 ± 0,3 <sup>b</sup> | 7,1 ± 0,1 <sup>b</sup> | 42,2 ± 0,7 <sup>b</sup> | 4,3 ± 0,6 <sup>a</sup>  |
| AW6   | 27,9 ± 2,4 <sup>a</sup>        | 64,5 ± 1,2 <sup>c</sup> | 8,1 ± 0,4 <sup>c</sup> | 45,1 ± 0,7 <sup>c</sup> | 9,9 ± 1,0 <sup>b</sup>  |
| AW9   | 26,9 ± 1,8 <sup>a</sup>        | 62,6 ± 0,7 <sup>d</sup> | 8,4 ± 0,2 <sup>c</sup> | 45,7 ± 0,9 <sup>c</sup> | 11,9 ± 0,3 <sup>c</sup> |

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

### 7.2.4 Propietate mekanikoak eta morfologia

Injekzio-moldeaketaren bidez garatutako soja-proteinan oinarritutako biokonpositeen propietate mekanikoak neurtu ziren. Biokonpositeen modulu elastiko, trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazio balioak **7.4. taulan** aurkezten dira. Alga-hondakinaren kantitatea handitzean, trakzio-erresistentziak ( $p < 0,05$ ) eta haustura-elongazioak ( $p < 0,05$ ) behera egin zuten. Honen arrazoi nagusia, SPI eta AW-aren arteko interakzioek proteina kateen mugimendua murriztu zutela da. FTIR analisiak osagaien arteko interakzioak berretsi zituen. Hala ere, alga-hondakinaren gehikuntzak modulu elastikoan efektu positiboa sortu zuen. Beste autore batzuek emaitza antzekoak lortu zituzten betegarri naturalekin indartutako biopolimeroetan (Fiore et al., 2014).

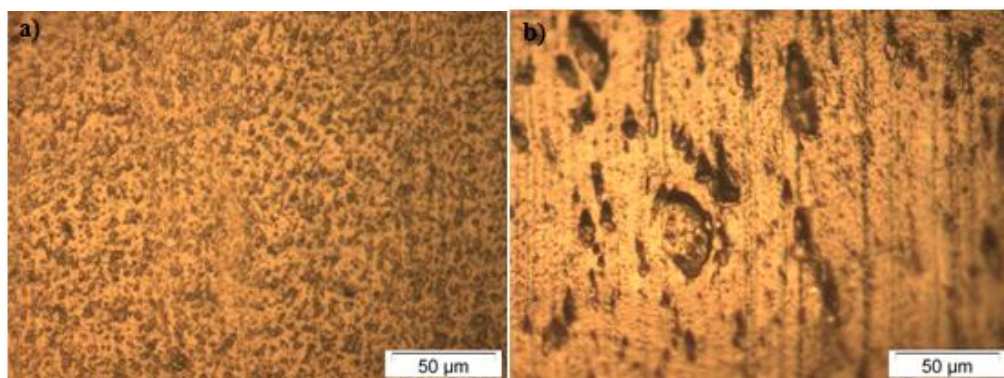
### 7.4. taula. Biokonpositeen modulu elastikoa (EM), trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB) alga-hondakinaren funtziopean.

| Filma | EM<br>(MPa)             | TS<br>(MPa)             | EB<br>(%)               |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| AW0   | 73,6 ± 2,3 <sup>a</sup> | 5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>  | 71,9 ± 4,6 <sup>a</sup> |
| AW3   | 74,2 ± 2,0 <sup>a</sup> | 4,7 ± 0,6 <sup>ab</sup> | 72,6 ± 6,9 <sup>a</sup> |
| AW6   | 86,4 ± 3,6 <sup>b</sup> | 4,7 ± 0,7 <sup>ab</sup> | 41,3 ± 7,1 <sup>b</sup> |
| AW9   | 95,2 ± 1,6 <sup>c</sup> | 4,0 ± 0,5 <sup>b</sup>  | 30,2 ± 5,2 <sup>b</sup> |

<sup>ac</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Tukeyren froga anizkoitzaren arabera.

Propietate mekanikoen emaitzak azaltzeko helburuarekin, soja-proteinan oinarritutako biokonpositeen morfologia aztertu zen, mikroskopia optikoa erabiliz.

**7.5. irudian** ikusten denez, biokonpositeek mikroegiturako sarean poroak aurkezten zituzten. Alga-hondakinaren gehikuntzak, mikroegituran aldaketak eragin zituen. Alde batetik, porositatea txikitu zen; beste aldetik, poro irregularragoak, zehaztuagoak eta handiagoak sortu ziren kontrol-laginarekin konparatuz. Morfologia honek, trakzio-erresistentziaren balioen joera azaltzen du. Biokonpositeek zenbat eta morfologia heterogeneoagoa izan, erresistentzia gutxiago azaltzen dute kanpoko indar baten aplikaziopean. Bestalde, proteina eta betegarriaren arteko bateragarritasun ona dela eta, ez ziren AW metaketak ikusi.



**7.5. irudia.** a) Kontrol-laginaren eta b) %9 AW duen biokonpositearen gainazalen mikroskopia optikoa.

## ONDORIOAK

Kapitulu honen emaitzak aztertuta, alga-hondakinaren gehikuntzak ez zituela proteinan oinarritutako biokonpositeen hesi-propietate bikainak aldatu eta propietate mekaniko eta optiko egokiak mantendu zituela ondorioztatu zen. Emaitza hauek ikusita, esan daiteke hondakin natural bat betegarri gisa erabiltzean materialaren kostua murriztu daitekeela. Gainera, alga-hondakina balioztatzean, hondakinen kantitatea ere murrizten da eta balio erantsiko produktuak garatzen dira. Aldi berean, soja-proteinazko pelletak estrusio-metodoaren bidez eta biokonpositeak injekzio-metodoaren bidez lortu dira; ondorioz, komertzializatzeko gaitasuna handitu egin da, laginak prozesatzeko erabilitako teknikak plastikozko industrian erabiltzen diren metodo nagusienak direlako.



# 8.

*kapitulua*

## **$\beta$ -KITINAREN GEHITZEA FILMAK ETA HIDROGELAK GARATZEKO**

*Garrido T., Etxabide A., de la Caba K., Guerrero P. (2017)*

*Versatile soy protein films and hydrogels by the incorporation of  $\beta$ -chitin from squid pens (*Loligo sp.*). *Green Chemistry*, 19, 5923-5931*





## LABURPENA

Arrain hondakinetatik (buruak, azalak, oskolak eta hezurak) produktu baliagarriak lortzea industria-hondakin kantitateak txikitzeko estrategia garrantzitsua izan daiteke. Zentzu horretan, txibiak prozesatzeko industrietatik sortutako txibien lumak ez dira erabilitako hondakinak izan. Hala ere, azken urteotan hainbat autorek txibien lumen potentziala goratu dute,  $\beta$ -kitina lortzeko iturri gisa erabil daitezkeelako; izan ere, txibien lumak %31-49  $\beta$ -kitinaz osatuta daude (oinarri lehorrean) txibi espeziearen arabera. Horrela, kitinaren ezaugarri erakargarri asko aurkitu dira, hala nola, biobateragarritasuna, ez-toxikotasuna eta aktibitate biologikoa. Ezaugarri hauek kitina hainbat aplikaziotan erabiltzeko interesgarriak izan daitezke, adibidez, aplikazio biomedikoetan, kosmetikoetan, nekazaritzan, elikadura teknologian, paper-teknologian, ur-hondakinaren tratamenduan eta ehun-industrian.

Kitina txibiaren barne-oskoletik erauzi daiteke eta azken hau gehienbat proteoglikanoz eta  $\beta$ -kitinaz osatuta dago. Aldi berean, kitina N-azetil- $\beta$ -D-glukosamina unitate lineal errepikakorraz osatuta dago, zelulosaren egituraren antza handia duena (C-2 talde hidroxiloa azetamida taldeak ordezkatzeko du).

Iturriaren arabera, kitina hiru alomorfo desberdinetan aurki daiteke:  $\alpha$ -kitina, hiruetatik forma kristalino egonkorrena dauka eta bere kateak egitura mikrokrystalinoan kokatuta daude kate antiparaleloetan;  $\beta$ -kitina, bere kateak egitura mikrokrystalinoan kokatuta daude kate paraleloetan; eta  $\gamma$ -kitina, aurreko bien konbinaketa. Hiru egitura hauetan, kateak xafletan antolatuta daude eta hidrogeno-loturekin lotuta daude. Orain arte, kitinaren produkzioan krustazeo oskoletatik (izkira eta karramarro oskolak

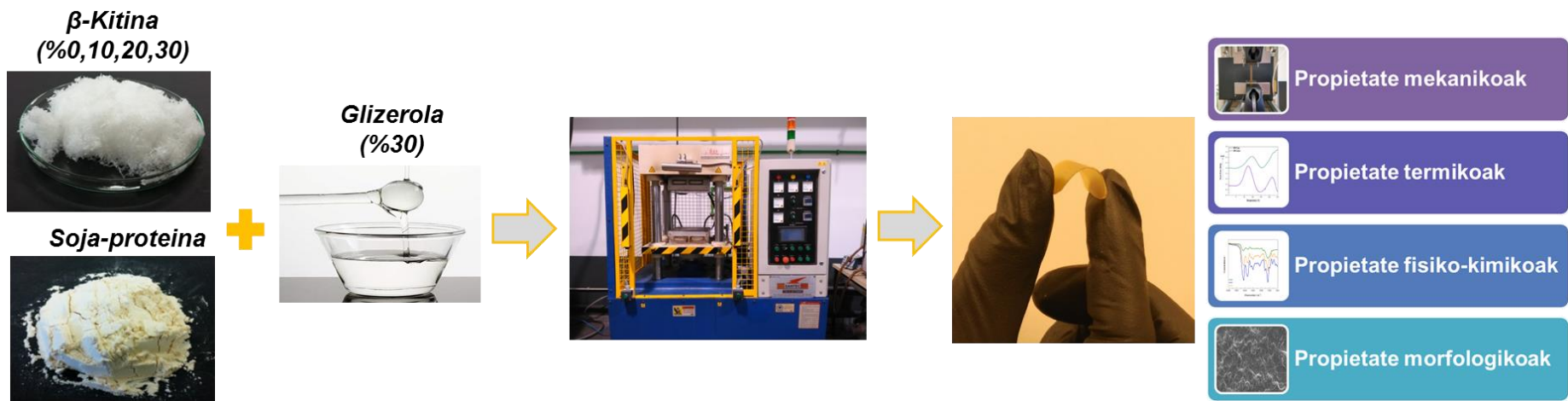
nagusiki) sortutako hondakinak izan dira iturri komertzial nagusiak; horrela  $\alpha$ -egitura izan da polimorfo ikertuena,  $\beta$ -egitura alde batera utziz.

Hala ere,  $\beta$ -kitinaren egiturak trinkotasun txikiagoa duenez, kristalinitate baxuagoa aurkezten du, eta ondorioz proteinarekin elkarrekintzak errazagoak dira,  $\alpha$ -kitinarekin konparatuz. Ezaugarri hau erabilgarria izan daiteke beste biopolimeroen indartzaile gisa erabili nahi bada. Gainera, txibien lumetatik lortutako kitinak egitura irekiagoa du; horrela,  $\alpha$ -egiturak baino ura xurgatzeko ahalmen handiagoa dauka hidrogeno-lotura gutxiago dituelako bere kateen kokapen paraleloengatik.

Krustazoen oskoletatik kitina isolatzeko erabiltzen den ohiko metodo kimikoa 3 pausotan oinarritzen da. Lehenengo, desmineralizazio-pausoa ematen da. Hemen konposatu inorganikoak kentzen dira ingurune azidoa erabiliz. Kasu gehienetan, pauso honetan kitinaren pisu molekularra txikitzen da. Bigarrena, desproteinizazio-pausoa da, ingurune basikoa erabiliz proteinaren erauzketa lortzen dena. Azkenik, koloregabetze pausoa dago, pigmentuen bereizketa emateko. Txibien lumak erabiliz gero  $\beta$ -kitina isolatzeko, desmineralizazio- eta koloregabetze-pausoak ekiditen dira bere konposatu organiko eskasak eta pigmentu ezak direla eta. Horrela, prozesatze-denbora, azido kutsakorren erabilera, erabiltzen den ur kantitate handia eta produkzio kostua esanguratsuki txikitzen dira.

Kitina isolatzeko erabiltzen den prozesuari dagokionez, NaOH erabiltzen da gehien bat, kontzentrazio handitan eta temperatura altutan, kapitulu honetan erabiltzen diren baldintzekin konparatuz gero. Isolatzeko pausuen murrizketak eta baldintza apalagoak erabiltzeak kitinaren erauzketan eman ditzaketen onura nabarmen batzuk hauexek dira: (i) baldintza leunagoak eta prozesu sinpleagoa erabiltzea eta (ii) ingurumen inpaktua eta kostua txikitzea.

Hori guztia kontuan hartuta, kapitulu honetan,  $\beta$ -kitina erabili zen soja-proteinan oinarritutako filmak sendotzeko. Modu horretan, funtzio anitzeko materialak lortu ziren, propietate fisiko-kimikoak eta mekanikoak hobetuz. Kasu honetan, filmak konpresio-metodoa erabiliz prestatu ziren.  $\beta$ -Kitina txibien lumetatik (*Loligo* sp.) erauzi zen, hidrolisi alkalino bat erabiliz, desmineralizazio- eta koloregabetze-pausoak ekidinez, eta horrela filmen prozesatze-denbora eta produkzio kostua murriztuz. Kitinaren hasierako egitura kristalinoak aldaketa kimikoak gauzatzeko erreaktibotasunean eragina du, baita materialaren propietate funtzionaletan ere. Horrela, soja-proteinan oinarritutako filmen karakterizazioa egin zen  $\beta$ -kitina kantitatearen funtziopean.



**I irudia.** 8. kapituluaren laburpen grafikoa.

## 8.1 FILMEN PRESTAKETA

Hasteko, 5 g soja-proteina (SPI) %10, 20 eta 30 kitinarekin (CH) (soja-proteina lehorrarekiko) nahastu ziren eta 125 mL ur distilatua gehitu zen. Ondoren, pH-a 10-era egokitu zen nahastea berogailu magnetiko batean 30 minutuz 80 °C-an berotzen hasi baino lehen. Jarraian, %30 glizerol (Gly) (soja-proteina lehorrarekiko) gehitu eta dispertsioa beste 30 minutuz aurreko baldintza berdinetan mantendu zen. Amaitzeko, nahastea Petri ontzietan isuri eta liofilizatu zen hautsa lortzeko. Hautsa aluminiozko bi xafren artean ipini zen eta 12 MPa-eko presioa ezarri zitzaion 2 minutuz aurretik 150 °C-an berotuta zegoen prentsan. Filmak CH0, CH10, CH20 eta CH30 izendatu ziren kitinaren portzentajearen arabera.

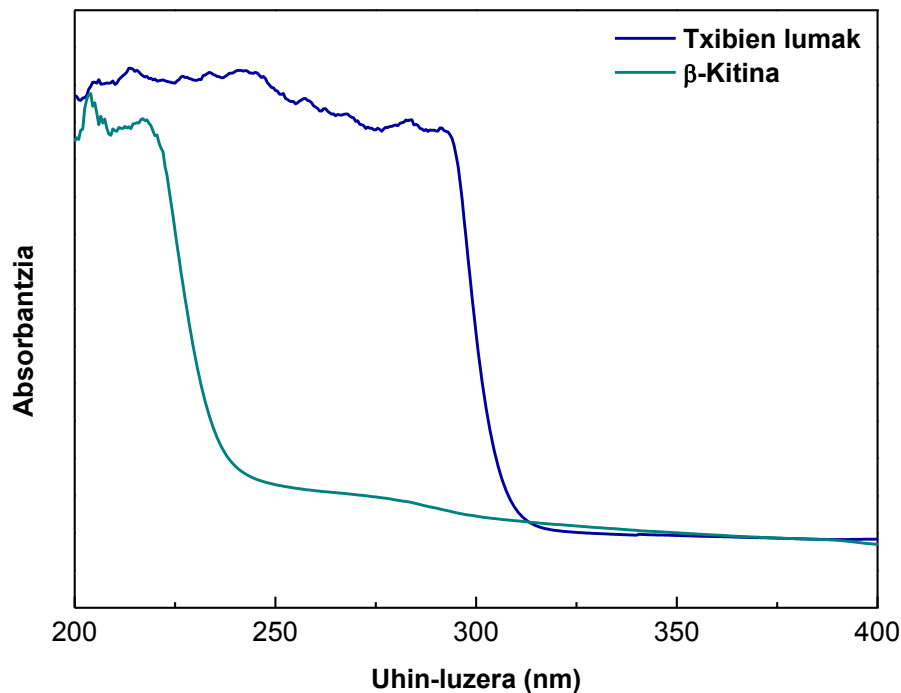
## 8.2 EMAITZAK

### 8.2.1 $\beta$ -Kitinaren karakterizazioa

Txibien lumen errauts edukia %0,66 inguruan zehaztu zen errauts edukiaren analisia erabiliz. Balio horrek lumen mineralizazio portzentaje baxua baieztatzen du, gehienbat, kaltzio karbonato ezagatik. Beraz, desmineralizazio pausoa saihestu daiteke (Chandumpai et al., 2004). Gainera, lumek pigmentazio maila baxua daukate txibietan duten bere barne-kokapenagatik eta horregatik koloregabetze pausoa ere ekidin daiteke. Hau guztia dela eta, soilik desproteinizazio-pausua erabili zen kitina lumetatik erauzteko. Erabilitako tratamendu alkalinoak  $\beta$ -kitinaren %41,23a (hasierako masa totalarekiko) berreskuratu zuen. Lortutako etekina beste espezie batzuk erabiltzerakoan lortutako balioekin bat dator (Lavall et al., 2007). Azetilazio graduari dagokionez (DA), analisi elementala erabiliz kalkulatu zen.  $\beta$ -Kitinan dagoen C eta N kantitateak %42,6 eta %6,3 ziren, hurrenez hurren; horrela,  $\beta$ -kitinaren azetilazio gradua %95,6an zehaztu zen. Balio hau beste lan batzuetan lortutakoak baino altuagoa da (Nata et al., 2012). Bestalde, N kantitatea kitinan gelditutako proteina kantitatearen adierazle izan daiteke. Balioa baxua zenez proteinaren kantitate minimo bat gelditu zela esan daiteke (Majtán et al., 2007).

Tratamendu alkalinoaren bidez gauzatutako desproteinizazioa, espektroskopia ultramorearekin aztertu zen eta emaitzak **8.1. irudian** aurkezten dira. Jakina den bezala, 200 nm-tik 280 nm-ra agertzen diren absorbantzia balio altuak proteinan dauden hainbat kromoforekin erlazionatuta daude. Kromoforo hauek tirozina, fenilalanina eta triptofanoa dira eta 300 nm-tik behera argia xurgatzeko gai dira (Balestrieri et al., 1978). Ikusten denez, tratamendu alkalinoa erabili eta gero, txibien lumen ultramore argia

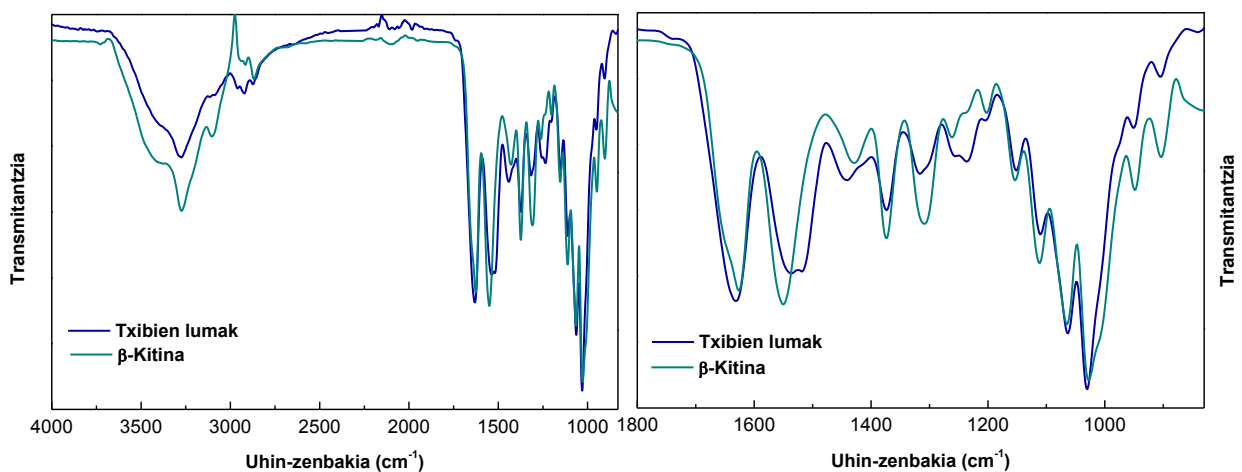
xurgatzeko gaitasuna nabarmenki txikitu zen, proteina ia guztiz erauzi zela konfirmatuz (Ianiro et al., 2014).



### 8.1. irudia. Erauzitako β-kitinaren eta txibien lumen UV espektroak.

Lumen egitura hierarkikoan, β-kitina proteina-geruza batean bilduta gelditzen da eta nanozuntzak osatzen ditu (Kurita, 2001). Beraz, desproteinizazioa gertatzen denean β-kitinaren egituran aldaketak gauzatzen dira. Txibien lumetatik erauzitako proteinaren bigarren egitura ebaluatzeko Fourier-en transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria (FTIR) erabili zen. **8.2. irudian** tratatu gabeko lumen eta β-kitinaren espektroak erakusten dira. 3271  $\text{cm}^{-1}$ -an banda zabal bat agertzen da N-H loturaren luzapenari dagokiona (Focher et al., 1992). Tratamendu alkalinoaren ondorioz, banda hau handiagoa bihurtzen da eta banda zorrotzagoak agertzen dira. 2917 eta 2867  $\text{cm}^{-1}$  bandak C-H lotura alifatikoaren luzapenarekin erlazionatuta daude. I amidari dagokionez (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), banda bakarra ikusi zen β-kitinaren berezko forma

polimorfikoari dagokiona.  $\alpha$ -Kitinarekin alderatuz,  $\beta$ -kitinaren egitura kristalinoan hidrogeno zubizko loturak barne-xaflakoak dira; horrela, banda bakarra agertzen da karbonilo taldeen eta amino taldeen arteko hidrogeno zubizko loturekin erlazionatuta dagoena (Jang et al., 2004). Banda hau estuagoa da kitinaren espektroan txibien lumen espektroan baino. Gainera, lumen espektroan  $1535\text{ cm}^{-1}$  inguruan agertzen diren 2 bandak, kitinaren espektroan banda bakar batean biltzen dira  $1549\text{ cm}^{-1}$ -an (II amida), I amida eta II amidarekin erlazionatutako banda hauek, kitinaren azetilazio gradu altua konfirmatzen dute. Hau analisi elementalarekin egiaztatu zen,  $\beta$ -kitinaren azetilazio gradua %95,6-an zehaztuz.  $1180$  eta  $953\text{ cm}^{-1}$  artean dagoen kitinaren bandaren kasuan, ez zen intentsitate aldaketarik ikusi banda honen eta I amida bandaren artean. Tratamendu alkalinoa burutu eta gero, espektro infragorrian gauzatutako intentsitate handitzearen arrazoia, ur dipolo sendoen eta loturetako dipoloen arteko elkarrekintza izan daiteke (Snyder et al., 1982).

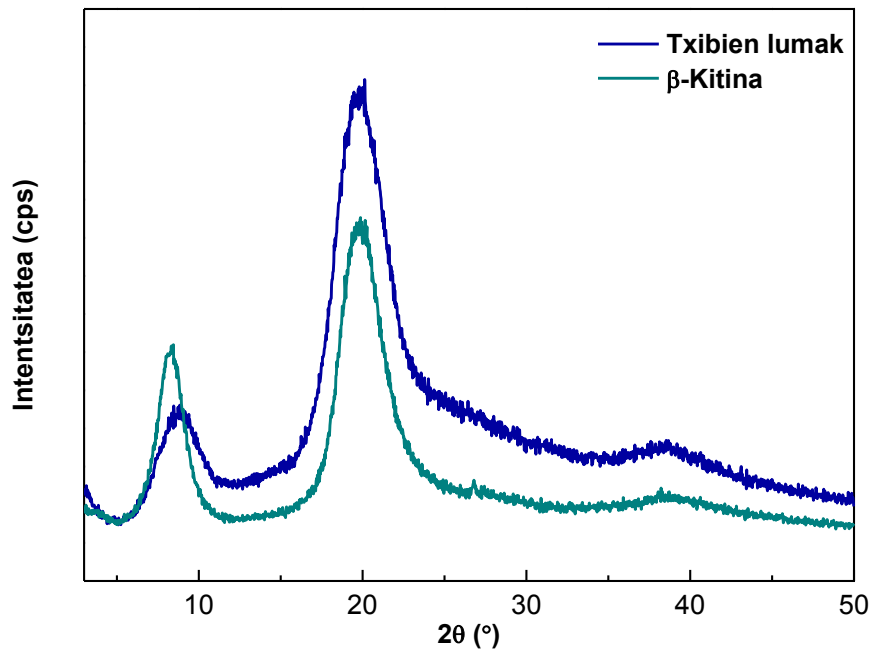


## 8.2. irudia. Erauzitako $\beta$ -kitinaren eta txibien lumen FTIR espektroak.

Proteinaren hirugarren egitura X-izpien difrakzio (XRD) teknikarekin aztertu daiteke; horrela, lumen eta erauzitako  $\beta$ -kitinaren egitura kristalinoa ikertu zen.



