



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

# I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15  
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

## INGENIARITZA ETA ARKITEKTURA

Laktosaren eragina arrain  
gelatinazko filmetan

*A. Etxabide, M. Urdanpilleta,  
P. Guerrero eta K. de la Caba*

614-619 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.84>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## Laktosaren eragina arrain gelatinazko filmetan

Etxabide, A.<sup>1</sup