Difraktogramak **8.3. irudian** aurkezten dira. Jakina denez,  $\beta$ -kitinak kristalinitate altua du, molekula barneko hidrogeno lotura ugariak direla eta. Hala ere, tratamendu alkalinoa erabili eta gero,  $\beta$ -kitinaren kristalinitatea aldatu zen,  $\beta$ -kitina xaflen artean ur-molekulak tartekatu zirelako.

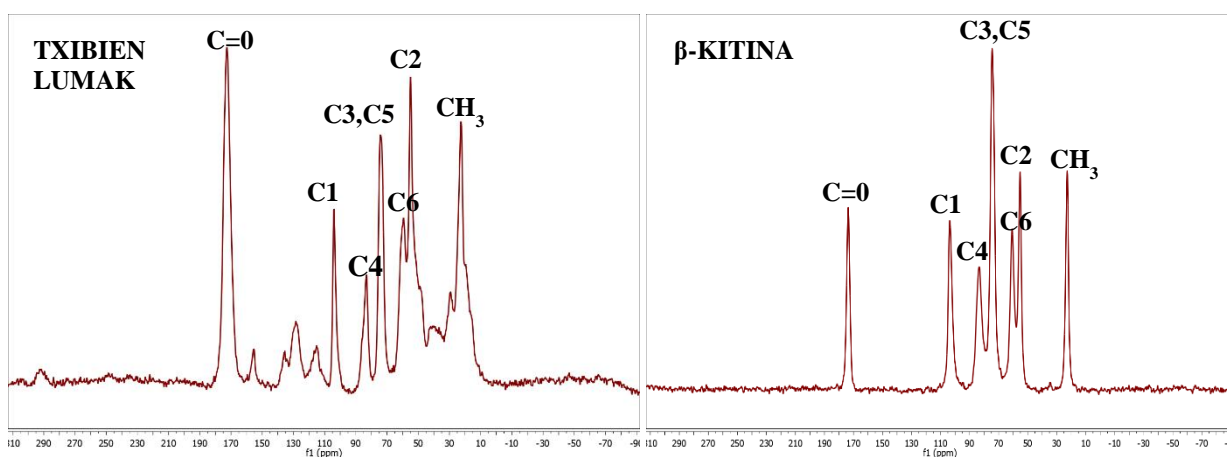


**8.3. irudia.** Erauzitako  $\beta$ -kitinaren eta txibien lumen XRD patroia.

**8.3. irudian** bi difrakzio banda erakusten dira,  $2\theta = 8,1^\circ$ -ko banda eta  $2\theta = 19,4^\circ$ -ko banda. Bi banda hauen posizioak  $\beta$ -kitinaren egitura paraleloa egiaztatu zuen (Jung et al., 2014). Ikus daitekeen bezala, lumekin erlazionaturako  $19,4^\circ$ -ko bandaren zabalera  $\beta$ -kitinarena baino handiagoa da,  $\beta$ -kitinaren kristalinitate altuagoa berretsiz. Horren arrazoia, desproteinizazioaren ondoren gertatutako proteinaren erauzketa izan daiteke. Laginen kristalinitate indizea (CrI) difraktograma erabilita kalkulatu zen. Aipatu den bezala,  $\beta$ -kitinaren kristalinitate indizeak txibien lumena baino altuagoa izan

behar du. CrI ekuazioari dagokionez, lumen kristalinitatea %80,9-koa izan zen eta  $\beta$ -kitinarena, aldiz, %87,5ekoa.

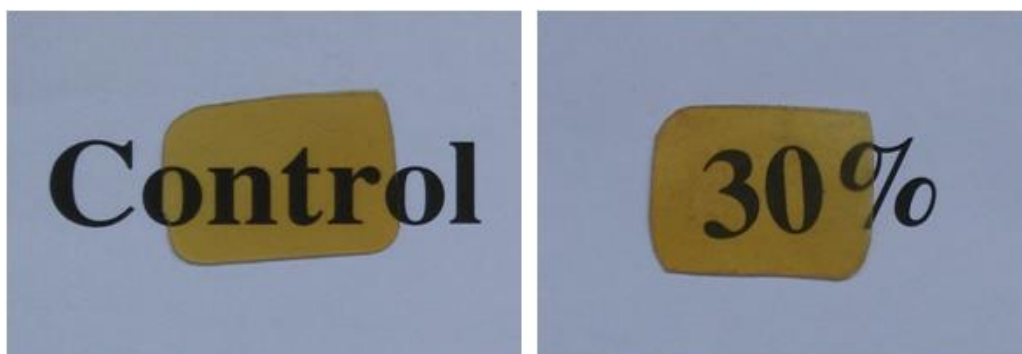
Txibien lumen eta erauzitako  $\beta$ -kitinaren  $^{13}\text{C}$  NMR espektroa **8.4. irudian** aurkezten da. Espektro honetan 7 seinale ikusten dira, N-azetil- $\beta$ -D-glukosamina kate errepikakorren 8 karbono atomoekin erlazionatuta daudenak. Seinaleak hurrengoak dira: C=O 173,6 ppm-an, C1 103,6 ppm-an, C4 83,6 ppm-an, C3 eta C5 74,5 ppm-an, C6 60,7 ppm-an, C2 55,2 eta CH<sub>3</sub> 22,7 ppm-an. C3 eta C5 karbono atomoekin erlazionatutako pikoak, piko bakar batean agertzen dira. Piko bakarra izatea  $\beta$ -kitinaren bereizgarria da eta  $\alpha$  eta  $\beta$  polimorfoen arteko desberdintasuna erakusten du, izan ere, hidrogeno loturetan desberdintzen dira (Cortizo et al., 2008). **8.4. irudian** ikusten den bezala,  $\beta$ -kitinaren espektroan metilo taldearekin eta karbonilo taldearekin erlazionatutako pikoak txikitzen dira. Hori desazetilazio gradua handitzen delako izan daiteke. Gainera, 170 ppm-tik 105 ppm-ra eta 50 ppm-tik 25 ppm-ra agertzen ziren hainbat pikoen desagertzeak proteina-maila determinatzen du (Schaefer et al., 1987), proteinaren bereizketa lortu zela ondorioztatuz.



**8.4. irudia.** Erauzitako  $\beta$ -kitinaren eta txibien lumen  $^{13}\text{C}$  NMR espektroak.

### 8.2.2 Filmen karakterizazioa

Filma eratzeko soluzioan gehituriko CH kantitateak SPI/CH filmen propietate fisiko-kimikoetan eragina dauka. Hori dela eta, filmen karakterizazioa CH kantitatearen funtziopean egin zen. Aipagarria da, CH gehikuntzaren ondoren filmek gardentasuna mantendu zutela, %30 kitina gehitu arren (**8.5. irudia**).



**8.5. irudia.** Kontrol-filma (CH0) eta %30 kitinarekin (CH) prestatutako filmen argazkiak.

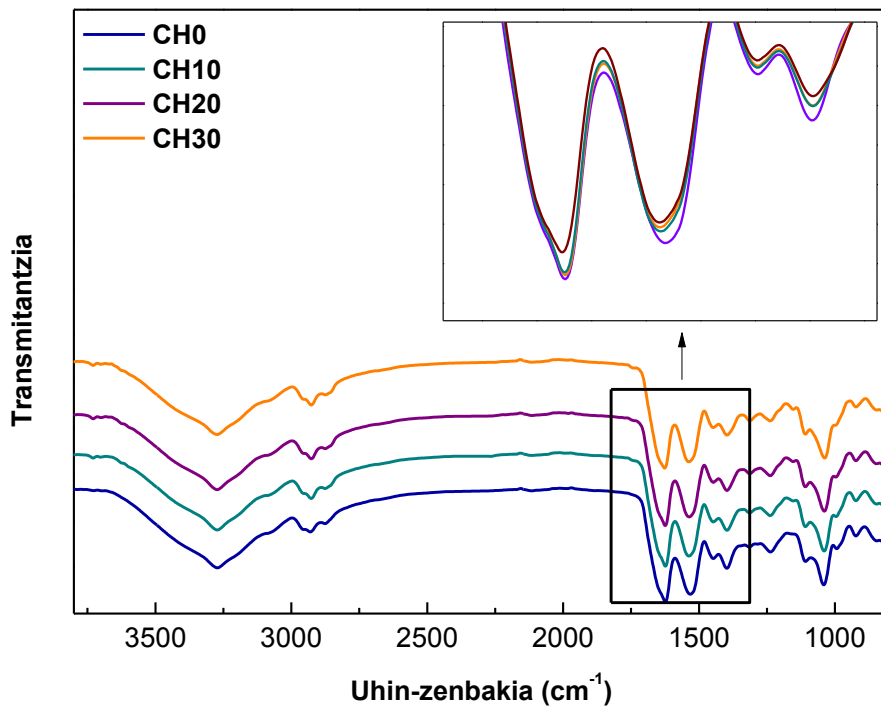
Filmek hezetasun edukia dagokionez, CH-ren gehikuntzak MC balioetan eragin zuen, **8.1. taulan** ikusten den bezala, eta SPI/CH filmetan balioak nabarmenki ( $p < 0,05$ ) handitu ziren, CH edukia edozein dela ere. Hezetasun edukiaren handitze hau, filmak prestatzeko prozesuan kitinak xurgatutako hezetasunagatik izan daiteke (Darmato et al., 2002).

**8.1. taula.** SPI/CH filmek hezetasun edukia (MC) eta disolbatutako masa totala (TSM).

| Filma | MC (%)             | TSM (%)            |
|-------|--------------------|--------------------|
| CH0   | $11,58 \pm 0,11^a$ | $24,45 \pm 0,14^a$ |
| CH10  | $13,51 \pm 0,21^b$ | $22,99 \pm 0,27^b$ |
| CH20  | $13,38 \pm 0,62^b$ | $22,47 \pm 0,68^b$ |
| CH30  | $13,24 \pm 0,49^b$ | $21,46 \pm 0,55^c$ |

<sup>ac</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

Filmen disolbagarritasunari dagokionez, TSM balioak %22-24 inguruan zehaztu ziren, glizerolaren migrazioarekin erlazionatu zirenak, batez ere. Hala ere, CH gehitzerakoan, TSM balioak nabarmenki ( $p < 0,05$ ) txikitu ziren, filma eratzeko soluzioaren konposatuaren arteko interakzioak gauzatu zirelako. Interakzio hauek ikertzeko asmoarekin FTIR analisia gauzatu zen eta espektroak **8.6. irudian** aurkezten dira.



**8.6. irudia.** SPI/CH filmen FTIR espektroak.

SPI-ak proteinetan nagusitzen diren hiru absortzio-bandak erakusten ditu: I amida banda 1630 cm<sup>-1</sup>-ean, C=O loturaren luzatzearekin erlazionatua; II amida banda 1530 cm<sup>-1</sup>-ean, N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatua; eta III amida banda 1230 cm<sup>-1</sup>-ean, C-N loturaren luzatzearekin eta N-H loturaren kurbadurarekin erlazionatua (Su et al., 2008). Bestalde, glizerolaren bost absortzio-banda nagusiek C-C loturen bibrazioekin 850, 940, 1000 cm<sup>-1</sup>-ean eta C-O loturen bibrazioekin 1050

eta  $1100\text{ cm}^{-1}$ -ean erlazionatuta daude (Ren et al., 2016). CH duten filmetan II amida bandaren ( $1530\text{ cm}^{-1}$ ) desplazamendua frekuentzia altuetara ikusi zen ( $1537\text{ cm}^{-1}$ ), CH-ren hidroxilo taldeen eta SPI-aren amino taldeen arteko hidrogeno loturak zirela eta. Interakzio hauek bat egiten dute SPI/CH filmen xurgatzeko-ahalmenaren txikitzearekin.

Jakina den bezala, konposatu berri baten gehikuntzarekin azaleraren konposizioa aldatu daiteke. Horrela, filmen azaleraren konposizioa XPS bidez aztertu zen CH gehikuntzaren efektua aztertzeko asmoz. C, O eta N edukiarekin erlazionatutako filmen konposizioaren informazioa **8.2. taulan** erakusten da. O/N eta N/C ratioak ere agertzen dira taula horretan. Ikusten denez, filmen azalera C elementua nagusi zen. Hala ere, %30 CH gehitu zenean, C kantitatea %73tik %71ra txikitu zen. Oxigeno kantitatea, berriz, %20tik %23ra handitu zen.

**8.2. taula.** X-izpien difrakzioarekin lortutako SPI/CH filmen konposizioaren informazioa.

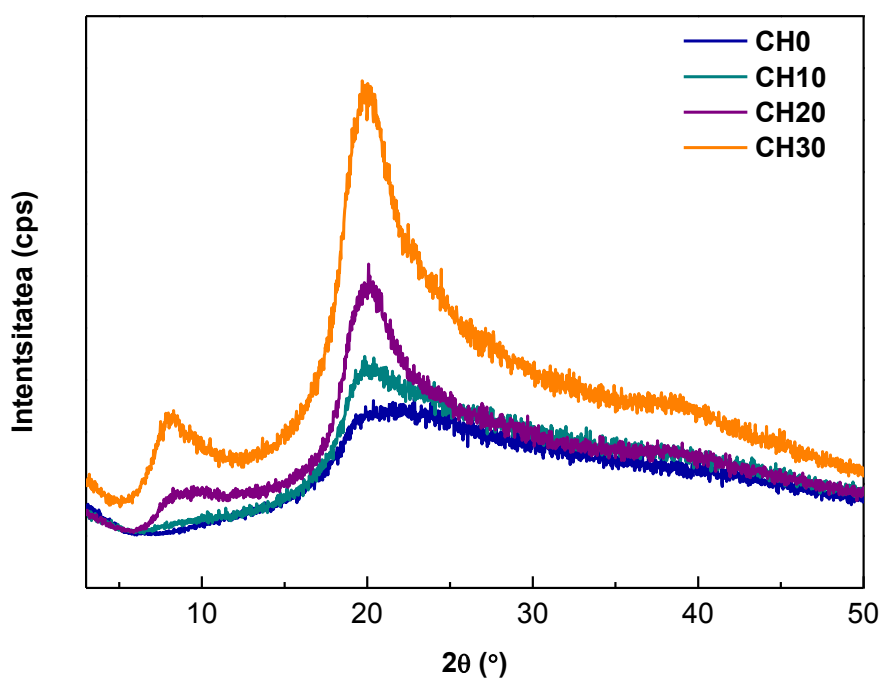
| <b>Filma</b> | <b>C (%)</b> | <b>O (%)</b> | <b>N (%)</b> | <b>O/C</b> | <b>N/C</b> |
|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| <b>CH0</b>   | 73           | 20           | 7            | 0,27       | 0,09       |
| <b>CH10</b>  | 72           | 22           | 6            | 0,30       | 0,08       |
| <b>CH20</b>  | 71           | 22           | 7            | 0,31       | 0,09       |
| <b>CH30</b>  | 71           | 23           | 6            | 0,32       | 0,08       |

C pikoaren dekonboluzioak hiru piko sorrarazten ditu eta beraien edukia **8.3. taulan** azaltzen da. C1 pikoa C-C eta C-H loturekin erlazionatuta dago; C2 pikoa nitrogenoarekin (C-N) eta oxigenoarekin (C-O) lotutako karbonoari dagokio; eta C3 pikoa C=O loturarekin erlazionatuta dago. Ikusi zenez, CH-ren gehikuntzaren ondorioz, C2 edukia konstante mantendu zen, C1 txikitu eta C3 handitu egin ziren bitartean, soluzioa osatzen zuten konposatuen arteko interakzioak iradokiz.

**8.3. taula.** X-izpien difrakzioarekin lortutako SPI/CH filmen C1, C2 eta C3 edukiak.

| Filma | C1 (%) | C2 (%) | C3 (%) |
|-------|--------|--------|--------|
| CH0   | 44     | 20     | 9      |
| CH10  | 39     | 20     | 13     |
| CH20  | 36     | 20     | 15     |
| CH30  | 36     | 20     | 15     |

Filmaren egitura kristalinoa X-izpien difrakzioarekin aztertu zen CH edukiaren funtziopean. Noishiko eta lankideek (2003) diotenez,  $\beta$ -kitina  $\alpha$ -kitinaren egitura kristalinoa bihurtu daiteke, tratamendu batzuen erabiltako baldintza gogorretatik, hala nola, %50 NaOH edo 8 N HCl soluzioak erabiltzen direnean. Lan honetan, baldintza arinak (1 M NaOH) erabili ziren kitina eta proteina bereizteko. Horrela,  $\beta$ -kitinatik  $\alpha$ -kitinara transformazioa ez zen eman. **8.7. irudian** bi plano kristalino (020 eta 110) aurkezten dira 8,6 eta 20,0 °-tan.

**8.7. irudia.** SPI/CH filmen XRD patroia.

Bi piko hauek  $\beta$ -kitinaren gehikuntzarekin handitu ziren, kristalinitate maila handiagoa iradokiz. Horrela, SPI-an oinarritutako film amorfoak film kristalinoago bihurtu ziren (%72,3ko kristalinitatea). CH-ren kontzentrazioa handitzerakoan piko zorrotzagoak lortzeak, film zurrunagoak eta egonkorragoak lortu zirela adierazi zuen. Hori dela eta, filmen egitura eta propietate mekanikoak erlazionatzeko asmoz azterketa mekanikoa egin zen.

SPI/CH filmen propietate mekanikoak **8.4. taulan** aurkezten dira. CH kantitatea %0tik %30era igo zenean, trakzio-erresistentzia (TS) 7,47 MPa-etatik 11,25 MPa-etara nabarmenki handitu zen ( $p < 0,05$ ). Haustura-elongazioa (EB), berriz, %131,37tik %6,08ra nabarmenki txikitu zen ( $p < 0,05$ ). Gainera, CH gehitzerakoan, modulu elastikoa esanguratsuki handitu zen ( $p < 0,05$ ) material zurrunago bat lortuz, gehienbat,  $\beta$ -kitinaren presentziak kateen mugimenduaren murrizketa eragiten zuelako. Horrek XRD emaitzak berretsi zituen; izan ere, CH kantitatea handitzerakoan kristalinitatea handitu zen, trakzio-erresistentziaren eta modulu elastikoaren balioak hobetuz (Shraee et al., 2017).

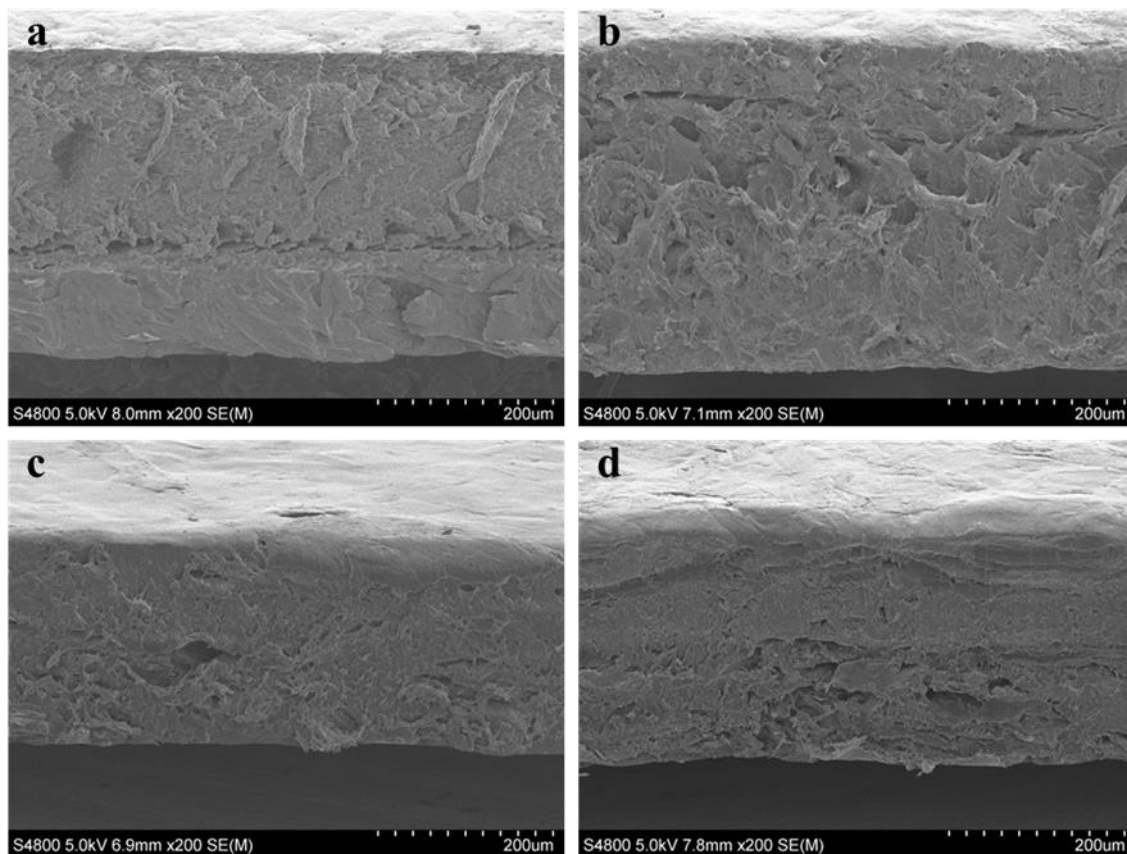
**8.4. taula.** SPI/CH filmen haustura-elongazioa (EB), trakzio-erresistentzia (TS) eta modulu elastikoa (EM).

| Filma | EB (%)                         | TS (MPa)                       | EM (MPa)                        |
|-------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| CH0   | 102,62 $\pm$ 4,29 <sup>a</sup> | 7,05 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>   | 105,18 $\pm$ 6,09 <sup>a</sup>  |
| CH10  | 13,86 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>  | 8,11 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup>  | 299,25 $\pm$ 10,60 <sup>b</sup> |
| CH20  | 7,57 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>   | 10,22 $\pm$ 1,69 <sup>ab</sup> | 538,84 $\pm$ 13,13 <sup>c</sup> |
| CH30  | 6,12 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>   | 11,52 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>  | 716,67 $\pm$ 7,76 <sup>d</sup>  |

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

SPI/CH filmen zeharkako-sekzioek egitura konpaktu bat erakutsi zuten, propietate mekanikoen balioekin bat eginez. %0, 10, 20 eta 30 CH zuten SPI-an oinarritutako filmen SEM irudiak **8.8. irudian** aurkezten dira (200x-ko handipena).

Konpaktazioa filmen konposatuaren arteko interakzioengatik gerta daiteke. Jakina denez, filmak uretan daudenean glizerolaren migrazioa gerta daiteke. Hala ere, **8.1. taulan** ikusten denez, CH0 filmen TSM balioak erabilitako glizerola kantitatea baino txikiagoak zirenez (%30), SPI eta glizerolaren arteko interakzioak zeudela berretsi daiteke. CH gehitzerakoan, interakzio hauek areagotu ziren eta egitura konpaktuago bat lortu zen. Hori dela eta, ur-molekulak egitura barruan sartzea ekidin zen eta filmen disolbagarritasuna %24,4tik %21,4ra txikitu zen, **8.1. taulan** ikusten den moduan.

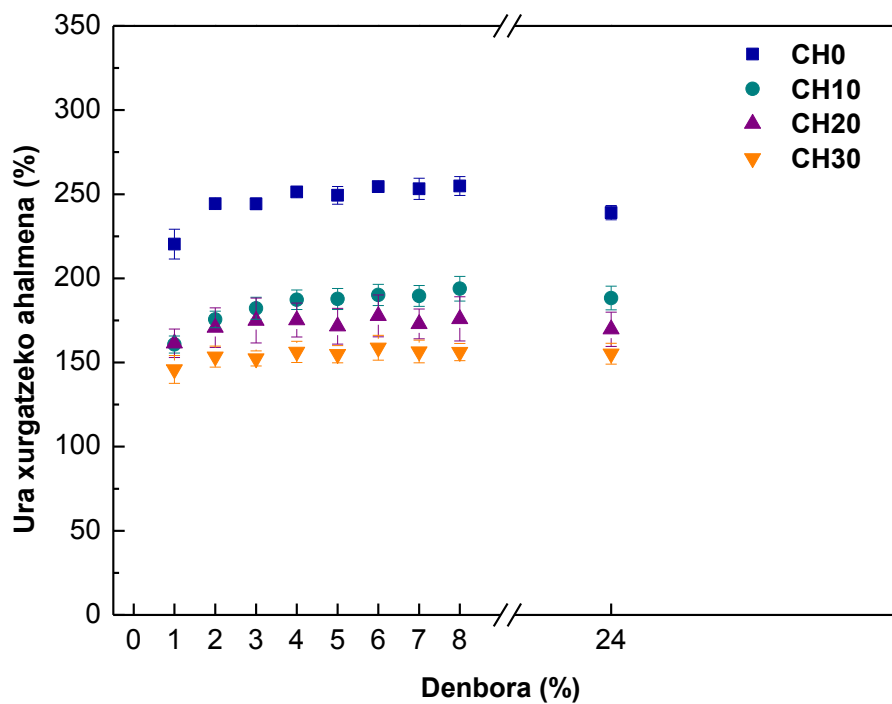


**8.8. irudia.** a) %0 kitina, b) %10 kitina, c) %20 kitina eta d) %30 kitina duten SPI/CH filmen zeharkako sekzioen SEM irudiak.



### 8.2.3 Hidrogelen karakterizazioa

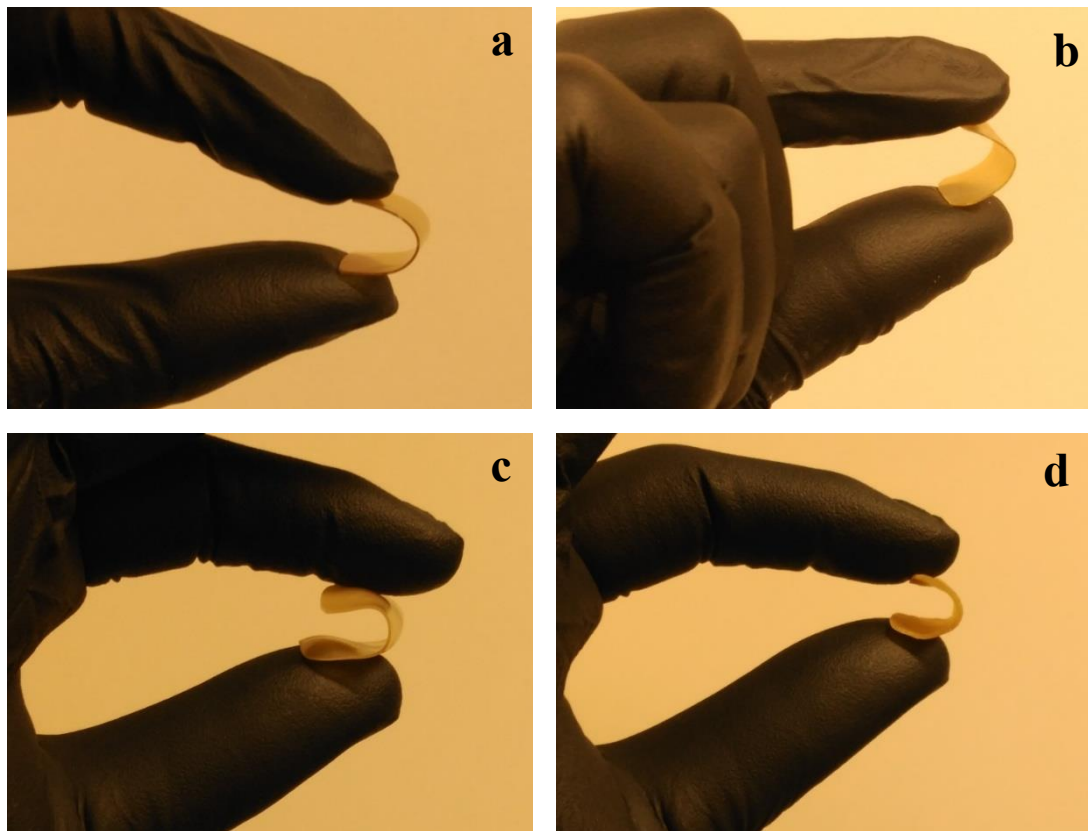
Amaitzeko, ura xurgatzeko ahalmena eta propietate mekanikoak aztertu ziren filmak urperatu ostean. Ura xurgatzeko ahalmena **8.9. irudian** aurkezten da denboraren funtziopean.



### 8.9. irudia. SPI/CH filmen ura xurgatzeko ahalmena.

Laginak urperatu zirenean masa-galera bat gertatu zen glizerolaren migrazioaren ondorioz. Migrazioa hasieran gertatu zenez eta balioak %30 baino txikiagoak zirenez, esan daiteke masa-galera horrek ura xurgatzeko gaitasunaren portaeran ez zuela eragin nabarmenik **8.1. taulako** TSM balioek erakutsi zuten bezala. Hau WU kurbetan ikusi daiteke, non ura xurgatzeko ahalmenaren txikitzea ikusten den, CH-ren hidrofobotasunaren ondorioz (Kumar et al., 2000). Gainera, CH zuten filmek lehenengo 4 ordutan egonkortasuna lortu zuten eta bere osotasuna mantendu zuten 24 orduz urpean egon ostean. Kontrol-filma, aldiz, denbora horretan disolbatzen hasi zen.

%0 eta %30 CH duten filmeen argazkiak, 4 orduko urperaketa aurretik eta ondoren ateratakoak, **8.10. irudian** aurkezten dira. Ikusten den bezala, filmek bere osotasuna mantendu zuten eta maneiatzeko errazak ziren. Hau izan zitekeen,  $\beta$ -kitinak bere egitura kristalinoan barne-xaflako hidrogeno loturak ez zituelako, egonkortasun handia hornituz (Younes eta Rinaudo, 2015). Beste SPI sistemekin konparatuz (Barkay-Olami eta Zilberman, 2016), SPI/CH filmek ura xurgatzeko ahalmen txikiagoa erakutsi zuten konposatuaren arteko interakzioak zirela eta.



**8.10. irudia.** a) %0 kitina (CH0) eta b) %30 kitina (CH30) SPI/CH filmen, eta c) %0 kitina (CH0) eta d) %30 kitina (CH30) SPI/CH hidrogelen argazkiak.

Hidrogelen propietate mekanikoak, filmak 4 orduz urperatu ondoren neurtu ziren (**8.5. taula**); izan ere, filmek denbora horretan ura xurgatzen egonkortasuna lortu zuten. Espero bezala, hidrogelen EB, TS eta EM balioak filmen balioak baino txikiagoak ziren

(8.4. taula). Balio hauek SPI-an oinarritutako beste hidrogel batzuen balioen antzekoak ziren (Cuadri et al., 2016). Ikusi zen moduan, hidrogelen TS eta EM balioak CH kantitatearekin handitu ziren; berriz, EB balioak txikitu ziren. Portaera hori filmen ura xurgatzeko gaitasunaren ondorio bat izan zen; izan ere, CH zuten filmekin konparatuz, CH0 filmek ur gehiago xurgatzeko gaitasuna zuten eta ondorioz, bere plastifikatzaile efektua handiagoa zen, baita bere haustura elongazioa ere.

**8.5. taula.** SPI/CH hidrogelen haustura-elongazioa (EB), trakzio-erresistentzia (TS) eta modulu elastikoa (EM).

| Filma       | EB (%)                    | TS (MPa)                 | EM (MPa)                  |
|-------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>CH0</b>  | 56,75 ± 1,53 <sup>a</sup> | 0,50 ± 0,03 <sup>a</sup> | 1,01 ± 0,11 <sup>a</sup>  |
| <b>CH10</b> | 19,75 ± 1,19 <sup>b</sup> | 0,61 ± 0,03 <sup>b</sup> | 3,40 ± 0,51 <sup>b</sup>  |
| <b>CH20</b> | 15,93 ± 2,78 <sup>b</sup> | 0,61 ± 0,02 <sup>b</sup> | 5,61 ± 0,31 <sup>c</sup>  |
| <b>CH30</b> | 12,82 ± 1,63 <sup>c</sup> | 1,27 ± 0,01 <sup>c</sup> | 15,75 ± 0,86 <sup>d</sup> |

<sup>ad</sup>Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ( $p > 0,05$ ) desberdinak Duncanen froga anizkoitzaren arabera.

## ONDORIOAK

$\beta$ -Kitina txibien lumetatik arrakastaz erauzi zen tratamendu alkalino bat (1 M NaOH) giro tenperaturan burutuz. Metodo horren erabilera nahikoa izan zen lumen desproteinizazioa aurrera eramateko, berezko kitinaren degradazioa eta desazetilazioa eman gabe. UV absorbantziaren gaitasunaren txikitzeak txibien lumetatik proteina bereiztu egin zela egiaztatu zuen eta  $\beta$ -kitinaren %41,23a berreskuratu zen. Gainera, desmineralizazio- eta koloregabetze-pausoak ekidin zirenez, bai kitinaren produkzioaren kostua bai ingurumen inpaktua txikitu ziren. SPI/CH filmei dagokienez, kitinak SPI-an oinarrituriko filmen kristalinitatean eragin zuzena zeukala ondorioztatu zen. Horrela, trakzio erresistentziaren eta modulu elastikoaren balioak hobetu ziren. Bestalde, ura xurgatzeko gaitasunaren txikitzea ikusi zen, baita filmaren disolbagarritasunaren gutxitzea ere, filmen egonkortasuna hobetuz.

# 9.

*kapitulua*

## **ANTIOXIDATZAILEEN ERAUZKETA MIKROUHINEN TEKNOLOGIA ERABILIZ**

*Garrido T., Gizdavic-Nikolaidis M., Leceta I., Urdanpilleta M., Guerrero P.,  
de la Caba K., Kilmartin P. (2019)*

*Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc  
using microwave-assisted extraction. Waste Management, 88, 110-117*



## LABURPENA

Ardo-industrian baztertu egiten diren hondakin ugari sortzen dira. Horien kantitate txiki bat bakarrik grapa bezalako edari alkoholikoak egiteko, azido tartarikoaren produkzioan edo ongarri organikoak prestatzeko erabiltzen da. Bestalde, mahats-patsaren %3a animaliak elikatzeko erabiltzen da. Hala ere, hondakin natural hau mahats-txortanak, ardo hondarrak eta mahats-patsa izateagatik bereizgarria da. Hauek polifenolen eduki altua dute eta ondorioz, antioxidatzaile eta erradikalak ezabatzeko aktibitatea daukate, osasunean onurak sustatuz.

Ardoa egitearen prozesuan, fitokimikoen zati bat bakarrik transferitzen da mahatsetik ardora, horrela, konposatu baliagarrien kantitate handi bat geratzen da hondakinean. Ardo beltzaren kasuan, zukua azala eta haziekin batera beratzen da, koloreaz gain taninoak ere erazteko. Hauek, amaierako ardoaren egituraren eta gorputzean laguntzen dute. Ardo zuriaren prestaketan berriz, zukua mahats-solidoetatik baztertzen da ahalik eta lasterren, tenperatura kontrolatutako hartzidura hasi baino lehen. Horrela, bioaktibo ugari mahats-patsa bertan geratzen dira.

Konposatu fenolikoak mahats motaren, faktore klimatikoaren, ardoa egiteko teknikaren eta lur motaren arabera aldatzen dira, eta bi talde nagusitan klasifikatu daitezke bere karbono eskeletoan oinarrituta: flabonoideak eta ez-flabonoideak. Lehenengo taldea, antozianinak (malbidina, delfinidina, petunidina, peonidina eta zianidina), flabonolak (kerzetina, mirezetina eta kaempferola), faban-3-olak (katekina, epikatekina, epikatekin 3-gallatea eta gallokatekina-biak monomero eta tanino egitura handiak bezala), flaboneak (luteolina eta apigenina), eta flabanoneak (naringerin) osatzen dute; bigarren taldea, berriz, azido hidroxizinamikoak (azido kafeikoa, p-kumarikoa eta ferulikoa), azido

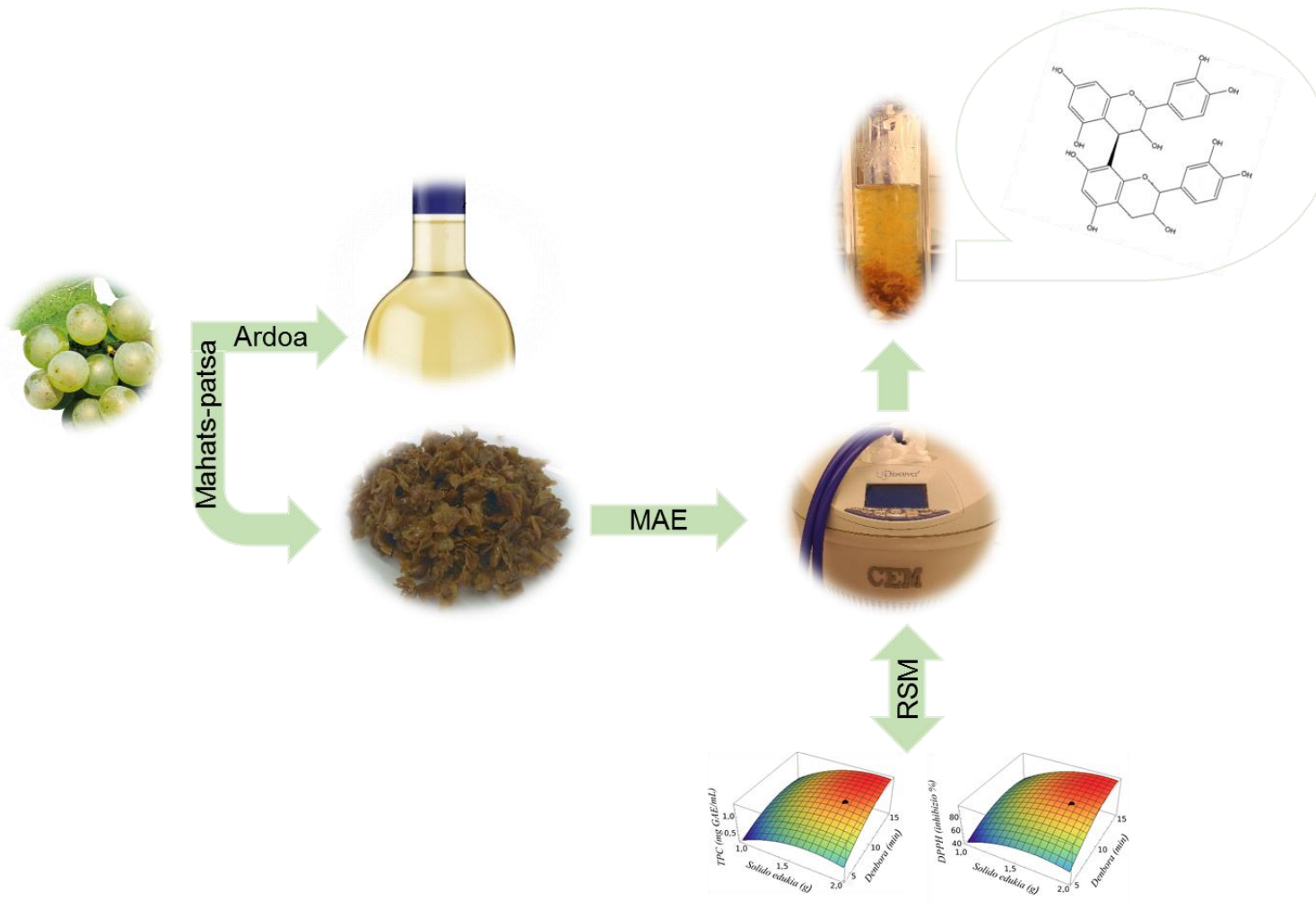
bentzoikoak (azido galikoa, banillikoa eta siringikoa) eta estilbenoak (resberatrola) osatzen dute.

Azken urteotan, bioaktiboen erauzketa egiteko teknika eraginkorragoak aztertu izan dira. Mahats hondakinetatik polifenolak isolatzeko erabilitako metodo ohikoenak solido-likido erauzketa (agitazio mekanikoa erabiliz) eta Soxhlet bidez egindako erauzketa izan dira. Hala ere, erabiltzen diren tenperatura altuak, denbora luzeak eta disolbatzaile arriskutsuak konposatuen hidrolisia eta oxidazioa gauza ditzakete, baita ingurumenean inpaktua handia ere. Horrela, metabolitoen erauzketarako beste teknika batzuk aztertu dira. Hauen artean, mikrouhinen bidezko erauzketa (MAE) mota askotako bioaktiboak erauzteko erabili da eta bere abantailen artean erauzketa denboren murrizketa aipatu daiteke. Teknika hau bioaktiboen erauzketarako egokia izan arren, tenperatura altuen eta baldintza gogorren erabilera prozesu jasangarriak garatzeko desabantaila bat izan daiteke, energia kontsumoari dagokionez eta prozesua industria-mailara pasatzeko. Tenperatura altuen erabilerak prozesu batean teknologiaren potentzial komertziala jaisten duenez, kapitulu honetan erauzketa prozesua giro tenperaturan egin zen, erauzketa prozesu jasangarriago bat diseinatzeko asmoz.

MAE erabiltzen denean, parametro ugari eragin diezaizkete erauzketa prozesuari eta horregatik, kontuan izan beharrekoak dira, erauzketaren errendimenduan eta konposizioan eragiten baitute banaka edo modu konbinatuan. Horregatik, disolbatzailea, disolbatzaile/solido ratioa, aplikatutako potentzia eta erauzketa tenperaturak eta denborak, faktore garrantzitsuak dira erauzketa prozesua maximizatzeko. Faktore ugari kontuan izan behar direnean erantzun gainazalen metodologia (RSM) teknika erabilgarria da, proba gutxiago egitea baimentzen duelako optimizazioaren interpretazio eraginkorra eginez.



Hau guztia kontuan hartuta, kapitulu honen helburua MAE giro tenperaturan erabiltzeak duen egingarritasuna aztertzea da, Chardonnay mahats-patsatik lortutako polifenolak berreskuratzeko. Horretarako, lehenengo, RSM erabili zen, eta ondoren, estraktuaren karakterizazioa burutu zen.



I irudia. 9. kapituluaren laburpen grafikoa.

## 9.1 EMAITZAK

### 9.1.1 MAE parametroen optimizazioa

Etanol kontzentrazioaren, solido masaren eta erauzketa denboraren efektua TPC-an eta DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmenean aztertu zen, eta balio esperimentalak **9.1. taulan** erakusten dira. Erantzun aldagai bakoitzerako, modelo polinomial koadratiko oso bat garatu zen erregresio anizkoitz teknika erabiliz. **9.2. taulan** lortutako modeloen erregresioaren ekuazio koefizienteak aurkezten dira. **9.3 taulako** emaitzek erakutsi zuten, modeloen  $F$  balioak bi erantzunentzat esanguratsuak ( $p < 0,05$ ) ziren. Gainera, balio egokien falta ez zen esanguratsua ( $p \geq 0,05$ ) izan, hau beharrezkoa izanik modelo balioztatzeko.

Jarraian agertzen den bigarren ordenako ekuazio polinomiala, kodifikatu gabeko faktore independenteen, etanol kontzentrazioaren ( $x_1$ ), solido masaren ( $x_2$ ), eta erauzketa denboraren ( $x_3$ ) eta TPC erantzun aldagaia erabiliz osatu zen.

$$\begin{aligned} \text{TPC} = & -3,30 + 0,0311 x_1 + 2,64 x_2 + 0,234 x_3 - 0,000295 x_1^2 - 0,982 x_2^2 \\ & - 0,00736 x_3^2 + 0,0094 x_1 x_2 - 0,00201 x_1 x_3 + 0,0374 x_2 x_3 \end{aligned}$$

TPC-ari dagokionez,  $R^2$  balioa 0,87 izan zen, doitutako  $R^2$  balioa, berriz, 0,68.

DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmenari dagokionez, bigarren ordenako ekuazioak kodifikatu gabeko faktore independenteen eta inhibizioaren arteko erlazioa erakutsi zuen. Dagokion  $R^2$  balioa 0,96 izan zen, eta doitutako  $R^2$  balioa, berriz, 0,91.

$$\begin{aligned} \text{DPPH} = & -127,6 + 1,72 x_1 + 120,0 x_2 + 10,89 x_3 - 0,0175 x_1^2 - 44,26 x_2^2 \\ & - 0,4184 x_3^2 + 0,349 x_1 x_2 - 0,0610 x_1 x_3 + 1,920 x_2 x_3 \end{aligned}$$

**9.1. taula.** Box-Behnken diseinu esperimentalaren eta fenoliken guztizko edukia (TPC) eta DPPH erradikalak ezabatzearen ahalmenaren erantzunak.

| Entseguak | Faktoreak   |             |               | Kodetutako faktoreak |         |         | Erantzunak      |  |
|-----------|-------------|-------------|---------------|----------------------|---------|---------|-----------------|--|
|           | Etanola (%) | Solutua (g) | Denbora (min) | Etanola              | Solutua | Denbora | TPC (mg GAE/mL) | DPPH erradikal ezabatzearen ahalmena (%) |
| 1         | 60          | 1,5         | 5             | 1                    | 0       | -1      | 0,581           | 62,1                                     |
| 2         | 45          | 1           | 5             | 0                    | -1      | -1      | 0,322           | 47,5                                     |
| 3         | 60          | 1           | 10            | 1                    | -1      | 0       | 0,675           | 59,7                                     |
| 4         | 60          | 2           | 10            | 1                    | 1       | 0       | 1,278           | 91,7                                     |
| 5         | 45          | 2           | 15            | 0                    | 1       | 1       | 1,315           | 92,6                                     |
| 6         | 30          | 2           | 10            | -1                   | 1       | 0       | 0,869           | 78,7                                     |
| 7         | 45          | 2           | 5             | 0                    | 1       | -1      | 0,656           | 55,4                                     |
| 8         | 30          | 1,5         | 15            | -1                   | 0       | 1       | 1,528           | 91,8                                     |
| 9         | 45          | 1,5         | 10            | 0                    | 0       | 0       | 1,192           | 89,2                                     |
| 10        | 45          | 1,5         | 10            | 0                    | 0       | 0       | 1,268           | 89,1                                     |
| 11        | 60          | 1,5         | 15            | 1                    | 0       | 1       | 0,870           | 78,5                                     |
| 12        | 45          | 1,5         | 10            | 0                    | 0       | 0       | 1,071           | 84,5                                     |
| 13        | 30          | 1,5         | 5             | -1                   | 0       | -1      | 0,637           | 57,1                                     |
| 14        | 45          | 1,5         | 10            | 0                    | 0       | 0       | 1,087           | 84,4                                     |
| 15        | 45          | 1           | 15            | 0                    | -1      | 1       | 0,607           | 65,5                                     |
| 16        | 30          | 1           | 10            | -1                   | -1      | 0       | 0,548           | 57,1                                     |

**9.2. taula.** Erregresio analisia fenoliken guztizko edukiaren (TPC) eta DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmenaren modelo koadratiko osoarentzako.

|                             | TPC     |                |                  |                  | DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmena |                |                  |                  |
|-----------------------------|---------|----------------|------------------|------------------|--------------------------------------|----------------|------------------|------------------|
|                             | Koef.   | Estd. $\Delta$ | <i>t</i> -balioa | <i>p</i> -balioa | koef.                                | Estd. $\Delta$ | <i>t</i> -balioa | <i>p</i> -balioa |
| b <sub>0</sub> (konstant)   | 1,1545  | 0,0978         | 11,80            | 0,000*           | 86,78                                | 2,40           | 36,12            | 0,000*           |
| b <sub>1</sub> (Eta)        | -0,0223 | 0,0692         | -0,32            | 0,758            | 0,89                                 | 1,70           | 0,53             | 0,617            |
| b <sub>2</sub> (Sol)        | 0,2457  | 0,0692         | 3,55             | 0,012*           | 11,06                                | 1,70           | 6,51             | 0,001*           |
| b <sub>3</sub> (Denb)       | 0,2655  | 0,0692         | 3,84             | 0,009*           | 13,31                                | 1,70           | 7,83             | 0,000*           |
| b <sub>11</sub> (Eta*Eta)   | -0,0665 | 0,0978         | -0,68            | 0,522            | -3,94                                | 2,40           | -1,64            | 0,152            |
| b <sub>22</sub> (Sol*Sol)   | -0,2455 | 0,0978         | -2,51            | 0,046*           | -11,07                               | 2,40           | -4,61            | 0,004*           |
| b <sub>33</sub> (Denb*Denb) | -0,1840 | 0,0978         | -1,88            | 0,109            | -10,46                               | 2,40           | -4,35            | 0,005*           |
| b <sub>12</sub> (Eta*Sol)   | 0,0706  | 0,0978         | 0,72             | 0,498            | 2,62                                 | 2,40           | 1,09             | 0,317            |
| b <sub>13</sub> (Eta*Denb)  | -0,1505 | 0,0978         | -1,54            | 0,175            | -4,58                                | 2,40           | -1,90            | 0,106            |
| b <sub>23</sub> (Sol*Denb)  | 0,0935  | 0,0978         | 0,96             | 0,376            | 4,80                                 | 2,40           | 2,00             | 0,093            |

Koefizientea: Erregresio koefiziente estandarizata; Estd.  $\Delta$ : Koefizientearen errore estandarra; *t*-balioa: *t*-testaren estatistika; *p*-balioa: *t*-testaren balio esanguratsua (\*)  $p < 0,05$ .

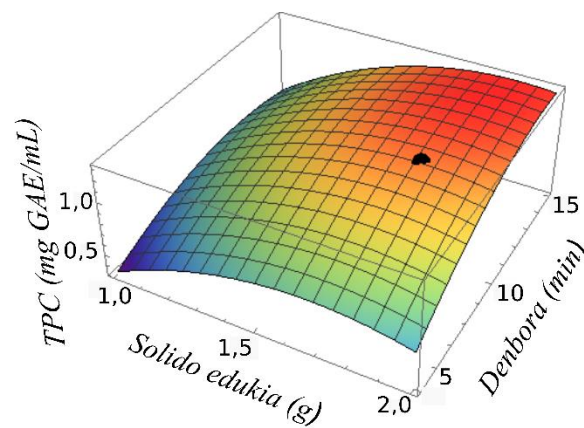
**9.3.taula.** Modelo koadratiko osoaren bariantza-analisia (ANOVA).

|              | TPC |                    |          |                          |                  | DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmena |          |                          |                  |
|--------------|-----|--------------------|----------|--------------------------|------------------|--------------------------------------|----------|--------------------------|------------------|
|              | DF  | SS (adj)           | MS (adj) | <i>F</i> -balioa         | <i>p</i> -balioa | SS (adj)                             | MS (adj) | <i>F</i> -balioa         | <i>p</i> -balioa |
| Modeloa      | 9   | 1,59070            | 0,176744 | 4,62                     | 0,038*           | 3593,56                              | 399,28   | 17,29                    | 0,001*           |
| Linearra     | 3   | 1,05106            | 0,350352 | 9,15                     | 0,012*           | 2400,74                              | 800,25   | 34,66                    | 0,000*           |
| Etanola      | 1   | 0,00398            | 0,003977 | 0,10                     | 0,758            | 6,41                                 | 6,41     | 0,28                     | 0,617            |
| Solidoa      | 1   | 0,48308            | 0,483085 | 12,62                    | 0,012*           | 978,15                               | 978,15   | 42,37                    | 0,001*           |
| Denbora      | 1   | 0,56399            | 0,563995 | 14,73                    | 0,009*           | 1416,18                              | 1416,18  | 61,34                    | 0,000*           |
| Koadratikoa  | 3   | 0,39411            | 0,131370 | 3,43                     | 0,093            | 989,48                               | 329,83   | 14,29                    | 0,004*           |
| Eta*Eta      | 1   | 0,01768            | 0,017681 | 0,46                     | 0,522            | 62,09                                | 62,09    | 2,69                     | 0,152            |
| Sol*Sol      | 1   | 0,24098            | 0,240984 | 6,29                     | 0,046*           | 489,74                               | 489,74   | 21,21                    | 0,004*           |
| Denb*Denb    | 1   | 0,13545            | 0,135446 | 3,54                     | 0,109            | 437,65                               | 437,65   | 18,96                    | 0,005*           |
| Interakzioa  | 3   | 0,14553            | 0,048509 | 1,27                     | 0,367            | 203,34                               | 67,78    | 2,94                     | 0,121            |
| Eta*Sol      | 1   | 0,01993            | 0,019933 | 0,52                     | 0,498            | 27,46                                | 27,46    | 1,19                     | 0,317            |
| Eta*Denb     | 1   | 0,09060            | 0,090601 | 2,37                     | 0,175            | 83,72                                | 83,72    | 3,63                     | 0,106            |
| Sol*Denb     | 1   | 0,03499            | 0,034995 | 0,91                     | 0,376            | 92,16                                | 92,16    | 3,99                     | 0,093            |
| Errorea      | 6   | 0,22972            | 0,038287 |                          |                  | 138,53                               | 23,09    |                          |                  |
| Egokitze eza | 3   | 0,20390            | 0,067968 | 7,90                     | 0,062            | 116,24                               | 38,75    | 5,21                     | 0,104            |
| Errore purua | 3   | 0,02582            | 0,008606 |                          |                  | 22,29                                | 7,43     |                          |                  |
| Totala       | 15  | 1,82042            |          |                          |                  | 3732,09                              |          |                          |                  |
|              |     | R <sup>2</sup> (%) |          | R <sup>2</sup> (adj) (%) |                  | R <sup>2</sup> (%)                   |          | R <sup>2</sup> (adj) (%) |                  |
|              |     | 87,38%             |          | 68,45                    |                  | 96,29                                |          | 90,72                    |                  |

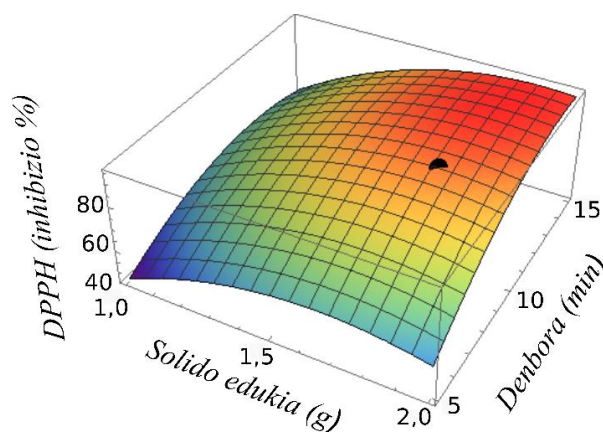
DF: Askatasun gradua; SS: karratuen gehiketa; SS (adj): karratuen gehiketaren doikuntza; *F*-balioa: *F*-testaren estatistika; *p*-balioa: *F*-testaren balio esanguratsua (\*)  $p < 0,05$ ; R<sup>2</sup>: zehazpen koefizientea; R<sup>2</sup> (adj): zehazpen koefizientearen doikuntza.

Lan honetan, konposatu fenoliken erauzketa eta inhibizio erantzunak optimizatu ziren TPC eta DPPH inhibizioa aldi berean maximizatzen; izan ere, korrelazio indartsua dago TPC-aren eta DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmenaren artean, Tournour eta lankideek (2015) aipatu zuten bezala. Aurre-baldintzarik ipini gabe, lortutako faktoreen balio optimoak hurrengoak ziren:  $x_1 = 30$ ;  $x_2 = 1,78$ ;  $x_3 = 15$ .

**9.1. irudian** ikusten den bezala TPC balioentzako eta **9.2. irudian** DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmenarentzako, lortutako erantzunak hobeak dira denbora luzeagoak erabiltzen direnean.



**9.1. irudia.** TPC modeloaren hiru-dimentsiotako erantzuna, denbora murrizketarekin lortutako erantzun optimoa gehituta (puntu beltza).



**9.2. irudia.** DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmena modeloaren hiru-dimentsiotako erantzuna, denbora murrizketarekin lortutako erantzun optimoa gehituta (puntu beltza).

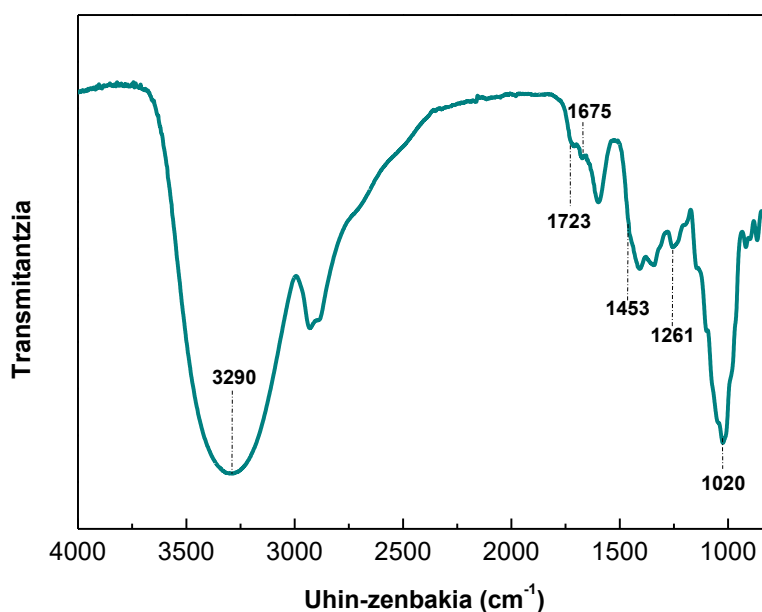
Konbinaketa honekin, erantzun teorikoak  $TPC_t^{opt1} = 1,42$  mg GAE/mL eta  $DPPH_t^{opt1} = \%93,3$  izan ziren. Hala ere, erauzketa industria mailara pasatzeko potentziala kontuan hartuta, 10 minutuko denbora maximoa ezarri zen bigarren optimizazio batean. Baldintza berri honekin, emaitza maximo bat lortzeko faktoreen balioak hurrengoak izan ziren:  $x_1 = 48$ ,  $x_2 = 1,77$ ,  $x_3 = 10$ . Horrela, iragarritako erantzun optimoak  $TPC_t^{opt2} = 1,22$  mg GAE/mL eta  $DPPH_t^{opt2} = \%89,8$  izan ziren. Balio optimo hau puntu beltz batekin adierazi zen **9.1. irudian** eta **9.2. irudian**. Balio berri hauek baldintzarik gabe lortutako balioak baino baxuagoak ziren, horrela, denbora murrizketa, etanol kontzentrazio altuago batekin orekatu zen. Optimizazioaren eta modeloaren fidagarritasuna aztertzeko, laborategian hainbat esperimentu burutu ziren baldintza optimoak jarraituz. Lortutako balio esperimentalak bat zetozen balio teorikoekin:  $TPC_e^{opt2} = 1,21 \pm 0,04$  mg GAE/mL eta  $DPPH_e^{opt2} = \%87 \pm 5$ .

### 9.1.2 Mahats-patsa estraktuaren karakterizazioa

RSM teknikarekin lortutako TPC eta DPPH erradikalak ezabatzeko ahalmen balioetan oinarriturik, eta denbora eta tenperaturaren murrizketak kontuan hartuta, parametro optimoenak  $\%48$  etanola, 10 min eta 1,77 g/lagin izan ziren. Ondorioz, azken erauzketa baldintza hauek jarraituz egin zen. Lortutako mahats-pats estraktuaren karakterizazioa hainbat teknika esperimental erabiliz egin zen. FTIR analisisia mahats-pats estraktuan konposatu fenoliken presentzia aztertzeko burutu zen. FTIR espektroa **9.3. irudian** agertzen da. Ikusten denez, banda nagusi bat  $3290\text{ cm}^{-1}$ -ean agertzen da, O-H taldearen edo konposatu fenoliken O-H mugimenduaren bibrazioarekin erlazionatuta dagoena (Alara et al., 2018).  $1723\text{ cm}^{-1}$ -ean dagoen banda, karboxilikoarekin erlazionatuta dago eta hainbat azido fenoliken presentzia adierazten du (Lu and Hsieh, 2012).  $1675\text{ cm}^{-1}$ -ean dagoen absortzio banda, eraztun aromatikoen deformazioa eta C=C taldeei dagokie, eta polifenolen, flabonoide era aminoazidoen presentzia iradokitzen du



(Zhao et al., 2015).  $1453\text{ cm}^{-1}$ -ean dagoen banda,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , eraztun aromatikoaren, eta flabonoideen presentziagatik agertzen da.  $1261\text{ cm}^{-1}$  inguruan dagoen banda, flabonoideetan oinarritutako taninoen bereizgarria da (De Souza et al., 2015).  $1020\text{ cm}^{-1}$ -ean agertzen den banda estua, konposatu fenolikoei eta azukre monomeroei dagokien C-O-H taldeekin erlazionatu dago (Saha et al., 2016). Amaitzeko,  $919\text{ cm}^{-1}$  azpitik dauden bandak egitura aromatikoan dauden C-H taldeei dagozkie (Sardella et al., 2015).

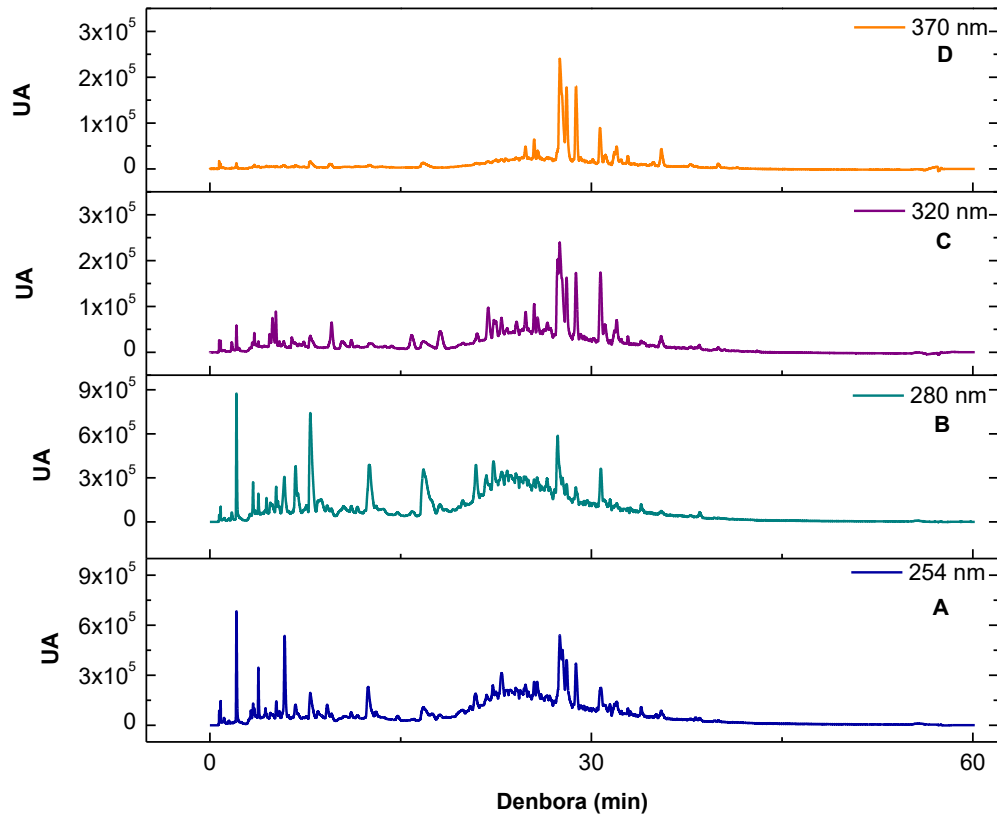


### 9.3. irudia. Mahats-pats estraktuaren FTIR espektroa.

Jakina denez, eta infragorri espektroak erakusten duen bezala, mahatsek bere konposizioan azukre eduki handia dute. Gainera, azukrearen presentzia, Rebelein azukre metodoaren zein HPLC emaitzen bitartez baieztatu zen. Erauzitako laginak %66 azukrea zeukan, gehienbat, glukosaz ( $313,1\text{ g/L}$ ) eta manosaz ( $112,6\text{ g/L}$ ) osatuta zegoelarik. Azukre frakzio hau, ardoa egiterakoan gauzatzen den erauzketa mailaren araberakoa da, erabiltzen den mahats-motarena baino (Llobera eta Cañellas, 2007).

Azukreaz gain, konposatu fenolikoak ere mahats-patsan ugariak ziren. Hauen konposizioa, erauzketaren arabera aldatzen da, baita ardogintzan eta post-hartzidura tratamenduan gertatzen diren erreakzioen eta ardoaren zahartzearen arabera ere. Normalean, ardo txuriak aireztapenik gabe egiten dira, oxigenoarekin kontaktu denboraldi luzeak ekiditeko, izan ere oxigenoak ardoa marroitzea eta kalitatearen okertzea gauzatzen dituelako (Salacha et al., 2008). Horrela, beratze pausoak ordu batzuk bakarrik irauten ditu eta sulfuro dioxidoa berehala gehitzen da ardoa oxidazio entzimatiakoaz babesteko. Sulfuro dioxido kantitate altuek ardoan dauden fenoliko guztizkoen, flabonoideen eta flaban-3-olaren edukian eragiten dute (Ivanova et al., 2011a). Polifenolak gehienbat mahatsaren hazietan eta azalean kokatuta daude (García-Esparza et al., 2018; Nogales-Bueno et al., 2017; Toaldo et al., 2013). Kapitulu honetan, konposatu fenoliko indibidualen kuantifikazioa egin zen estandar espeziifikoaren kalibratze kurban oinarrituta eta erretentzio denborekin konbinatuta UHPLC kromatografia erabiliz (**9.4. irudia**). MS datuen xehetasun guztiak eta bere esleipenak **9.4. taulan** agertzen dira. Análisiak polifenolen aniztasun handia aurkeztu zuen, gehienbat flabanolak, flabonolak, dihidroflabonolak, azido hidroxizanamikoa eta azido hidroxibentzoikoak. Mahats-patsaren estraktuan 37 piko identifikatu ziren. Flabanolen artean, prozianidina azpimarratu daitezke; izan ere laginean zegoen polifenol nagusia prozianidina trimeroa izan zen. Katekina eta epikatekina monomeroak ere identifikatu ziren. Zehazki, 16 flabanol aurkitu ziren eta prozianidina ugariena izan zen, izan ere, 37 pikoetatik konposatu honen 9 piko aurkitu ziren laginean. Gainera, kerzetin, kaempferol eta azido galikoa ere identifikatu ziren. Bestalde, glukuronide deribatuak, kerzetin-3-O-glukuronidea eta kaempferol-3-O-glukuronidea, aipagarriak ziren, normalean mahats azalaren presentziagatik agertzen direnak (Ivanova et al., 2011b). Kaempferol deribatuak ere laginean agertu ziren Chardonnay mahatsen bereizgarriak direnak (Ragusa et al.,

2017). Azido hidroxizininamikoek dagokienez, azido *p*-kumaroil-tartarikoa antzeman zen, mahats zurien azalean aurkitzen dena. Bestalde, azido hidroxibentzoikoaren edukia mahats motaren arabera da. Kasu honetan, galikoa izan zen gehien antzeman zena, ardoetan azido hidroxibentzoiko nagusia delako.



**Figure 9.4.** Mahats-pats estraktuaren lerroturiko diodo detekzioaren (DAD) kromatograma 254 nm-an (A), 280 nm-an (B), 320 nm-an (C) eta 370 nm-an (D).

**9.4. taula.** Mahats-pats estraktutik lortutako polifenolen karakterizazioa, UHPLC-Q-TOF-MS/MS analisiaren bidez zehaztua.

| Knp,<br>Znb       | Identifikazio tent, | LC<br>tR (min) | DAD<br>UB<br>Bandak<br>(nm) | ESI(+)-Q-ToF  |  |   | ESI(-)-Q-ToF  |  |  |
|-------------------|---------------------|----------------|-----------------------------|---|--|---|---|--|--|
|                   |                     |                |                             | Esp,<br>Ak,<br>Masa<br>[M+H] <sup>+</sup><br>Errorea<br>(mDa) | [M+H] <sup>+</sup><br>detektatutako<br>formula | [M+H] <sup>+</sup> Aduktoa eta<br>fragmentatutako<br>ioiak  | Esp,<br>Ak,<br>Masa<br>[M-H] <sup>-</sup><br>Errorea<br>(mDa) | [M-H] <sup>-</sup><br>detektatutako<br>formula | [M-H] <sup>-</sup> Aduktoa eta<br>fragmentatutako<br>ioiak   |
| <i>Flabanolak</i> |                     |                |                             |   |  |   |   |  |  |
| 1                 | ((Epi)kat)3 (1)     | 3,43           | 283                         | 867,2144<br>0,8   | C45H39O18                                      | 715,1664 [U(1,3A)MD] <sup>+</sup><br>579,1500 [MD] <sup>+</sup><br>409,0916 [M(1,3A-H2O)D] <sup>+</sup><br>289,0709 [D] <sup>+</sup><br>247,0605 [U-C2H2O] <sup>+</sup><br>127,0391 [D(1,4A+2H)] <sup>+</sup><br>123,0445 [D(1,2B)] <sup>+</sup>  | 865,1988<br>0,8   | C45H37O18                                      | 713,1519 [U(1,3A)MD] <sup>-</sup><br>577,1306 [MD] <sup>-</sup><br>407,0772 [M(1,3A-H2O)D] <sup>-</sup><br>289,0709 [U] <sup>-</sup><br>125,0257 [D(1,4A+2H)] <sup>-</sup>     |
| 2                 | PBI                 | 5,82           | 280                         | 579,1508<br>0,5   | C30H27O12                                      | 427,1021 [U(1,3A)D] <sup>+</sup><br>409,0920[U(1,3A-H2O)D] <sup>+</sup><br>291,0871[D] <sup>+</sup><br>289,0709[U] <sup>+</sup><br>287,0553[U(1,3A)D(1,2A-H2O)] <sup>+</sup><br>247,0602[U-C2H2O] <sup>+</sup><br>139,0391[D(1,3A)] <sup>+</sup><br>127,0390[D(1,4A+2H)] <sup>+</sup><br>123,0440[D(1,2B)] <sup>+</sup> | 577,1351<br>0,5   | C30H25O12                                      | 425,0869 [U(1,3A)D] <sup>-</sup><br>407,0766 [U(1,3A-H2O)D] <sup>-</sup><br>289,0713 [D] <sup>-</sup><br>245,0803 [U-C2H2O] <sup>+</sup><br>125,0238 [D(1,4A+2H)] <sup>-</sup> |
| 3                 | ((Epi)kat)3 (2)     | 6,09           | 283                         | 867,2133<br>-0,3  | C45H39O18                                      | 715,1648 [U(1,3A)MD] <sup>+</sup><br>579,1478 [MD] <sup>+</sup><br>409,0924[M(1,3A-H2O)D] <sup>+</sup><br>291,0863[D] <sup>+</sup>  | 865,1988<br>0,8   | C45H37O18                                      | 713,1402 [U(1,3A)MD] <sup>-</sup><br>577,1306 [MD] <sup>-</sup><br>407,0772 [M(1,3A-H2O)D] <sup>-</sup><br>289,0681 [U] <sup>-</sup>   |

|          |                 |      |     |          |           |                                |          |           |                          |
|----------|-----------------|------|-----|----------|-----------|--------------------------------|----------|-----------|--------------------------|
|          |                 |      |     |          |           | 289,0708 [U]+                  |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-   |
|          |                 |      |     |          |           | 247,0600 [U-C2H2O]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 139,0391 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 127,0389 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 123,0438 [D(1,2B)]+            |          |           |                          |
| <b>4</b> | PBII            | 6,77 | 280 | 579,1496 | C30H27O12 | 427,1020 [U(1,3A)D]+           | 577,1358 | C30H25O12 | 425,0875 [U(1,3A)D]-     |
|          |                 |      |     | -0,7     |           | 409,0923 [U(1,3-H2O)D]+        | 1,2      |           | 407,0774[U(1,3A-H2O)D]-  |
|          |                 |      |     |          |           | 291,0867 [D]+                  |          |           | 289,0717 [D]-            |
|          |                 |      |     |          |           | 289,0709 [U]+                  |          |           | 245,0807 [U-C2H2O]+      |
|          |                 |      |     |          |           | 287,0555 [U(1,3A)D(1,2A-H2O)]+ |          |           | 125,0240 [D(1,4A+2H)]-   |
|          |                 |      |     |          |           | 247,0603 [U-C2H2O]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 139,0393 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 127,0394 [U(1,4A+2H)D]+        |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 123,0444 [D(1,2B)]+            |          |           |                          |
| <b>5</b> | ((Epi)kat)3 (3) | 8,02 | 283 | 867,2121 | C45H39O18 | 715,1641 [U(1,3A)MD]+          | 865,1988 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-    |
|          |                 |      |     | -1,5     |           | 579,1495 [MD]+                 | 0,8      |           | 577,1306 [MD]-           |
|          |                 |      |     |          |           | 409,0925[M(1,3A-H2O)D]+        |          |           | 407,0772 [M(1,3A-H2O)D]- |
|          |                 |      |     |          |           | 291,0865[D]+                   |          |           | 289,0681 [U]-            |
|          |                 |      |     |          |           | 289,0710 [U]+                  |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-   |
|          |                 |      |     |          |           | 247,0604 [U-C2H2O]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 139,0391 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 127,0393 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                          |
|          |                 |      |     |          |           | 123,0447 [D(1,2B)]+            |          |           |                          |
| <b>6</b> | Kat             | 8,06 | 278 | 291,0873 | C15H15O6  | 207,0655[Rup(A)]+              | 289,0717 | C15H13O6  | 205,0506 [Rup(A)]-       |
|          |                 |      |     | 0,4      |           | 147,0442 [0,4B-2H2O]+          | 0,5      |           | 137,0243 [1,3A]-         |
|          |                 |      |     |          |           | 139,0392 [1,3A]+               |          |           | 123,0452 [1,3B-CO]-      |
|          |                 |      |     |          |           | 123,0442 [1,2B]+               |          |           | 109,0296 [1,3A-CO]-      |
|          |                 |      |     |          |           | 119,0493 [0,4B-2H2O-CO]+       |          |           |                          |

|           |                 |       |     |                  |           |   |                 |           |   |
|-----------|-----------------|-------|-----|------------------|-----------|---|-----------------|-----------|---|
| <b>7</b>  | PBIII           | 8,81  | 280 | 579,1500<br>-0,3 | C30H27O12 | 427,1022 [U(1,3A)D]+<br>409,0917 [U(1,3-H2O)D]+<br>291,0865[D]+<br>289,0706 [U]+<br>287,0551 [U(1,3A)D(1,2A-H2O)]+<br>247,0602 [U-C2H2O]+<br>139,0390 [D(1,3A)]+<br>127,0390[U(1,4A+2H)D]+<br>123,0439 [D(1,2B)]+ | 577,1349<br>0,3 | C30H25O12 | 425,0872[U(1,3A)D]-<br>407,0769[U(1,3A-H2O)D]-<br>289,0718 [D]-<br>245,0810[U-C2H2O]+<br>125,0244 [D(1,4A+2H)]-                 |
| <b>8</b>  | ((Epi)kat)3 (4) | 9,29  | 283 | 867,2141<br>0,5  | C45H39O18 | 715,1628 [U(1,3A)MD]+<br>579,1478 [MD]+<br>409,0907[M(1,3A-H2O)D]+<br>289,0701 [U]+<br>247,0605 [U-C2H2O]+<br>139,0391 [D(1,3A)]+<br>127,0389 D(1,4A+2H)]+<br>123,0443 [D(1,2B)]+                                 | 865,1988<br>0,8 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-<br>577,1306 [MD]-<br>407,0772 [M(1,3A-H2O)D]-<br>287,0561 [D]-<br>125,0257 [D(1,4A+2H)]-                  |
| <b>9</b>  | ((Epi)kat)3 (5) | 10,21 | 283 | 867,2099<br>-3,7 | C45H39O18 | 715,1667 [U(1,3A)MD]+<br>579,1466 [MD]+<br>409,0914[M(1,3A-H2O)D]+<br>291,0852[D]+<br>289,0702 [U]+<br>247,0598 [U-C2H2O]+<br>139,0388 [D(1,3A)]+<br>127,0393 [D(1,4A+2H)]+<br>123,0436 [D(1,2B)]+                | 865,1988<br>0,8 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-<br>577,1306 [MD]-<br>407,0772 [M(1,3A-H2O)D]-<br>289,0681 [U]-<br>287,6561 [D]-<br>125,0257 [D(1,4A+2H)]- |
| <b>10</b> | ((Epi)kat)3 (6) | 10,56 | 283 | 867,2144<br>0,8  | C45H39O18 | 715,1671 [U(1,3A)MD]+<br>579,1489 [MD]+   | 865,1988<br>0,8 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-<br>577,1306 [MD]-   |

|           |                 |       |     |          |           |                                |          |           |                          |
|-----------|-----------------|-------|-----|----------|-----------|--------------------------------|----------|-----------|--------------------------|
|           |                 |       |     |          |           | 409,0907 [M(1,3A-H2O)D]+       |          |           | 407,0772 [M(1,3A-H2O)D]- |
|           |                 |       |     |          |           | 291,0861[D]+                   |          |           | 289,0681 [U]-            |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0708 [U]+                  |          |           | 287,6561 [D]-            |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0607 [U-C2H2O]+            |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0388 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0392 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 123,0446 [D(1,2B)]+            |          |           |                          |
| <b>11</b> | PBIB            | 12,62 | 280 | 579,1509 | C30H27O12 | 427,1030[U(1,3A)D]+            | 577,1349 | C30H25O12 | 425,0871 [U(1,3A)D]-     |
|           |                 |       |     | 0,6      |           | 409,0926[U(1,3-H2O)D]+         | 0,3      |           | 407,0768[U(1,3A-H2O)D]-  |
|           |                 |       |     |          |           | 291,0869[D]+                   |          |           | 289,0715 [D]-            |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0711 [U]+                  |          |           | 245,0807 [U-C2H2O]+      |
|           |                 |       |     |          |           | 287,0555 [U(1,3A)D(1,2A-H2O)]+ |          |           | 125,0240 [D(1,4A+2H)]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0606 [U-C2H2O]+            |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0390 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0390[U(1,4A+2H)D]+         |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 123,0439 [D(1,2B)]+            |          |           |                          |
| <b>12</b> | ((Epi)kat)3 (7) | 13,70 | 283 | 867,2142 | C45H39O18 | 715,1674 [U(1,3A)MD]+          | 865,1988 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-    |
|           |                 |       |     | 0,6      |           | 579,1492 [MD]+                 | 0,8      |           | 577,1306 [MD]-           |
|           |                 |       |     |          |           | 409,0910 [M(1,3A-H2O)D]+       |          |           | 407,0772 [M(1,3A-H2O)D]- |
|           |                 |       |     |          |           | 291,0855 [D]+                  |          |           | 289,0681 [U]-            |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0711 [U]+                  |          |           | 287,6561 [D]-            |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0602 [U-C2H2O]+            |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0388 [D(1,3A)]+            |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0390 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                          |
|           |                 |       |     |          |           | 123,0435[D(1,2B)]+             |          |           |                          |
| <b>13</b> | Epi             | 17,22 | 278 | 291,0869 | C15H15O6  | 207,0656 [Rup(A)]+             | 289,0719 | C15H13O6  | 205,0505 [Rup(A)]-       |
|           |                 |       |     | 0,0      |           | 147,0444 [0,4B-2H2O]+          | 0,7      |           | 137,0241 [1,3A]-         |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0394[1,3A]+                |          |           | 123,0449 [1,3B-CO]-      |

|           |                 |       |     |          |           |                                |          |           |                            |
|-----------|-----------------|-------|-----|----------|-----------|--------------------------------|----------|-----------|----------------------------|
|           |                 |       |     |          |           | 123,0444 [1,2B]+               |          |           | 109,0293 [1,3A-CO]-        |
|           |                 |       |     |          |           | 119,0494 [0,4B-2H2O-CO]+       |          |           |                            |
| <b>14</b> | ((Epi)kat)3 (8) | 18,17 | 283 | 867,2164 | C45H39O18 | 715,1653 [U(1,3A)MD]+          | 865,1988 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-      |
|           |                 |       |     | 2,8      |           | 579,1487 [MD]+                 | 0,8      |           | 577,1306 [MD]-             |
|           |                 |       |     |          |           | 409,0922 [M(1,3A-H2O)D]+       |          |           | 407,0772 [M(1,3A-H2O)D]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 291,0874 [D]+                  |          |           | 289,0681 [U]-              |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0710 [U]+                  |          |           | 287,6561 [D]-              |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0605 [U-C2H2O]+            |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-     |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0388 [D(1,3A)]+            |          |           |                            |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0393 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                            |
|           |                 |       |     |          |           | 123,0441 [D(1,2B)]+            |          |           |                            |
| <b>15</b> | PB-gallate      | 19,90 | 280 | 731,1599 | C37H31O16 | 579,1130 [PB+H-Azido gal.]+    | 729,1398 | C37H29O16 | 577,1201 [PB-H-Azido gal]+ |
|           |                 |       |     | -1,3     |           | 427,1011 [U(1,3A)D]+           | -5,8     |           | 425,0831 [U(1,3A)D]-       |
|           |                 |       |     |          |           | 409,0907 [U(1,3-H2O)D]+        |          |           | 407,0772 [U(1,3A-H2O)D]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0711 [U]+                  |          |           | 289,0681 [D]-              |
|           |                 |       |     |          |           | 287,0546 [U(1,3A)D(1,2A-H2O)]+ |          |           | 245,0407 [U-C2H2O]+        |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0601 [U-C2H2O]+            |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-     |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0390 [D(1,3A)]+            |          |           |                            |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0391 [U(1,4A+2H)D]+        |          |           |                            |
|           |                 |       |     |          |           | 123,0441 [D(1,2B)]+            |          |           |                            |
| <b>16</b> | ((Epi)kat)3 (9) | 20,96 | 283 | 867,2164 | C45H39O18 | 715,1653 [U(1,3A)MD]+          | 865,1988 | C45H37O18 | 713,1519 [U(1,3A)MD]-      |
|           |                 |       |     | 2,8      |           | 579,1487 [MD]+                 | 0,8      |           | 577,1306 [MD]-             |
|           |                 |       |     |          |           | 409,0922 [M(1,3A-H2O)D]+       |          |           | 407,0772 [M(1,3A-H2O)D]-   |
|           |                 |       |     |          |           | 291,0874 [D]+                  |          |           | 289,0681 [U]-              |
|           |                 |       |     |          |           | 289,0710 [U]+                  |          |           | 287,6561 [D]-              |
|           |                 |       |     |          |           | 247,0605 [U-C2H2O]+            |          |           | 125,0257 [D(1,4A+2H)]-     |
|           |                 |       |     |          |           | 139,0388 [D(1,3A)]+            |          |           |                            |
|           |                 |       |     |          |           | 127,0393 [D(1,4A+2H)]+         |          |           |                            |



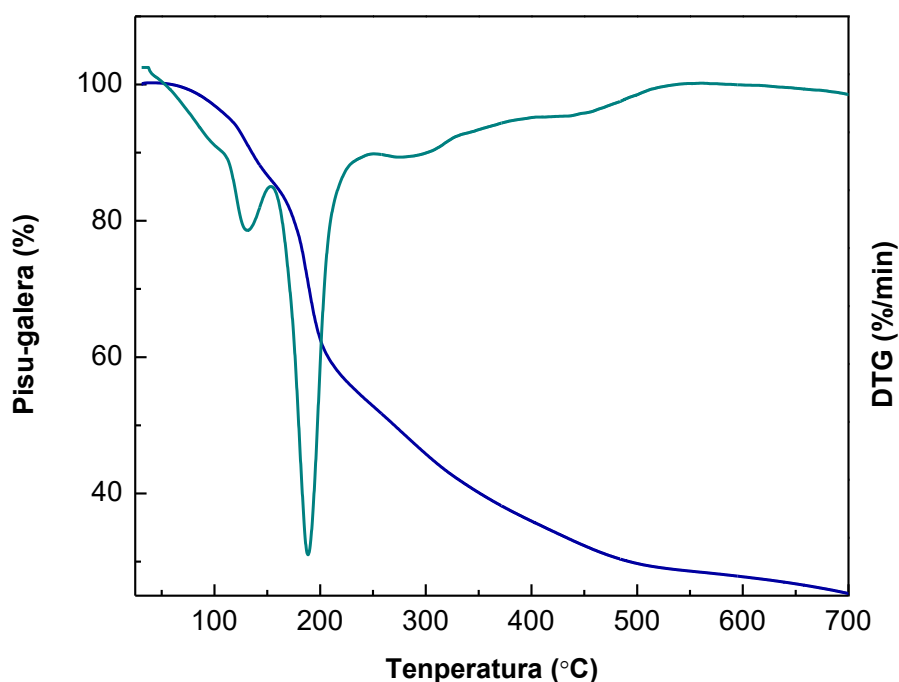
*Flabonolak*

|           |                      |       |          |                  |           |  |                  |           |   |
|-----------|----------------------|-------|----------|------------------|-----------|--|------------------|-----------|---|
| <b>17</b> | Ke-hex-hex-1         | 24,81 | 264, 344 | 627,1572<br>1,1  | C27H31O17 | 465,1021[Y1]+<br>303,0497[Y0]+   | 625,137<br>-3,5  | C27H29O17 | 463,0860 [Y1]-<br>301,0338 [Y0]-  |
| <b>18</b> | Ke-hex-hex-2         | 25,53 | 264, 344 | 627,1562<br>0,1  | C27H31O17 | 465,1028[Y1]+<br>303,0508[Y0]+   | 625,1401<br>-0,4 | C27H29O17 | 463,0874 [Y1]-<br>301,0343 [Y0]-  |
| <b>19</b> | Ke-3-O-glukoronidea  | 27,56 | 255, 352 | 479,0824<br>-0,2 | C21H19O13 | 303,0513[Y0]+<br>257,0451 [Y0-CHO-OH]+<br>229,0501 [Y0-CHO-OH-CO]+<br>153,0186 [1,3A]+ | 477,0667<br>-0,2 | C21H17O13 | 301,0355 [Y0]-<br>151,0038 [1,3A]-  |
| <b>20</b> | Ke-3-O-gal           | 28,12 | 255, 353 | n,d,             | C21H21O12 | 487,0852 [M+Na]+<br>303,0492 [Y0]+   | 463,0824<br>-5,3 | C21H19O12 | 301,0300 [Y0]-<br>271,0252 [Y0-CHO-H]-<br>255,0287 [Y0-CHO-OH]-<br>151,0009 [1,3A]- |
| <b>21</b> | Ke-3-O-glc           | 28,81 | 255, 352 | n,d,             | C21H21O12 | 487,0850[M+Na]+<br>303,0525 [Y0]+  | 463,0918<br>4,1  | C21H19O12 | 301,0375 [Y0]-<br>271,0252 [Y0-CHO-H]-<br>255,0287 [Y0-CHO-OH]-<br>151,0062[1,3A]-  |
| <b>22</b> | Kaem-3-O-gal         | 30,70 | 265, 345 | 449,1081<br>-0,3 | C21H21O11 | 471,0898[M+Na]+<br>287,0559[Y0]+   | 447,0929<br>0,2  | C21H19O11 | 285,0380 [Y0]-<br>151,0035 [1,3A]-  |
| <b>23</b> | Kaem-3-O-Glukoronide | 31,10 | 265, 345 | 463,0878<br>0,1  | C21H19O12 | n,d, [M+Na]+<br>n,d, [Y0]+   | 461,0701<br>-1,9 | C21H17O12 | 285,0362 [Y0]-<br>151,0009 [1,3A]-  |
| <b>24</b> | Kaem-3-O-glc         | 32,00 | 265, 348 | 449,1080<br>-0,4 | C21H21O11 | 471,0910 [M+Na]+<br>287,0569[Y0]+  | 447,0934<br>0,7  | C21H19O11 | 285,0385 [Y0]-<br>151,0038 [1,3A]-  |
| <b>25</b> | Iso-3-O-gal          | 32,35 | 254, 352 | 479,1192<br>0,2  | C22H23O12 | 501,1008 [M+Na]+<br>317,0668 [Y0]+   | 477,1033<br>0,0  | C22H21O12 | 315,0482 [Y0]-<br>151,0035 [1,3A]-  |

|                               |                           |       |          |           |           |                            |          |           |                             |
|-------------------------------|---------------------------|-------|----------|-----------|-----------|----------------------------|----------|-----------|-----------------------------|
|                               |                           |       |          |           |           | 301,1624 [Y0-CH3]+         |          |           |                             |
| <b>26</b>                     | Iso-3-O-glk               | 32,91 | 254, 352 | 479,1188  | C22H23O12 | 501,1002[M+Na]+            | 477,1042 | C22H21O12 | 315,0485 [Y0]-              |
|                               |                           |       |          | -0,2      |           | 317,0664[Y0]+              | 0,9      |           | 151,0047 [1,3A]-            |
| <b>27</b>                     | Kaem-3-O-ram              | 35,43 | 265, 359 | 433,1130  | C21H21O10 | 455,0955[M+Na]+            | 431,0961 | C21H19O10 | 285,0400 [Y0]-              |
|                               |                           |       |          | -0,5      |           | 287,0558[Y0]+              | -1,7     |           | 151,0043 [1,3A]-            |
| <b>28</b>                     | Kaem deribatua            | 39,93 | 266, 364 | Ezezaguna |           | 287,0563 [M+H]+            | 285,0436 |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 258,0536 [M+CHO]+          | 3,7      |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 241,0506 [M+H-CHO-OH]+     |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 213,0549 [M+H+CHO-OH-CO]+  |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 185,0601 [M+H-CHO-OH-2CO]+ |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 165,0186 [0,2A]+           |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 153,0187 [1,3A]+           |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 137,0236 [0,2A-CO]+        |          |           |                             |
|                               |                           |       |          |           |           | 121,0285 [0,2B]+           |          |           |                             |
| <b>Dihidroflabonolak</b>      |                           |       |          |           |           |                            |          |           |                             |
| <b>29</b>                     | DihidroKe-3-O-ram         | 27,40 | 255, 352 | 451,1241  | C21H23O11 | 473,1060 [M+Na]+           | 449,1086 | C21H21O11 | 303,0511 [Y0]-              |
|                               |                           |       |          | 0,1       |           | 305,0673[Y0]+              | 0,2      |           | 285,0408 [Y0-H2O]-          |
|                               |                           |       |          |           |           |                            |          |           | 151,0042 [1,3A]-            |
| <b>Azido Hidroxiznamikoa</b>  |                           |       |          |           |           |                            |          |           |                             |
| <b>30</b>                     | Az <i>trans-p</i> Koumtar | 4,73  | 310      | e.d.      |           |                            | 295,0450 | C13H11O8  | 163,0395 [azido pkoum-H]-   |
|                               |                           |       |          |           |           |                            | -0,4     |           | 149,0088 [azido Tarta. -H]- |
| <b>31</b>                     | Az <i>cis-p</i> Koumtar   | 5,04  | 310      | e.d.      |           |                            | 295,0451 | C13H11O8  | 163,0401 [azido pkoum -H]-  |
|                               |                           |       |          |           |           |                            | -0,3     |           | 149,0089[azido Tarta. -H]-  |
| <b>32</b>                     | pKumhex                   | 11,16 | 313      | e.d.      |           |                            | 325,0925 | C15H17O8  | 163,0418 [Y0]-              |
|                               |                           |       |          |           |           |                            | 0,2      |           | 119,0483 [Y0-CO2]-          |
| <b>Azido Hidroxibenzoikoa</b> |                           |       |          |           |           |                            |          |           |                             |
| <b>33</b>                     | Azido gal                 | 2,13  | 271      | 171,0301  |           | 153,0186 [M+H-H2O]+        | 169,0107 | C7H5O5    | 125,0257 [M-H-CO2]-         |

|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          |                           |
|-----------|------------------------|-------|-----|------|--|---------------------------|-----------|----------|---------------------------|
|           |                        |       |     |      |  | 125,0233 [M+H-H2O-CO]+    | -3,0      |          | 107,0116 [M-H-H2O-CO2]-   |
|           |                        |       |     |      |  | 109,0280 [M+H-H2O-CO2]+   |           |          | 79,0186 [M+H-CO2-H2O-CO]- |
|           |                        |       |     |      |  | 107,0127 [M+H-2H2O-CO]+   |           |          |                           |
|           |                        |       |     |      |  | 81,0337 [M+H-CO2-H2O-CO]+ |           |          |                           |
| <b>34</b> | Galoil Ramnosidea      | 3,26  | 279 | e.d. |  |                           | 315,0717  | C13H15O9 | 169,0164 [Y0]-            |
|           |                        |       |     |      |  |                           | 0,1       |          | 151,0009 [Y0-H2O]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 125,0257 [Y0-CO2]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 107,0116 [Y0-H2O-CO2]-    |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 83,0148 [Y0-CO2-H2O-CO]-  |
| <b>35</b> | Azido gal deribatua-1  | 22,97 | 271 | e.d. |  |                           | Ezezaguna |          | 169,0164 [Y0]-            |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 151,0009 [Y0-H2O]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 125,0257 [Y0-CO2]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 107,0116 [Y0-H2O-CO2]-    |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 83,0148 [Y0-CO2-H2O-CO]-  |
| <b>36</b> | Azido gal deribatua-2  | 27,87 | 271 | e.d. |  |                           | Ezezaguna |          | 169,0164 [Y0]-            |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 151,0009 [Y0-H2O]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 125,0257 [Y0-CO2]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 107,0116 [Y0-H2O-CO2]-    |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 83,0148 [Y0-CO2-H2O-CO]-  |
| <b>37</b> | Azido gal deribatua -3 | 35,63 | 271 | e.d. |  |                           | Ezezaguna |          | 169,0107[Y0]-             |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 151,0009 [Y0-H2O]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 125,0257 [Y0-CO2]-        |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 107,0116 [Y0-H2O-CO2]-    |
|           |                        |       |     |      |  |                           |           |          | 83,0148 [Y0-CO2-H2O-CO]-  |

Mahats-patsak aktibitate antioxidatzailea duten polifenolak dituenek, DPPH erradikalak ezabatzeko gaitasuna neurtzeko analisiaren bidez frogatu zen bezala, konposatu hauen gehikuntza filma eratzeko formulazioan interesgarria izan daiteke filmak ontziratzeko aktiboen aplikazioetan erabiltzeko. Adibidez, mahats-pats estraktuak propietate erakargarriak aurkeztu ditu etil zelulosa filmetan (Olejar et al., 2014). Horregatik, proteinan oinarritutako materialetan mahats-pats estraktua gehitzea propietate antioxidatzaileak hobetzeko eta aldi berean plastiko sintetikoek ordezkapenerako aukera bat izan daiteke. Arrazoi horregatik, konposatu hauen degradazio-tenperaturaren analisia oso garrantzitsua da prozesatze-tenperatura egokiak aukeratzeko. Mahats-pats estraktuaren TGA eta DTG kurbak **9.5. irudian** aurkezten dira.



### 9.5. irudia. Mahats-pats estraktuaren TGA eta DTG kurbak.

Ikusienez, mahats-patsaren DTG kurbek bi masa-galera nagusiz osatuta zeuden. Lehenengo masa-galera, 30-150 °C tartean zegoena, eta 125 °C inguruan zegoen banda,

adsorbatutako eta egiturazko urari zegokion, hurrenez hurren. Hauek %20ko pisu-galera osatzen zuten. Bigarren banda, 200 °C inguruan zegoena eta masa gehiena jadanik galdua zegoena, mahats patsan dauden konposatu organikoen termo-degradazioari dagokio (Basso et al., 2016). Taninoen presentziak 200 °C eta 300 °C-en artean degradazio azkarra sustatu dezake (Anwer et al., 2015). Aurreko lan batzuetan ikusi zenez, soja-proteina filmak konpresio bidez prestatzeko, 200 °C-tik beherako temperaturak erabiltzen dira, horrela, mahats pats estraktua bioaktibo egokia izan daiteke proteinan oinarritutako filmetan gehitzeko eta azken hauen propietate antioxidatzaileak hobetzeko.

## ONDORIOAK

Mikrouhinen bidezko erauzketaren bidez mahats-patsatik antioxidatzaile naturalak erauzi daitezke modu azkar batean eta giro tenperaturan; horrela teknologia honen potentziala azpimarratu daiteke konposatu bioaktiboak erauzteko. RSM erabili zen disolbatzailearen, masa solidoaren eta erauzketa denboraren parametro optimoak aurkitzeko, estraktuaren TPC balio egokienak zein DPPH erradikal ezabatzeko gaitasun altuena lortzeko. Parametro hauek erabiliz, konposatu fenolikoak erauzi ziren mahats-patsatik eta UHPLC teknikaren bidez aztertu ziren. Ikusi zenez, flabanolak konposatu fenoliko ugariak ziren estraktuan. Konposatu hauek 200 °C arte ez dira degradatzen, horrela, egonkortasun termiko honek, konposatu fenolikoak formulazio biopolimerikoetan gehitzea errazten du produktu bioaktiboak garatzeko.

# ***10.***

*kapitula*

**ONDORIO NAGUSIAK**





Doktorego tesi honen ondorio nagusiak honakoak dira:

1. UV argiarekiko eta oxigenoarekiko hesi-propietate bikainak dituzten SPI-an oinarritutako film gardenak prestatu dira.
2. pH 10ean SPI-aren desnaturalizazioa eta formulazioen osagaien arteko interakzioak sustatu dira, filmen propietateak hobetuz.
3. Konpresioaren bidez prestatutako SPI filmek soluzioaren bidez prestatutakoek baino ingurumen inpaktu baxuagoa dute, erabilitako denbora laburragoa eta energia kontsumoa baxuagoa baitira.
4. Tratamendu alkalinoa giro tenperaturan metodo egokia da oilo-lumetatik keratina hidrolizatua lortzeko, nekazaritza-industrian lortutako hondakin honi balioa emanez.
5. Keratina hidrolizatuaren gehikuntzak SPI-an oinarritutako filmen erresistentzia handitu du, keratinak disulfuro loturak sustatzen baititu.
6. Estrusio- eta konpresio-prozesuak erabiliz, SPI-an oinarritutako filmak ekoiztu dira alगतik erauzitako agarra indartzaile gisa gehituz.
7. Estrusio- eta injekzio-prozesuak erabiliz, SPI-an oinarritutako biokonpositeak ekoiztu dira alga-hondakina betegarri gisa gehituz.
8.  $\beta$ -Kitina txibien lumetatik arrakastaz erauzi da giro tenperaturan pausu bakar batean, kitinaren produkzioaren kostua eta ingurumen inpaktua murriztuz.
9. Kitinak eragin zuzena izaten du SPI-an oinarrituriko filmen egituran, trakzio-erresistentzia hobetuz.

10. Mikro-uhinetan oinarritutako teknikaren bidez mahats-patsetik antioxidatzaile naturalak erauzi dira, ingurumenarekiko modu lagungarri eta azkar batean, temperatura altuak eta denbora luzeak ekidinez.

# ***11.***

*kapitula*

**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.

Acosta-Domínguez L., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López G.F., Alamilla-Beltrán L., Azuara E. (2016). Modification of the soy protein isolate Surface at nanometric scale and its effect on physicochemical properties. *Journal of Food Engineering*, 168, 105-112.

Adilah Z.A.M., Jamilah B., Nur Hanani Z.A. (2018). Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocolloids*, 74, 207-218.

Aguiló-Aguayo I., Walton J., Viñas I., Tiwari B.K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT- Food Science and Technology*, 77, 92-99.

Alara O.R., Abdurahman N.H., Ukaegbu C.I., Azhari N.H. (2018). *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. *Industrial Crops and Products*, 122, 533-544.

Al-Bulushi K., Attard T.M., North M., Hunt A.J. (2018). Optimisation and economic evaluation of the supercritical carbon dioxide extraction of waxes from waste date palm (*Phoenix dactylifera*) leaves. *Journal of Cleaner Production*, 186, 988-996.

Albuquerque B.R., Prieto M., Barreiro M.F., Rodrigues A., Curran T.P., Barros L., Ferreira I.C. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo*

L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 95, 404-415.

Al-Dhabi N.A., Ponmurugan K., Jeganathan P.M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34, 206-213.

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.

Al-Hamimi S., Abellan Mayoral A.C, Cunico L.P., Turner C. (2016). Carbon dioxide expanded ethanol extraction: Solubility and extraction kinetics of  $\alpha$ -pinene and cis-verbenol. *Analytical Chemistry*, 88(8), 4336-4345.

Alkan D., Yemenicioğlu A. (2016). Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible films technology against bacterial plant pathogens. *Food Hydrocolloids*, 55, 1-10.

Alonso-Carrillo N., de los Ángeles M.A., Vernon-Carter E.J., Jiménez-Alvarado R., Cruz-Sosa F., Román-Guerrero A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 103, 213-221.

Aloui H., Khwaldia K. (2016). Natural antimicrobial edible coatings for microbial safety and food quality enhancement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1080-1103.

Alparslan Y., Baygar T. (2017). Effect of chitosan film coating combined with orange peel essential oil on the shelf life of deepwater pink shrimp. *Food and Bioprocess Technology*, 10(5), 842-853.

Al-Saadi J.S., Shaker K.A., Ustunol Z. (2014). Effect of heat and transglutaminase on solubility of goat milk protein-based films. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 420-426.

Álvarez K., Famá L., Gutiérrez T.J. (2017). Physicochemical, antimicrobial and mechanical properties of thermoplastic materials based on biopolymers with application in the food industry. In: Masuelli M., Renard D. (eds.). *Advances in physicochemical properties of biopolymers (Part 1)*. Bentham science publishers, pp 358-400.

Álvarez A., Poejo J., Matias A.A., Duarte C.M.M., Cocero M.J., Mato R.B. (2017). Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 162-170.

Alves M.M., Gonçalves M.P., Rocha C.M.R. (2017). Effect of ferulic acid on the performance of soy protein isolate-based edible coatings applied to fresh-cut apples. *LWT- Food Science and Technology*, 80, 409-415.

Ameer K., Shahbaz H.M., Kwon J.H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315.

Ansorena M.R., Zubeldía F., Marcovich N.E. (2016). Active wheat gluten films obtained by thermoplastic processing. *LWT- Food Science and Technology*, 69: 47-54.

Anwer M.A.S., Naguib H. E., Celzard A., Fierro V. (2015). Comparison of the thermal, dynamic mechanical and morphological properties of PLA-Lignin and PLA-Tannin particulate green composites. *Composites Part B: Engineering*, 82, 92-99.

Arabestani A., Kadivar M., Shahedi M., Goli S.A.H., Porta R. (2013). Properties of a new protein film from bitter vetch (*Vicia ervilia*) and effect of CaCl<sub>2</sub> on its hydrophobicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 118-123.

Arabestani A., Kadivar M., Shahedi M., Goli S.A.H., Porta R. (2016a). The effect of oxidized ferulic acid on physicochemical properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), 42894-42901.

Arabestani A., Kadivar M., Shahedi M., Goli S.A.H., Porta R. (2016b). Characterization and antioxidant activity of bitter vetch protein-based films containing pomegranate juice. *LWT- Food Science and Technology*, 74, 77-83.

Aragui M., Moslehi Z. (2014). Chemical modification of cold water fish gelatin using phenolic cross-linker caffeic acid. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(6), 674-679.

Arancibia M.Y., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén C., Montero P. (2014). Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. *Food Control*, 44, 7-15.

Arfat Y.A., Benjakul S., Prodpran T., Sumpavapol P., Songtipya P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265-273.



ASTM D 3985-10. (2010). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a Coulometric Sensor. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Philadelphia.

ASTM D 523-14. (2014). Standard test method for specular gloss. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Philadelphia.

ASTM D 638-03. (2003). Standard test method for tensile properties of plastics. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Philadelphia.

ASTM E 96-00. (2000). Standard test method for water vapour transmission of materials. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Philadelphia.

Atarés L., Chiralt A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62.

Aydemir L.Y., Gökbulut A.A., Baran Y., Yemenicioğlu A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocolloids*, 36, 130-142.

Bai H., Xu J., Liao P., Liu X. (2013). Mechanical and water properties of soy protein isolate film incorporated with gelatin. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 29(2), 174-188.

Balakrishnan P., Geethamma V., Sreekala M.S., Thomas S. (2018). Polymeric biomaterials: State-of-the-art and new challenges, *Fundamental Biomaterials: Polymers*, Elsevier, pp 1-20.

Balestrieri C., Colonna G., Giovane A., Irace G., Servillo L. (1978). Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins. *European Journal of Biochemistry*, 90, 433-440.

Ballesteros L.F., Teixeira J.A., Mussatto S.I. (2014). Selection of the solvent and extraction conditions for maximum recovery of antioxidant phenolic compounds from coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1322-1332.

Barazi A., Osman E. (2017). Antimicrobial activity of a novel biodegradable edible film produced from *Pistacia vera* resin and *Origanum vulgare* essential oil. *Research Journal of Biotechnology*, 12(9), 15-21.

Barkay-Olami H., Zilberman M. (2016). Novel porous soy protein-based blend structures for biomedical applications: Microstructure, mechanical and physical properties. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B*, 104, 1109-1120.

Barros F.C.N., da Silva D.C., Sombra V.G., Maciel J.S., Feitosa J.P.A., Freitas A.L.P., de Paula R.M.C. (2013). Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J. Agardh). *Carbohydrate Polymers*, 92, 598-603.

Basiak E., Galus S., Lenart A. (2015). Characterisation of composite edible films based on wheat starch and whey-protein isolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 372-380.

Basiak E., Lenart A., Debeaufort F. (2017). Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch-whey protein blend edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 858-867.

Basso D., Patuzzi F., Castello D., Baratieri M., Rada E.C., Weiss-Hortala E., Fiori L. (2016). Agro-industrial waste to solid biofuel through hydrothermal carbonization. *Waste Management*, 47, 114-121.

Basu S., Shivhare U.S., Singh T.V., Beniwal V.S. (2011). Rheological, textural and spectral characteristics of sorbitol substituted mango jam. *Journal of Food Engineering*, 105, 503-512.

Bengoechea C., Arrachid A., Guerrero A., Hill S.E., Mitchell J.R. (2007). Relationship between the glass transition temperature and the melt flow behavior for gluten, casein and soya. *Journal of Cereal Science*, 45, 275-284.

Benito-Román O., Rodríguez-Perrino M., Sanz M.T., Melgosa R., Beltrán S. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction of quinoa oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *Journal of Supercritical Fluids*, 139, 62-71.

Bertuzzi M.A., Slavutsky A.M. (2016). Standard and new processing techniques used in the preparation of films and coatings at the lab level and scale-up. In: Garcia M.P.M., Gómez-Guillén M.C., López-Caballero M.E., Barbosa-Cánovas G.V. (eds.). *Edible films and coatings: fundamentals and applications*. Chapter 1. CRC Press, USA.

Bezerra M.A., Santelli R.E, Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A. (2008). Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76(5), 965-977.

Bibi F., Guillaume C., Gontard N., Sorli B. (2017). Wheat gluten, a biopolymer to monitor carbon dioxide in food packaging: Electric and dielectric characterization. *Sensors and Actuators B*, 250, 76-84.

Bibi F., Guillaume C., Vena A., Gontard N., Sorli B. (2016). Wheat gluten, a bio-polymer layer to monitor relative humidity in food packaging: Electric and dielectric characterization. *Sensors and Actuators B*, 247, 355-367.

Biji K.B., Ravishankar C.N., Mohan C.O., Gopal T.K.S. (2015). Smart packaging systems for food applications: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6125-6135.

Bodoira R., Rossi Y., Montenegro M., Maestri D., Velez A. (2017). Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 57-65.

Bonfante A., Alfieri S.M., Albrizio R., Basile A., de Mascellis R., Gambuti A., Giorio P., Langella G., Manna P., Monaco E., Terribile F. (2017). Evaluation of the effects of future climate change on grape quality through a physically based model application: a case study for the Aglianico grapevine in Campania region, Italy. *Agricultural System*, 152, 100-109.

Bonwell E., Wetzal D. (2009). Innovative FT-IR imaging of protein films secondary structure before and after heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10067-10072.

Boukroufa M., Boutekedjiret C., Petigny L., Rakotomanomana N., Chemat F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonic Sonochemistry*, 24, 72-79.

Bourny V., Perez-Puyana V., Felix M., Romero A., Guerrero A. (2017). Evaluation of the injection moulding conditions in soy/nanoclay based composites. *European Polymer Journal*, 95, 539-546.

Bourtoom T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.

Boutaoui N., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Carradori S., Cesa S., Giusti A.M., Campestre C., Menghini L., Innosa D. (2018). Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from thymus algeriensis aerial parts. *Molecules*, 23(2), 463-474.

Bouvier J., Campanella O.H. (2014). *Extrusion processing technology: Food and non-food biomaterials*. Wiley-Blackwell.

Božič M., Majerič M., Denac M., Kokol V. (2015). Mechanical and barrier properties of soy protein isolate films plasticized with a mixture of glycerol and dendritic polyglycerol. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(17), 41837-41849.

Bubalo M.C., Vidović S., Redovniković I.R., Jokić S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 52-73.

Bucić-Kojić A., Sovová H., Planinić M., Tomas S. (2013). Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1136-1140.

Bustamante M.A., Moral R., Paredes C., Pérez-Espinosa A., Moreno-Caselles J., Pérez-Murcia M.D. (2008). Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* 28(2), 372-380.

Caldas T.W., Mazza K.E.L., Teles A.S.C., Mattos G.N., Brígida A.I.S., Conte-Junior C.A., Borguini R.G., Godoy R.L.O., Cabral L.M.C., Tonon R.V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and nonconventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86-91.

Carpiné D., Andreotti J.L., Canhadas L., Rogério M. (2015). Development and characterization of soy protein isolate emulsion-based edible films with added coconut oil for olive oil packaging: barrier, mechanical, and thermal properties. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1811-1823.

Casazza A.A., Aliakbarian B., De Faveri D., Fiori L., Perego P. (2012). Antioxidants from winemaking wastes: A study on extraction parameters using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 36(1), 28-37.

Cecchini J.P., Spotti M.J., Piagentini A.M., Milt V.G., Carraca C.R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Science and Technology International*, 23(4), 371-381.

Cerqueira M.A.P.R., Pereira R.N.C., da Silva Ramos O.L., Teixeira J.A.C., Vicente A.A. (2016). *Edible Food Packaging: Materials and Processing Technologies*, CRC Press.

Chan C.-H., See T.-Y., Yusoff R., Ngoh G.-C., Kow K.-W. (2017). Extraction of bioactives from *Orthosiphon stamineus* using microwave and ultrasound-assisted techniques: Process optimization and scale up. *Food Chemistry*, 221, 1382-1387.

Chandumpai A., Singhpibulporn N., Faroongsarng D., Sornprasit P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers*, 58, 467-474.

Chang C., Nickerson M.T. (2014). Effect of plasticizer type and genipin on the mechanical, optical, and water vapour barrier properties of canola protein isolate-based edible films. *European Food Research and Technology*, 238(1), 35-46.

Chang C., Nickerson M.T. (2015). Effect of protein and glycerol concentration on the mechanical, optical, and water vapour barrier properties of canola protein isolate-based edible films. *Food Science and Technology International*, 21(1), 33-44.

Chaussard G., Domand A. (2004). New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules*, 5, 559-564.

Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34, 540-560.

Chen B.J., Zhou Y.J., Wei X.Y., Xie H.J., Hider R.C., Zhou T. (2016). Edible antimicrobial coating incorporating a polymeric iron chelator and its application in the preservation of surimi product. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 1031-1039.

Chen F., Monnier X., Gällstedt M., Gedde U.W., Hedenqvist M.S. (2014). Wheat gluten/chitosan blends: a new biobased material. *European Polymer Journal*, 60, 186-197.

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 P., Zhang L. (2005). New evidences of glass transitions and microstructures of soy protein plasticized with glycerol. *Macromolecular Bioscience*, 5, 237-245.

Chen P., Zhang L., Cao F. (2005). Effects of moisture on glass transition and microstructure of glycerol-plasticized soy protein. *Macromolecular Bioscience*, 5, 872-880.

Cheng S.Y., Wang B.J., Weng Y.M. (2015). Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT- Food Science and Technology*, 63(1), 115-121.

Cheung H., Ho M., Lau K., Cardona F., Hui D. (2009). Natural fibre-reinforced composites for bioengineering and environmental engineering applications. *Composites Part B*, 40, 655-663.

Chinma C.E., Ariahu C.C., Abu J.O. (2012). Development and characterization of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 383-389.

Ciannamea E.M., Espinosa J.P., Stefani P.M., Ruseckaite R.A. (2017). Long-term stability of compression-molded soybean protein concentrate films stored under specific conditions. *Food Chemistry*, 243, 448-452.



Ciannamea E.M., Stefani P.M., Ruseckaite R.A. (2014). Physical and mechanical properties of compression moulded and solution casting soybean protein concentrate based films. *Food Hydrocolloids*, 38, 193-204.

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.

Cordeiro de Azeredo H.M. (2012). Edible coatings. In: Rodrigues S., Fernandes F.A.N. (eds.). *Advances in fruit processing technologies*. CRC Press Inc, USA, pp 345-361.

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.

Cortizo M.S., Berghoff C.F., Alessandrini J.L. (2008). Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen. *Carbohydrate Polymers*, 74, 10-15.

Coşkun B.K., Çalikoğlu E., Emiroğlu Z.K., Candoğan K. (2014). Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. *Journal of Food Quality*, 37(3), 203-212.

Coughlan K., Shaw N.B., Kerry J.F., Kerry J.P. (2004). Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Food Engineering and Physical Properties*, 69, 271-275.

Cuadri A.A., Bengoechea C., Romero A., Guerrero A. (2016). A natural-based polymeric hydrogel based on functionalized soy protein. *European Polymer Journal*, 95, 164-174.

Da Porto C., Natolino A. (2017). Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *Journal of Supercritical Fluids*, 130, 239-245.

da Silva B.G., Fileti A.M.F., Foglio M.A., Ruiz A.L.T.G, e Rosa P.d.T.V. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds from *Schinus terebinthifolius Raddi* fruits: Effects of operating conditions on global yield, volatile compounds, and antiproliferative activity against human tumor cell lines. *Journal of Supercritical Fluids*, 130, 10-16.

da Silva Haas I.C., Toaldo I.M., Burin V.M., Bordignon-Luiz M.T. (2018). Extraction optimization for polyphenolic profiling and bioactive enrichment of extractives of non-pomace residue from grape processing. *Industrial Crops and Products*, 112, 593-601.

da Silva R.P., Rocha-Santos T.A., Duarte A.C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC- Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.

Dahesh M., Banc A., Duri A., Morel M.H., Ramos L. (2016). Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent. *Food Hydrocolloids*, 52, 1-10.

Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.

Damodaran S. (2007). Amino acids, peptides and proteins. In: Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (eds.). *Fennema's food chemistry* (4<sup>th</sup> edition). CRC Press, USA, pp 219-323.

Darmanto Y.S. (2002). The effect of chitin and chitosan of crab shell on water sorption of isotherm and denaturation of myofibrils during dehydration process. *Journal of Coastal Development*, 5, 75-83.

Daso A.P., Okonkwo O.J. (2015). Chapter 3: Conventional extraction techniques: soxhlet and liquid-liquid extractions and evaporation. *Analytical Separation Science*, 1437-1468.

Day L. (2011) Wheat gluten: production, properties and applications. In: Phillips G.O., Williams P.A. (eds.). *Handbook of proteins*. Woodhead publishing, UK, pp 267-288.

de Aguiar A.C., Osorio-Tobón J.F., Silva L.P.S., Barbero G.F., Martínez J. (2018). Economic analysis of oleoresin production from malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 133, 86-93.

de Moraes Crizel T., de Oliveira Rios A., Alves V.D., Bandarra N., Moldão-Martins M., Hickmann Flôres S. (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, 74, 139-150.

de Moraes J.O., Scheibe A.S., Sereno A., Laurindo J.B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 800-808.

de Oliveira N.A., Cornelio-Santiago H.P., Fukumasu H., de Oliveira A.L. (2018). Green coffee extracts rich in diterpenes-Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 224, 148-155.

de Souza V.B., Thomazini M., Balieiro J.C.C., Fávoro-Trindade C.S. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered

pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). Food and Bioproducts Processing, 93, 39-50.

de Zordi N., Cortesi A., Kikic I., Moneghini M., Baldan V., Sut S., Solinas D., Dall'Acqua S. (2017). The Supercritical carbon dioxide extraction of  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 lipids and  $\beta$ -sitosterol from Italian walnuts: a central composite design approach. Journal of Supercritical Fluids, 127, 223-228.

del Pilar Sánchez-Camargo A., Pleite N., Herrero M., Cifuentes A., Ibáñez E., Gilbert-López B. (2017). New approaches for the selective extraction of bioactive compounds employing bio-based solvents and pressurized green processes. Journal of Supercritical Fluids, 128, 112-120.

Denavi G., Tapia-Blácido D.R., Añón M.C., Sobral P.J.A, Mauri A.N., Menegalli F.C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. Journal of Food Engineering, 90, 341-349.

Department of environment and regional planning of the Basque Government. (2008). Standards for urban solid waste management in the Basque Country. Ihobe, sociedad pública de gestión ambiental, Bilbao, Spain (in Spanish).

Derringer G., Suich R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, 12(4), 214-219.

Derringer G., Suich R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, 12(4), 214-219.

Devesa-Rey R., Vecino X., Varela-Alende J.L, Barral M.T, Cruz J.M., Moldes A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31, 2327-2335.

Di Lorenzo A., Bloise N., Meneghini S., Sureda A., Tenore G.C., Visai L., Arciola C.R., Daglia M. (2016). Effect of winemaking on the composition of red wine as a source of polyphenols for anti-infective biomaterials. *Materials*, 9(5), 316-335.

Díaz-Calderón P., Flores E., González-Muñoz A., Pepczynska M., Quero F., Enrione J. (2017). Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatin. *Food Hydrocolloids*, 71, 118-128.

Díaz-de-Cerio E., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Ferranti P., Nicoletti R., Perrotta G.M., Gómez-Caravaca A.M. (2018). Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3547-3557.

Dou Y., Zhang B., He M., Yin G., Cui Y. (2016). The structure, tensile properties and water resistance of hydrolyzed feather keratin-based bioplastics. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24, 415-420.

Drosou C., Kyriakopoulou K., Bimpilas A., Tsimogiannis D., Krokida M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products, Part B*, 75, 141-149.

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

Duval A., Molina-Boisseau S., Chirat C., Morel M.H. (2015). Dynamic mechanical analysis of the multiple glass transitions of plasticized wheat gluten biopolymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14), 43254-43265.

Echeverría I., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C., Mauri A.N., Montero M.P. (2016). Structure, functionality and active release of nanoclay-soy protein films affected by clove essential oil. *Food and Bioprocess Technology*, 9(11), 1937-1950.

Echeverría I., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C., Mauri A.N., Montero M.P. (2017). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite-clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.003.

El-Hefian E.A., Nasef M.M., Yahaya A.H. (2012). Preparation and characterization of chitosan/agar blended films: Part 2. Thermal, mechanical, and surface properties. *E-Journal of Chemistry*, 9, 510-516.

Emin M.A., Quevedo M., Wilhelm M., Karbstein H.P. (2017). Analysis of the reaction behavior of highly concentrated plant proteins in extrusion-like conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 44, 15-20.

Erşan S., Üstündağ Ö.G., Carle R., Schweiggert R.M.. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chemistry*, 253, 46-54.

Esquivel-Hernández D.A., Rodríguez-Rodríguez J., Rostro-Alanis M., Cuéllar-Bermúdez S.P., Mancera-Andrade E.I., Nuñez-Echeverría J., García-Pérez J.S., Chandra R., Parra-Saldivar R. (2017). Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira Platensis* and bioactivity evaluation. *Bioresources Technology*, 224, 618-629.

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

Etxabide A., Urdanpilleta M., Guerrero P, de la Caba K. (2015). Effect of cross-linking in nanostructure and physicochemical properties of fish gelatins for bio-applications. *Reactive and Functional Polymers*, 94, 55-62.

Falguera V., Quintero J.P., Jiménez A., Muñoz J.A., Ibarz A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 292-303.

Fang Y., Zhang B., Wei Y. (2014). Effects of the specific mechanical energy on the physicochemical properties of texturized soy protein during high-moisture extrusion cooking. *Journal of Food Engineering*, 121, 32-38.

Fernández-Espada L., Bengoechea C., Cordobés F., Guerrero A. (2016). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 43524-43534.

Feuereisen M.M., Barraza M.G., Zimmermann B.F., Schieber A., Schulze-Kaysers N. (2017). Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chemistry*, 214, 564-571.

Fiore V., Botta L., Scaffaro R., Valenza A., Pirrotta A. (2014). PLA based biocomposites reinforced with *Arundo donax* fillers. *Composites Science and Technology*, 105, 110-117.

Focher B., Naggi A., Torri G., Cosani A., Terbojevich M. (1992). Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions- evidence from CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 17(2), 97-102.

Francis F.J., Clydesdale F.M. (1975). *Food Colorimetry: Theory and Applications*. The AVI Publishing Company, Westport.

Freile-Pelegrín Y., Madera-Santana T., Robledo D., Veleza L., Quintana P., Azamar J.A. (2007). Degradation of agar films in humid tropical climate: Thermal, mechanical, morphological and structural changes. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 244-252.

Friesen K., Chang C., Nickerson M. (2015). Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chemistry*, 172, 18-23.

Galanakis C.M. (2015). *Food waste recovery: processing technologies and industrial techniques*, Academic Press.

Galus S., Lenart A., Voilley A., Debeaufort F. (2013). Effect of oxidized potato starch on the physicochemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Food Technology and Biotechnology*, 51(3), 403-409.

Galus S., Mathieu H., Lenart A., Debeaufort F. (2012). Effect of modified starch or maltodextrin incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity



and appearance of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 148-154.

Ganiari S., Choulitoudi E., Oreopoulou V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 70-82.

Garavand F., Rouhi M., Hadi Razavi S., Cacciotti I., Mohammadi R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 687-707.

García-Esparza M. J., Abrisqueta I., Escriche I., Intrigliolo D.S., Álvarez I., Lizama V. (2018). Volatile compounds and phenolic composition of skins and seeds of 'Cabernet Sauvignon' grapes under different deficit irrigation regimes. *Vitis*, 57, 83-91.

Garrido T., Etxabide A., Leceta I., Cabezudo S., de la Caba K., Guerrero P. (2014). Valorization of soya by-products for sustainable packaging. *Journal of Cleaner Production*, 64, 228-233.

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

Garrido T., Peñalba M., de la Caba K., Guerrero P. (2019). A more efficient process to develop protein films derived from agro-industrial by-products. *Food Hydrocolloids*, 86, 11-17.

Ghaani M., Cozzolino C.A., Castelli G., Farris S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 1-11.

Ghanbarzadeh B., Oromiehi A.R. (2008). Studies on glass transition temperature of mono and bilayer protein films plasticized by glycerol and olive oil. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(5), 2848-2854.

Ghidelli C., Mateos M., Rojas-Argudo C., Pérez-Gago M.B. (2014). Extending the shelf life of fresh-cut eggplant with a soy protein-cysteine based edible coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 95, 81-87.

Ghidelli C., Mateos M., Rojas-Argudo C., Pérez-Gago M.B. (2015). Novel approaches to control browning of fresh-cut artichoke: effect of soy protein-based coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 105-113.

Gizdavic-Nikolaidis M.R., Stanisavljev D.R., Easteal A.J., Zujovic Z.D. (2010). Microwave-assisted synthesis of functionalized polyaniline nanostructures with advanced antioxidant properties. *The Journal of Physical Chemistry, C*, 114, 18790-18796.

Goedkoop M., Spriensma R. (2001). *The ecoindicator 99: A damage oriented method for life cycle impact assessment*. Pré Consultants, Amersfoort.

Golmakani M.T., Moayyedi M. (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food Science and Nutrition*, 3(6), 506-518.

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 and Technology*, 35(1), 42-51.

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 and Technology*, 20(1), 3-16.

Gómez-Heincke D., Martínez I., Partal P., Guerrero A., Gallegos C. (2016). Development of antimicrobial active packaging materials based on gluten proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3432-3443.

González A., Igarzabal C.I.A. (2013). Soy protein-Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 289-296.

González A., Igarzabal C.I.A. (2015). Nanocrystal-reinforced soy protein films and their applications as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 777-784.

González-Estrada R.R., Chalier P., Ragazzo-Sánchez J.A., Konuk D., Calderón-Santoyo M. (2017). Antimicrobial soy protein based coatings: Application to Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) for protection and preservation. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 138-144.

Gorgani L., Mohammadi M., Najafpour G.D., Nikzad M. (2017). Sequential microwave-ultrasound-assisted extraction for isolation of piperine from black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 10(12), 2199-2207.

Granato D., Katayama F.C.U., de Castro I.A. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129(2), 366-373.

Granda H., de Pascual-Teresa S. (2018). Polyphenols interactions with other food components as a mean for their neurological health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02839.

Gu L., Wang M., Zhou J. (2013). Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein-gliadin composite films. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 288-298.

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, 53-59.

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, 261-269.

Guerrero P., Etxabide A., Leceta I., Peñalba M., de la Caba K. (2014). Extraction of agar from *Gelidium sesquipedale* (*Rodhopyta*) and surface characterization of agar based films. *Carbohydrate Polymers*, 99, 491-498.

Guerrero P., Garrido T., Leceta I., de la Caba K. (2013). Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical-chemical characterization. *European Polymer Journal*, 49, 3713-3721.

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., Nur Hanani Z.A., Kerry J.P., de la Caba K. (2011). Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. *Journal of Food Engineering*, 107, 41-49.

Guerrero P., O'Sullivan M.G., Kerry J.P., de la Caba K. (2015). Application of soy protein coatings and their effect on the quality and shelf life stability of beef patties. *RSC Advances*, 5(11), 8182-8189.

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

Gullón B., Gullón P., Lú-Chau T.A., Moreira M.T., Lema J.M., Eibes G. (2017). Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 108, 649-659.

Gupta P., Nayak K.K. (2015). Characteristics of protein-based biopolymers and its applications. *Polymer Engineering and Science*, 55(3), 485-498.

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

Han J., Shin S.H., Park K.M., Kim K.M. (2015). Characterization of physical, mechanical and antioxidant properties of soy protein-based bioplastics films containing carboxymethylcellulose and catechin. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 939-945.

- 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.
- Harper J.M. (1989). Food extruders and their applications. In: Mercier C., Linko P., Harper J.M. *Extrusion Cooking*. American Association of Cereal Chemists, Minnesota.
- Hernandez-Izquierdo V.M., Krochta J.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation: A review. *Journal of Food Science*, 73(2), 30-39.
- Herrero M., del Pilar Sanchez-Camargo A., Cifuentes A., Ibanez E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26-38.
- Hill P., Brantley H., Van Dyke M. (2010). Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. *Biomaterials*, 31, 585-593.
- Ho K., Ferruzzi M., Liceaga A., San Martín-González M. (2015). Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *LWT- Food Science and Technology*, 62(1), 160-168.
- Hopkins E.J., Chang C., Lam R.S.H., Nickerson M.T. (2015). Effect of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolated-based emulsion type film. *Food Research International*, 67, 418-425.
- Hu L., Hsieh F., Huff H.E. (1993). Corn meal extrusion with emulsifier and soybean fiber. *Food Science and Technology*, 26, 544-55.

Ianiro A., Di Giosia M., Fermani S., Samori C., Barbalinardo M., Valle F., Pellegrini G., Biscarini F., Zerbetto F., Calvaresi M., Falini G. (2014). Customizing properties of  $\beta$ -Chitin in squid pen (*Gladius*) by chemical treatments. *Marine drugs*, 12, 5979-5992.

Ince A.E., Sahin S., Sumnu G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2776-2782.

Insaward A., Duangmal K., Mahawanich T. (2015). Mechanical, optical and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9421-9426.

Irkin R., Esmer O.K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6095-6111.

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

Ivanova V., Stefova M., Vojnoski B., Dörnyei Á., Márk L., Dimovska V., Stafilov T., Kilár F. (2011b). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, 44(9), 2851-2860.

Ivanova V., Vojnoski B., Stefova M. (2011a). Effect of the winemaking practices and aging on phenolic content of Smederevka and Chardonnay wines. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1512-1518.

Jakobsen M., Jespersen L., Juncher D., Becker E.M., Risbo J. (2005). Oxygen- and light-barrier properties of thermoformed packaging materials used for modified atmosphere

packaging. Evaluation of performance under realistic storage conditions. *Packaging Technology and Science*, 18, 265-272.

Jang M.-K., Kong B.-G., Jeong Y.-I., Lee C.H., Nah J.-W. (2004). Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 42, 3423-3432.

Jansens K.J.A., Vo Hong N., Telen L., Brijs K., Lagrain B., Van Vuure A.W., Van Acker K., Verpoest I., Van Puyvelde P., Goderis B., Smet M., Delcour J.A. (2013). Effect of molding conditions and moisture content on the mechanical properties of compression molded glassy, wheat gluten bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 44, 480-487.

Jerez A., Partal P., Martinez I., Gallego C., Guerrero A. (2007). Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing. *Rheological Acta*, 46, 711-720.

Jeyaratnam N., Nour A.H., Kanthasamy R., Nour A.H., Yuvaraj A., Akindoyo J.O. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 92, 57-66.

Ji Y., Chen J., Lv J., Li Z., Xing L., Ding S. (2014). Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather. *Separation and Purification Technology*, 132, 577-583.

Jiang P., Liu H.F., Zhao X.H., Ding Q. (2017). Physicochemical properties of soybean protein isolate affected by the cross-linking with horseradish peroxidase, glucose oxidase and glucose. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1196-1202.

Jindal M., Kumar V., Rana V., Tiwary A.K. (2013). Physico-chemical, mechanical and electrical performance of bael fruit gum-chitosan IPN films. *Food Hydrocolloids*, 30, 192-199.



Jung J., Zhao Y. (2014). Alkali- or acid-induced changes in structure, moisture absorption ability and deacetylating reaction of  $\beta$ -chitin extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Food Chemistry*, 152, 355-362.

Junqueira-Gonçalves M.P., Salinas G.E., Bruna J.E., Niranjana K. (2017). An assessment of lactobiopolymer-montmorillonite composites for dip coating applications on fresh strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1846-1853.

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.

Kalman D.S. (2014). Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. *Foods*, 3(3), 394-402.

Kang H.J., Kim S.J., You Y.S., Lacroix M., Han J. (2013). Inhibitory effect of soy protein coating formulations on walnut (*Juglans regia* L.) kernels against lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 393-396.

Karbowiak T., Debeaufort F., Champion D., Voilley A. (2006). Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 294, 400-410.

Kashiri M., Cerisuelo J.P., Domínguez I., López-Carballo G., Muriel-Gallet V., Gavara R., Hernández-Muñoz P. (2017a). Zein films and coatings as carriers and release systems of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging. *Food Hydrocolloids*, 70, 260-268.

Kashiri M., Maghsoudlo Y., Khomeiri M. (2017b). Incorporating *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and sodium bentonite nano-clay open a new perspective to use zein films as bioactive packaging materials. *Food Science and Technology International*, 23(7), 582-596.

Kerton F.M., Marriot R. (2013). Green solvents-Legislation and certification, in: Kerton F.M., Marriot R. (eds.). *Alternative Solvents for Green Chemistry*. RSC Publishing, 20, pp 31-50.

Kessel A., Ben-Tal N. (2010). *Introduction to proteins: structure, function and motion*. CRS Press, USA.

Khalil A.A., Deraz S.F., Elrahman S.A., El-Fawal G. (2015). Enhancement of mechanical properties, microstructure, and antimicrobial activities of zein films cross-linked using succinic anhydride, eugenol, and citric acid. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(6), 551-567.

Khuwijitjaru P., Suaylam B., Adachi S. (2014). Degradation of caffeic acid in subcritical water and online HPLC-DPPH assay of degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1945-1949.

Kible-Boeckler G. (1996). Measuring gloss and reflection properties of surfaces. *TAPPI Journal*, 79, 194-198.

Koch L., Emin M.A., Schuchmann H.P. (2017). Influence of processing conditions on the formation of whey protein-citrus pectin conjugates in extrusion. *Journal of Food Engineering*, 193, 1-9.

Koshy R.R., Mary S.K., Pothan L.A., Thomas S. (2015). Soy protein-and starch-based green composites/nanocomposites: Preparation, properties, and applications. In: Thakur V.K., Thakur M.K. (ed.). *Eco-friendly polymer nanocomposites*. Springer, India, 75, 433-467.

Kovačević D.B., Barba F.J., Granato D., Galanakis C.M., Herceg Z., Dragović-Uzelac V., Putnik P. (2018). Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 254, 150-157.

Kowalczyk D., Gustaw W., Zieba E., Lisiecki S., Stadnik J., Baraniak B. (2016). Microstructure and functional properties of sorbitol-plasticized pea protein isolate emulsion films: Effect of lipid type and concentration. *Food Hydrocolloids*, 60, 353-363.

Kumar M.N.V.R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymer*, 46, 1-27.

Kumar R., Choundhary V., Mishra S., Varma I.K., Mattiason Bo. (2002). Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16, 155-172.

Kumari M., Mahajan H., Joshi R., Gupta M. (2017). Development and structural characterization of edible films for improving fruit quality. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 42-50.

Kurita K. (2001). Controlled functionalisation of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1971.

Kusuma H.S., Altway A., Mahfud M. (2018). Solvent-free microwave extraction of essential oil from dried patchouli (*Pogostemon cablin Benth*) leaves. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 58, 343-348.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lassoued I., Jridi M., Nasri R., Dammak A., Hajji M., Nasri M., Barkia A. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 41, 309-318.

Lau H.H., Murney R., Yakovlev N.L., Noselova 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.

Lavall R.L., Assis O.B., Campana-Filho S.P. (2007).  $\beta$ -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: Extraction and characterization. *Bioresource Technology*, 98, 2465-2472.

Leceta I., Guerrero P., Cabezudo S., de la Caba K. (2013). Environmental assessment of chitosan-based films. *Journal of Cleaner Production*, 41, 312-318.

Lee J.E., Kim K.M. (2010). Characteristics of soy protein isolate-montmorillonite composite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 118, 2257-2263.

Leyva-Jiménez F.J., Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. (2018). Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction

for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves. *Food Research International*, 109, 213-222.

Li H., Liu, B.L., Gao L.Z., Chen H.L. (2004). Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry*, 84, 65-69.

Li Y., Chen F., Zhan L., Yao Y. (2015). Effect of surface changes of soy protein materials on water resistance. *Material Letters*, 149, 120-122.

Liew S.Q., Ngoh G.C., Yusoff R., Teoh W.H. (2016). Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 426-435.

Lin D., Zhao Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60-75.

Liu C., Wang H., Cui Z., He X., Wang X., Zeng X., Ma H. (2007). Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. *Food Chemistry*, 102, 1310-1316.

Liu F., Chiou B., Avena-Bustillos R.J., Zhang Y., Li Y., McHugh T.H., Zhong F. (2017a). Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 65, 1-9.

Liu F., Chiou B., Avena-Bustillos R.J., Zhang Y., Li Y., McHugh T.H., Zhong F. (2017a). Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 65, 1-9.

Liu F., Majeed H., Antoniou J., Li Y., Ma Y., Yokoyama W., Ma J., Zhong F. (2016). Tailoring physical properties of transglutaminase-modified gelatin films by varying drying temperature. *Food Hydrocolloids*, 58, 20-28.

Liu H., Li J., Zhu D., Wang Y., Zhao Y., Li J. (2014). Preparation of soy protein isolate (SPI)-pectin complex film containing cinnamon oil and its effects on microbial growth of dehydrated soybean curd (dry tofu). *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1371-1376.

Liu H., Zhang L. (2006). Structure and properties of soy protein plastics plasticized with acetamide. *Macromolecular Materials and Engineering*, 91, 509-515.

Liu Y., Zhang H., Xu L., Chi Y., Wu Y., Cao W., Li T. (2017b). Properties of soy protein isolate antimicrobial films and its application in preservation of meat. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(8), 589-600.

Llobera A., Cañellas J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry*, 101(2), 659-666.

Lodha P., Netravali A.N. (2005). Thermal and mechanical properties of environment friendly 'green' plastics from stearic acid modified-soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 21, 49-64.

Lončarić A., Lamas J.P., Guerra E., Kopjar M., Lores M. (2018). Thermal stability of catechin and epicatechin upon disaccharides addition. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 1195-1202.

López-Simeon R., Campos-Terán J., Beltrán H.I., Hernández-Guerrero M. (2012). Free-lignin cellulose obtained from agar industry residues using a continuous and minimal solvent reaction/extraction methodology. *RSC Advances*, 2, 12286-12297.

Lores M., Pájaro M., Álvarez-Casas M., Domínguez J., García-Jares C. (2015). Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta*, 140, 134-142.

Lu X., Zheng Z., Li H., Cao R., Zheng Y., Yu H., Xiao J., Miao S., Zheng B. (2017) Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of oligosaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) seeds. *Industrial Crops and Products*, 107, 546-557.

Lu P., Hsieh Y-L. (2012). Cellulose isolation and core-shell nanostructures of cellulose nanocrystals from chardonnay grape skins. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2546-2553.

Luchese C.L., Garrido T., Spada J.C., Tessaro I.C., de la Caba K. (2018). Development and characterization of cassava starch films incorporated with blueberry pomace. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 834-839.

Luo X., Cui J., Zhang H., Duan Y. (2018a). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities. *Food Chemistry*, 262, 14-20.

Luo X., Cui J., Zhang H., Duan Y., Zhang D., Cai M., Chen G. (2018b). Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112, 296-304.

Ma L., Zhang M., Bhandari B., Gao Z. (2017). Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 23-38.

Ma Q., Wang L. (2016). Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. *Sensors and Actuators, B*, 235, 401-407.

Ma W., Tang C.H., Yang X.Q., Yin S.W. (2013). Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate-chitosan composite films at acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 31, 237-247.

Machado A.P.D.F., Pasquel-Reátegui J.L., Barbero G.F., Martínez J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675-683.

Machado A.P.D.F., Pereira A.L.D., Barbero G.F., Martínez J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1-10.

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*, 60, 176-184.

Majtán J., Bíliková K., Markovič O., Gróf J., Kogan G., Šimúth J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 237-241.



Maniglia B., Domingos J., De Paula R., Tapia-Blácido D. (2014). Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. *LWT- Food Science and Technology*, 56(2), 269-277.

Martínez I., Partal P., García-Morales M., Guerrero A., Gallegos C. (2013). Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 247-254.

Massani M.B., Botana A., Eisenberg P., Vignolo G. (2014). Development of an active wheat gluten film with *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins and a study of its antimicrobial performance during ageing. *Food Additives and Contaminants, Part A* 31(1), 164-171.

Mathew A.P., Dufresne A. (2002). Plasticized Waxy Maize Starch: Effect of polyols and relative humidity on material properties. *Biomacromolecules*, 3, 1101-1108.

Mazzutti S., Rodrigues L.G.G., Mezzomo N., Venturi V., Ferreira S.R.S. (2018). Integrated green-based processes using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 52-59.

Mehyar G.F., El Assi N.M., Alsmairat N.G., Holley R.A. (2014). Effect of edible coatings on fruit maturity and fungal growth on Berhi dates. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(11), 2409-2417.

Meinlschmidt P., Sussmann D., Schweiggert-Weisz U., Eisner P. (2015). Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofuncionality and sensory properties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 11-23.

Mo X., Sun X. (2002). Plasticization of soy protein polymer by polyol-based plasticizers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 197-202.

Mojumdar S.C., Moresoli C., Simon L.C., Legge R.L. (2011). Edible wheat gluten protein films: Preparation, thermal, mechanical and spectral properties. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104(3), 929-936.

Molinaro S., Cruz-Romero M., Sensidoni A., Morris M., Lagazio C., Kerry J.P. (2015). Combination of high-pressure treatment, mild heating and holding time effects as a means of improving the barrier properties of gelatin-based packaging films using response surface modeling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 30, 15-23.

Monedero F.M., Fabra M.J., Talens P., Chiralt A. (2009). Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91, 509-515.

Monteiro A., Paquincha D., Martins F., Queirós R.P., Saraiva J.A., Švarc-Gajić J., Nastić N., Delerue-Matos C., Carvalho A.P. (2018). Liquid by-products from fish canning industry as sustainable sources of  $\omega$ 3 lipids. *Journal of Environmental Management*, 219, 9-17.

Moore G.P.R, Martelli S.M., Gandolfo C., Sobral P.J.A., Laurindo J.B. (2006). Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids*, 20, 975-982.

Moradi M., Tajik H., Rohani S.M.R., Mahmoudian A. (2016). Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT- Food Science and Technology*, 72, 37-43.

Moreira M.M., Barroso M.F., Boeykens A., Withouck H., Morais S., Delerue-Matos C. (2017). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210-220.

Moreira M.M., Barroso M.F., Porto J.V., Ramalhosa M.J., Švarc-Gajić J., Estevinho L., Morais S., Delerue-Matos C. (2018). Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, 634, 831-842.

Muhamad I.I., Hassan N.D., Mamat S.N.H., Nawi N.M., Rashid W.A., Tan N.A. (2017). Extraction technologies and solvents of phytochemicals from plant materials: physicochemical characterization and identification of ingredients and bioactive compounds from plant extract using various instrumentations. In: Grumezescu A.M., Holban A.M. (eds.). *Handbook of food bioengineering*. Academic Press, pp 523-560.

Muhamad I.I., Hassan N.D., Mamat S.N.H., Nawi N.M., Rashid W.A., Tan N.A. (2017). Extraction technologies and solvents of phytochemicals from plant materials: physicochemical characterization and identification of ingredients and bioactive compounds from plant extract using various instrumentations. In: Grumezescu A.M., Holban A.M. (eds.). *Handbook of food bioengineering*. Academic Press, pp 523-560.

Murano E., Toffanin R., Zanetti F., Knutsen S. H., Paoletti S., Rizzo R. (1992). Chemical and macromolecular characterization of agar polymers from *Gracilaria dura* (*C. agardhii*) *J. Agardhii* (*Gracilariaceae, Rhodophyta*). *Carbohydrate Polymers*, 18, 171-178.

Nata I.F., Wang S.S., Wu T., Lee C. (2012). Chitin nanofibrils for self-sustaining hydrogels preparation via hydrothermal treatment. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1509-1514.

Nawab A., Alam F., Haq M.A., Lutfi Z., Hasnain A. (2017). Mango kernel starch-gum composite films: Physical, mechanical and barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 869-876.

Nayak A., Bhushan B., Rosales A., Turienzo L.R., Cortina J.L. (2018). Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 74-85.

Nayak B., Dahmoune F., Moussi K., Remini H., Dairi S., Aoun O., Khodir M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry*, 187, 507-516.

Niaounakis M. (2015). *Biopolymers: Applications and trends*, William Andrew.

Nogales-Bueno J., Baca-Bocanegra B., Rooney A., Hernández-Hierro J. M., Byrne H. J., Heredia F.J. (2017). Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 232, 602-609.

Noishiki Y., Takami H., Nishiyama Y., Wada M., Okada S., Kuga S. (2003). Inclusion Complex of  $\beta$ -Chitin and Aliphatic Amines. *Biomacromolecules*, 4, 896-899.

Norrahim M.N.F., Ariffin H., Hassan M.A., Ibrahim N.A., Nishida H. (2013). Performance evaluation and chemical recyclability of a polyethylene(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blend for sustainable packaging. *RSC Advance*, 3, 24378-24388.

Nur Hanani Z.A., Beatty E., Roos Y.H., Morris M.A., Kerry J.P. (2012). Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. *Journal of Food Engineering*, 113, 606-614.

Nur Hanani Z.A., McNamara J., Roos Y.H., Kerry J.P. (2013). Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 264-269.

Ogale A.A., Cunningham P., Dawson P.L., Acton J.C. (2000). Viscoelastic, thermal, and microstructural characterization of soy protein isolate films. *Food Science*, 65, 672-679.

Olejar K.J., Ray S., Kilmartin P.A. (2017). Utilisation of agro-waste extract in thermoplastics. *International Journal of Nanotechnology*, 14(1-6), 304-312.

Olejar K. J., Ray S., Ricci A., Kilmartin P.A. (2014). Superior antioxidant polymer films created through the incorporation of grape tannins in ethyl cellulose. *Cellulose*. 21, 4545-4556.

Olejar K.J., Vandermeer C., Kilmartin P.A. (2016). Grape tannins: Structure, antioxidant and antimicrobial activity. In: Combs, C.A. (ed.). *Tannins. Biochemistry, food sources and nutritional properties*. Nova Science Publishers, New York, pp 59-85.

Olivas G.I., Mattinson D.S., Barbosa-Cánovas G.V. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed 'Gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 89-96.

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.

Otero P., Quintana S.E., Reglero G., Fornari T., García-Risco M.R. (2018). Pressurized Liquid Extraction (PLE) as an innovative green technology for the effective enrichment of galician algae extracts with high quality fatty acids and antimicrobial and antioxidant properties. *Marine Drugs*, 16(5), 156-170.

Otoni C.G., Avena-Bustillos J., Azeredo H.M.C., Lorevide M.V., Moura M.R., Mattoso L.H.C., McHugh T.H. (2017). Recent advances on edible films based on fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151-1169.

Otoni C.G., Avena-Bustillos R.J., Olsen C.W., Bilbao-Sainz C., McHugh T.H. (2016). Mechanical and water barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 57, 72-79.

Ozcalik O., Tihminlioglu F. (2013). Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 505-513.

Pan H., Jiang B., Chen J., Jin Z. (2014). Blend-modification of soy protein/lauric acid edible films using polysaccharides. *Food Chemistry*, 151, 1-6.

Park H.J., Byun Y.J., Kim Y.T., Whiteside W.S., Bae H.J. (2014). Processes and applications for edible coating and film materials from agropolymers. In: Han J.H. (ed.). *Innovation in food packaging*. Academic Press, UK, pp 257-275.

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.

Pena-Pereira F., Tobiszewski M. (2017). The application of green solvents in separation processes, Elsevier.

Pena-Serna C., Penna A.L.B., Lopes Filho J.F. (2016). Zein-based blend coating: Impact on the quality of a model cheese of short ripening period. *Journal of Food Engineering*, 171, 208-213.

Périno S., Pierson J.T., Ruiz K., Cravotto G., Chemat F. (2016). Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. *Food Chemistry*, 204, 108-114.

Phan The D., Debeaufort F., Voilley A., Luu D. (2009). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.

Pinheiro J.C., Alegria C.S., Abreu M.M., Gonçalves E.M., Silva C.L. (2016). Evaluation of alternative preservation treatments (water heat treatment, ultrasounds, thermosonication and UV-c radiation) to improve safety and quality of whole tomato. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 924-935.

Pommet M., Redl A., Guilbert S., Morel M.H. (2005). Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 81-91.

Pongmalai P., Devahastin S., Chiewchan N., Soponronnarit S. (2015). Enhancement of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from cabbage outer leaves via the application of ultrasonic pretreatment. *Separation and Purification Technology*, 144, 37-45.

Preece K.E., Hooshyar N., Zuidam N.J. (2017). Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43, 163-172.

Prietto L., Mirapalhete T.C., Pinto V.Z., Hoffmann J.F., Vanier N.L., Lim L.T., Dias A.R.G., da Rosa Zavareze E. (2017). pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. *LWT- Food Science and Technology*, 80, 492-500.

Pudziuelyte L., Jakštas V., Ivanauskas L., Laukevičienė A., Ibe C.F.D, Kursvietiene L., Bernatoniene J. (2018). Different extraction methods for phenolic and volatile compounds recovery from *Elsholtzia ciliata* fresh and dried herbal materials. *Industrial Crops and Products*, 120, 286-294.

Qazanfarzadeh Z., Kadivar M. (2016). Properties of whey protein isolate nanocomposite films reinforced with nanocellulose isolated from oat husk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1134-1140.

Qu P., Huang H., Wu G., Sun E., Chang Z. (2015). Effects of hydrolysis degree of soy protein isolate on the structure and performance of hydrolyzed soy protein isolate/urea/formaldehyde copolymer resin. *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41469-41477.

Ragusa A., Centonze C., Grasso M.E., Latronico M.F., Mastrangelo P.F., Sparascio F., Fanizzi F.P., Maffia M. (2017). A comparative study of phenols in Apulian Italian Wines. *Food*. 6(4), 24-34.

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.



Rasines-Perea Z., Teissedre P.-L. (2017). Grape polyphenols' effects in human cardiovascular diseases and diabetes. *Molecules*, 22(1), 68-87.

Reddy N. (2015). Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Management*, 45, 91-107.

Ren H.M., Cai C., Leng C.B., Pang S.F., Zhang Y.H. (2016). Nucleation kinetics in mixed NaNO<sub>3</sub>/glycerol droplets investigated with the FTIR-ATR technique. *Journal of Physical Chemistry B*, 120, 2913-2920.

Rezaei M., Motamedzadegan A. (2015). The effect of plasticizers on mechanical properties and water vapor permeability of gelatin-based edible films containing clay nanoparticles. *World Journal of Nanoscience and Engineering*, 5(04), 178-193.

Rhim J.W., Mohanty K.A., Singh S.P., Ng P.K.W. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly(lactide). *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45, 3059-3066.

Rhim J.W., Wang L.F., Hong S.I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33, 327-335.

Rocha C.M.R., Souza H.K.S., Magalhães N.F., Andrade C.T., Gonçalves M.P. (2014). Rheological and structural characterization of agar/whey proteins insoluble complexes. *Carbohydrate Polymers*, 110, 345-353.

Rodrigues I.M., Coelho J.F.J., Carvalho M.G.V.S. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 337-346.

Rombouts I., Lamberts L., Celus I., Lagrain B., Brijis K., Delcour J.A. (2009). Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(29), 5557-5562.

Ruiz-Aceituno L., García-Sarrió M.J., Alonso-Rodríguez B., Ramos L., Sanz M.L. (2016). Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 196, 1156-1162.

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

Saberi B., Vuong Q.V., Chockchaisawasdee S., Golding J.B., Scarlett C.J., Stathopoulos C.E. (2017). Physical, barrier and antioxidant properties of pea starch-guar gum biocomposite edible films by incorporation of natural plant extracts. *Food and Bioprocess Technology*, 10(12), 2240-2250.

Saha S., Kurade M.B., El-Dalatony M.M., Chatterjee P.K., Lee D.S., Jeon B.H. (2016). Improving bioavailability of fruit wastes using organic acid: An exploratory study of biomass pretreatment for fermentation. *Energy Conversion and Management*, 127, 256-264.

Sahraee S., Milani J.M., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar H. (2017). Effect of corn oil on physical, thermal, and antifungal properties of gelatin-based nanocomposite films containing nano chitin. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 33-39.

Salacha M.I., Kallithraka S., Tzourou I. (2008). Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1073-1077.

Salazar M., Costa J.V., Urbina G.R.O., Cunha V.M.B., Silva M., do Nascimento Bezerra P., Pinheiro W., Gomes-Leal W., Lopes A.S., Junior R.C. (2018). Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 138, 36-45.

Samsalee N., Sothornvit R. (2017). Modification and characterization of porcine plasma protein with natural agents as potential cross-linkers. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 964-971.

Sánchez-Camargo A., Mendiola J., Valdés A., Castro-Puyana M., García-Cañas V., Cifuentes A., Herrero M., Ibáñez E. (2016). Supercritical antisolvent fractionation of rosemary extracts obtained by pressurized liquid extraction to enhance their antiproliferative activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 581-589.

Sandoval-Ventura O., Olguin-Contreras L.F., Cañizares-Macias M.P. (2017). Total polyphenols content in white wines on a microfluidic flow injection analyzer with embedded optical fibers. *Food Chemistry*, 221, 1062-1068.

Santos Ê.R., Oliveira H.N., Oliveira E.J., Azevedo S.H., Jesus A.A., Medeiros A.M., Dariva C., Sousa E.M. (2017). Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *Journal of Supercritical Fluids*, 122, 1-9.

Santos T.M., Souza Filho M.D.S.M., Muniz C.R., Morais J.P.S., Kotzebue L.R.V., Pereira A.L.S., Azeredo H.M.C. (2017). Zein films with unoxidized or oxidized tannic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4580-4587.

Sardella F., Gimenez M., Navas C., Morandi C., Deiana C., Sapang K. (2015). Conversion of viticultural industry wastes into activated carbons for removal of lead and cadmium. *Journal of Environmental Chemistry Engineering*, 3(1), 253-260.

Schaefer J., Kramer K.J., Garbow J.R., Jacob G.S., Stejskal E.O., Hopkins T.L., Speirs R.D. (1987). Aromatic cross-links in insects cuticle: Detection by solid-state  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR. *Science*, 235, 1200-1204.

Schmid M., Krimmel B., Grupa U., Noller K. (2014). Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based films. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5315-5327.

Schmidt V., Giacomelli C., Soldi V. (2005). Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. *Polymer Degradation and Stability*, 87, 25-31.

Setyaningsih W., Saputro I., Palma M., Barroso C. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169, 141-149.

Sharma K., Jain R., Bhargava N., Sharma R., Sharma K.S. (2010). Dielectric studies of wheat in powder form at microwave frequencies. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, 1002-1007.

Sharma L., Singh C. (2016). Sesame protein based edible films: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 61, 139-147.

Sharma N., Khatkar B.S., Kaushik R., Sharma P., Sharma R. (2017). Isolation and development of wheat based gluten edible film and its physicochemical properties. *International Food Research Journal*, 24(1), 94-101.

Shirsath S., Sable S., Gaikwad S., Sonawane S., Saini D., Gogate P. (2017). Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonic Sonochemistry*, 38, 437-445.

Shukla R., Cheryan M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13(3), 171-192.

Siró I., Plackett D., Sommer-Larsen P. (2010). A comparative study of oxygen transmission rates through polymer films base on fluorescence quenching. *Packaging Technology and Science*, 23, 301-315

Smiderle F.R., Morales D., Gil-Ramírez A., de Jesus L.I., Gilbert-López B., Iacomini M., Soler-Rivas C. (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain  $\beta$ -d-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers*, 156, 165-174.

Snyder Y., Strauss H.L., Ellinger C.A. (1982). Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 1. Long, disordered chains. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 5145-5150.

Socaci S.A., Rugină D.O., Diaconeasa Z.M., Pop O.L., Fărcaș A.C., Păucean A., Tofană M., Pinteia A. (2017). Antioxidant compounds recovered from food wastes. In: Chavarri M. (ed). *Functional food-improve health through adequate food*, DOI: 10.5772/intechopen.69124.

Song C.L., Zhao X.H. (2014). Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 16, 114-119.

Song Y., Zheng Q. (2014). Ecomaterials based on food proteins and polysaccharides. *Polymer Reviews*, 54, 514-571.

Sousa-Gallagher M.J., Tank A., Sousa R. (2016). Emerging technologies to extend the shelf life and stability. In: Subramaniam P., Wareing P. (eds). *The stability and shelf life of food*. Woodhead Publishing, UK, pp 399-424.

Spigno G., Marinoni L., Garrido G.D. (2017). State of the art in grape processing by-products. In: Galanakis C.M. (ed.). *Handbook of grape processing by-products: Sustainable solutions*, Academic Press, pp 1-28.

Su J.F., Huang Z., Yang C.M., Yuan X.Y. (2008). Properties of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol) blend "green" films: compatibility, mechanical properties, and thermal stability. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 3706-3716.

Su J.F., Huang Z., Yang C.M., Yuan X.Y. (2008). Properties of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol) blend "green" films: compatibility, mechanical properties, and thermal stability. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 3706-3716.

Su J.F., Yuan X.Y., Huang Z., Wang X.Y., Lu X.Z., Zhang L.D., Wang S.B. (2012). Physicochemical properties of soy protein isolate/carboxymethyl cellulose blend films crosslinked by Maillard reactions: Color, transparency and heat-sealing ability. *Materials Science and Engineering Part C*, 32, 40-46.

Sui C., Zhang W., Ye F., Liu X., Yu G. (2016). Preparation, physical and mechanical properties of soy protein isolate/guar gum composite films prepared by solution casting. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(18), 43375-43381.

Sumere B.R., de Souza M.C., dos Santos M.P., Bezerra R.M.N., da Cunha D.T., Martinez J., Rostagno M.A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*). *Ultrasonic Sonochemistry*, 48, 151-162.

Tanada-Palmu P., Helén H., Hyvönen L. (2000). Preparation, properties and applications of wheat gluten edible films. *Agricultural and Food Science*, 9, 23-35.

Tanase C.E., Spiridon, I. (2014). PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 242-247.

Tansaz S., Boccaccini A.R. (2016). Biomedical applications of soy protein: A brief overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104, 553-569.

TAPPI 211 om-02. (2002). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: Combustion at 525 °C. In: *TAPPI Standard methods*. Atlanta, Tappi press.

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

Thammahiwes S., Riyajan S.A., Kaewtatip K. (2017). Preparation and properties of wheat gluten based bioplastics with fish scale. *Journal of Cereal Science*, 75, 186-191.

Tian H., Wu W., Guo G., Gaolum B., Jia Q., Xiang A. (2012). Microstructure and properties of glycerol plasticized soy protein plastics containing castor oil. *Journal of Food Engineering* 109, 496-500.

Tian H., Xu G., Yang B., Guo G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, 107, 21-26.

Tian H., Xu G., Yang B., Guo G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, 107, 21-26.

Tian H., Xu G., Yang B., Guo G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, 107, 21-26

Timilsena Y.P., Adhikari R., Barrow C.J., Adhikari B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.

Tirado D.F., Tenorio M.J., Cabañas A., Calvo L. (2018). Prediction of the best cosolvents to solubilise fatty acids in supercritical CO<sub>2</sub> using the Hansen solubility theory. *Chemical Engineering Science*, 190, 14-20.

Tiwari B.K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC- Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Toaldo I.M., Fogolari O., Pimentel G. C., de Gois J.S., Borges D.L.G., Caliar V., Bordignon-Luiz M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and



elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. LWT-Food Science and Technology, 53(1), 1-8.

Tongnuanchan P., Benjakul S., Prodpran T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. Food Chemistry, 134(3), 1571-1579.

Tongnuanchan P., Benjakul S., Prodpran T., Pisuchpen S., Kazufumi O. (2016). Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. Food Hydrocolloids, 56, 93-107.

Tournour H.H., Segundo M.A., Magalhães L.M., Barreiros L., Queiroz J., Cunha L.M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. Industrial Crops and Products, 74, 397-406.

Trezza T.A., Krochta J.M. (2000). The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. Journal of Food Science, 65, 658-662.

Tsuda Y., Nomura Y. (2014). Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. Animal Science Journal, 85, 180-185.

Türe H., Gällstedt M., Hedenqvist M.S. (2012). Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. Food Research International, 45(1), 109-115.

Ünalán I.U., Arcan I., Korel F., Yemenicioğlu A. (2013). Application of active zein-based films with controlled release properties to control *Listeria monocytogenes* growth and lipid oxidation in fresh Kashar cheese. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 20, 208-214.

USDA, 2018. United States Department of Agriculture. World agricultural production Available at: <https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>. Accessed 26 November 2018.

Usov A.I., Ivaniva E.G., Shashkov A.S. (1983). Polysaccharides of algae XXXIII: Isolation and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral study of some new gel forming polysaccharides from japan sea red seaweeds. *Botanica Marina*, 26, 285-294.

Ustunol Z. (2009). Edible films and coatings for meat and poultry. In: Huber K.C., Embuscado M.E. (eds.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, USA, pp 245-268.

Vajic U.J., Grujic-Milanovic J., Zivkovic J., Savikin K., Godevac D., Miloradovic Z., Bugarski B., Mihailovic-Stanojevic N. (2015). Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, 912-917.

Valdés A., Vidal L., Beltran A., Canals A., Garrigós M.C. (2015). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from almond skin byproducts (*prunus amygdalus*): A multivariate analysis approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5395-5402.

Vardanega R., Carvalho P.I., Santos D.T., Meireles M.A.A. (2017). Obtaining prebiotic carbohydrates and beta-ecdysone from Brazilian ginseng by subcritical water extraction, *Innov. Food Science and Emerging Technologies*, 42, 73-82.

Verbeek C.J.R., van den Berg L.E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(1), 10-21.

- Viganó J., Zobot G.L., Martínez J. (2017). Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 122, 88-98.
- Vignon M.R., Rochas C., Vuong R., Tekely P., Chanzy H. (1994). *Gelidium sesquipedale* (*Gelidiales, Rhodophyta*) II. An ultrastructural and morphological study. *Botanica Marina*, 37, 331-340.
- Villalobos R., Chanona J., Hernández P., Gutiérrez G., Chiralt A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
- Visakh P.M., Nazarenko O. (eds.). (2017). *Soy Protein-Based Blends, Composites and Nanocomposites*. John Wiley & Sons, UK.
- Visschers R.W., de Jongh H.H.J. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23, 75-80.
- Vogles E. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74, 69-117.
- Wang H., Hu D., Ma Q., Wang L. (2016). Physical and antioxidant properties of flexible soy protein isolate films by incorporating chestnut (*Castanea mollissima*) bur extracts. *LWT- Food Science and Technology*, 71, 33-39.
- Wang H., Wang L. (2017). Developing a bio-based packaging film from soya by-products incorporated with valonea tannin. *Journal of Cleaner Production*, 143, 624-633.

Wang J., Qian W., He Y., Xiong Y., Song P., Wang R.-M. (2017a). Reutilization of discarded biomass for preparing functional polymer materials. *Waste Management*, 65, 11-21.

Wang K., Li M., Wen X., Chen X., He Z., Ni Y. (2018a). Optimization of ultrasound-assisted extraction of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) polysaccharides based on response surface methodology and antioxidant activity. *Industrial Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1056-1063.

Wang K., Xie X., Zhang Y., Huang Y., Zhou S., Zhang W., Lin Y., Fan H. (2018c). Combination of microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for separation and enrichment of pyrethroids residues in Litchi fruit prior to HPLC determination. *Food Chemistry*, 240, 1233-1242.

Wang L., Boussetta N., Lebovka N., Vorobiev E. (2018b). Selectivity of ultrasound-assisted aqueous extraction of valuable compounds from flesh and peel of apple tissues. *LWT- Food Science and Technology*, 93, 511-516.

Wang S., Marcone M., Barbut S., Lim L.T. (2012). The impact of anthocyanin-rich red raspberry extract (ARRE) on the properties of edible soy protein isolate (SPI) film. *Journal of Food Science*, 77(4), 497-505.

Wang S.Y., Zhu B.B., Li D.Z., Fu X.Z., Shi L. (2012). Preparation and characterization of TiO<sub>2</sub>/SPI composite film. *Material Letters*, 83, 42-45.

Wang X.J., Zheng X.Q., Liu X.L., Koppurapu N.K., Cong W.S., Deng Y.P. (2017c). Preparation of glycosylated zein and retarding effect on lipid oxidation of ground pork. *Food Chemistry*, 227, 335-341.

Wang Z., Hu S., Gao Y., Ye C., Wang H. (2017b). Effect of collagen-lysozyme coating on fresh-salmon fillets preservation. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 59-64.

Wang Z., Zhou J., Wang X., Zhang N., Sun X., Ma Z. (2014). The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 35, 51-58.

Ward G., Nussinovitch A. (1997). Characterizing the gloss properties of hydrocolloid films. *Food Hydrocolloids*, 11, 357-365.

Ward G., Nussinovitch A. (2017). Characterizing the gloss properties of hydrocolloid films. *Food Hydrocolloids*, 11, 357-365.

Wihodo M., Moraru C.I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *Journal of Food Engineering*, 114, 292-302.

Wu T., Dai S., Cong X., Liu R., Zhang M. (2017c). Succinylated soy protein film coating extended the shelf life of apple fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), 13024-13034.

Xia C., Wang L., Dong Y., Zhang S., Shi S.Q., Cai L., Li J. (2015). Soy protein isolate-based films cross-linked by epoxidized soybean oil. *RSC Advances*, 5(101), 82765-82771.

Xu D.-P., Zheng J., Zhou Y., Li Y., Li S., Li H.-B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry*, 217, 552-559.

Xu F., Dong Y., Zhang W., Zhang S., Li L., Li J. (2015). Preparation of cross-linked soy protein isolate-based environmentally-friendly films enhanced by PTGE and PAM. *Industrial Crops and Products*, 67, 373-380.

Xu H., Chai Y., Zhang G. (2012). Synergistic effect of oleic acid and glycerol on zein film plasticization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 10075-10081.

Xu J., McCarthy S.P., David R.A.G, Kaplan L. (1996). Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules*, 29, 3436-3440.

Yan W., Zhou J., Sun M., Chen J., Hu J., Shen B. (2014). The construction of an amino acid network for understanding protein structure and function. *Amino acids*, 46(6), 1419-1439.

Yemenicioğlu A. (2016). Zein and its composites and blends with natural active compounds: development of antimicrobial films for food packaging. In: Barros-Velazquez J (ed.). *Antimicrobial food packaging*. Elsevier Inc, Netherlands, pp 503-513.

Yemiş G.P., Candoğan K. (2017). Antibacterial activity of soy edible coatings incorporated with thyme and oregano essential oils on beef against pathogenic bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 1113-1121.

Yin X.C., Li F.Y., He Y.F., Wang Y., Wang R.M. (2013). Study on effective extraction of chicken feather keratins and their films for controlling drug release. *Biomaterial Science*, 1, 528-536.

Younes I., Rinaudo M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.

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

Zárate-Ramírez L.S., Romero A., Bengoechea C., Partal P., Guerrero A. (2014). Thermo-mechanical and hydrophilic properties of polysaccharide/gluten-based bioplastics. *Carbohydrate Polymers*, 112, 24-31.

Zárate-Ramírez L.S., Romero A., Bengoechea C., Partal P., Guerrero A. (2014). Thermo-mechanical and hydrophilic properties of polysaccharide/gluten-based bioplastics. *Carbohydrate Polymers*, 112, 24-31.

Zema L., Loreti G., Melocchi A., Maroni A., Gazzaniga A. (2012). Injection molding and its application to drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 159(3), 324-331.

Zeng X., Duan Y., Zhe W., Jiang J., He L., Wang S., Wang M. (2013). Edible coating based on soy protein to improve shelf life and overall quality of minimally processed jujubes. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(3-4), 263-269.

Zhang B., Zhang Y., Dreisoerner J., Wei Y. (2015). The effects of screw configuration on the screw fill degree and special mechanical energy in twin-screw extruder for high-moisture texturised defatted soybean meal. *Journal of Food Engineering*, 157, 77-83.

Zhang Y., Cui L., Che X., Zhang H., Shi N., Li C., Chen Y., Kong W. (2015b). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release*, 206, 206-219.

Zhang Y.B., Wang J.W., Jiang J., Li Y.X. (2013). Antimicrobial activity of soy protein isolate-essential oil monomers edible composite films for chilled pork preservation. *Advanced Materials Research*, 726, 638-641.

Zhang B., Yang, R., Liu C.-Z. (2008). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica Thunb.* *Separation and Purification Technology*, 62(2), 480-483.

Zhao X., Chen J., Zhu Q., Du F., Ao Q., Liu J. (2011). Surface characterization of 7S and 11S globulin by X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86, 260-266.

Zhao X., Zhu H., Zhang G., Tang W. (2015). Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. *Powder Technology*, 286, 838-844.

Zhong Y., Cavender G., Zhao Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 1-8.

Zink J., Wyrobnik T., Prinz T., Schmid M. (2016). Physical, chemical and biochemical modifications of protein-based films and coating: An extensive review. *International journal of Molecular Science*, 17(9), 1376-1421.

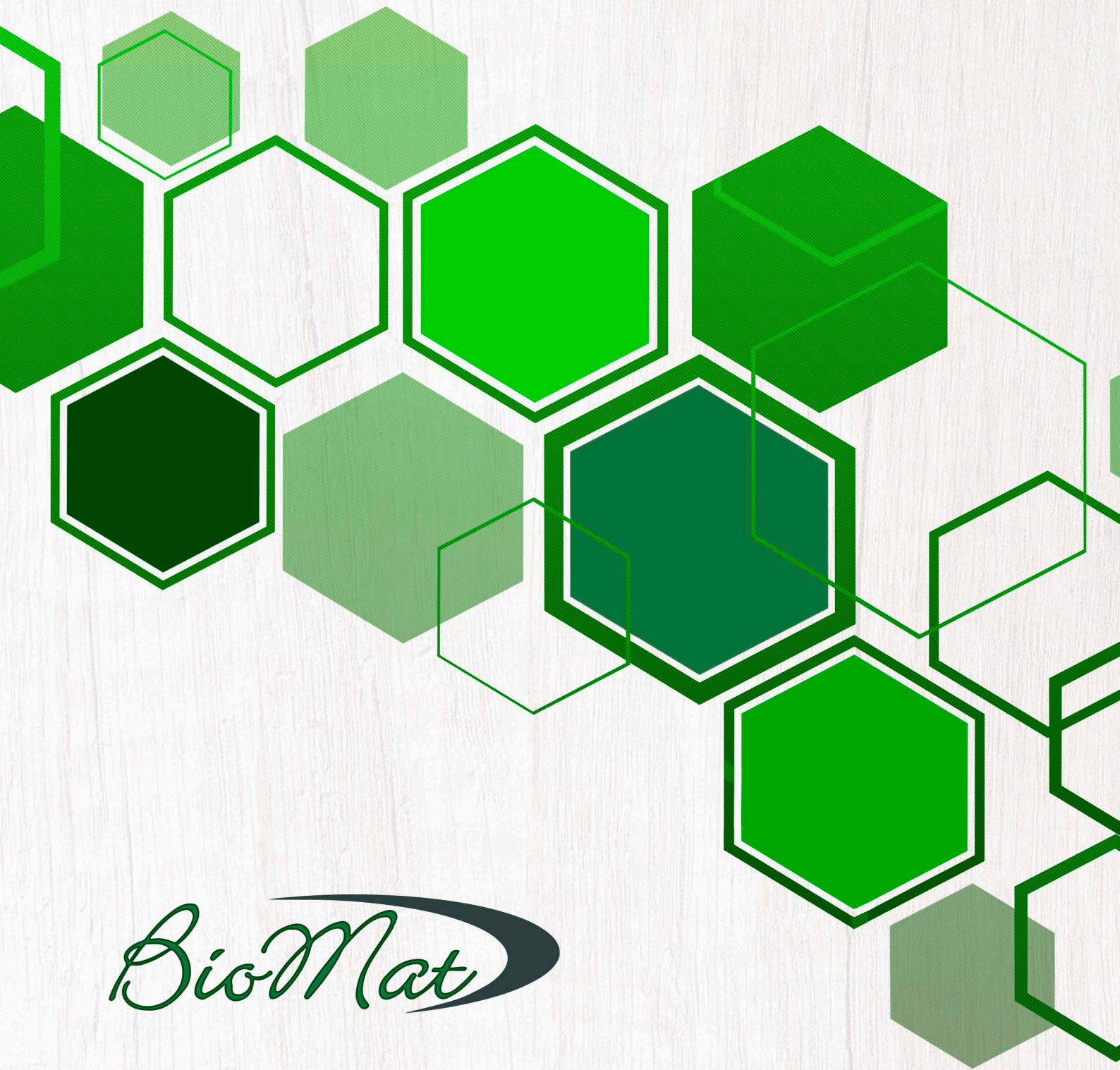
Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. (1995). *Wine analysis and production*, Chapman and Hall, New York.

Zubeldía F., Ansorena M.R., Marcovich N.E. (2015). Wheat gluten films obtained by compression molding. *Polymer Testing*, 43, 68-77.









*BioMat*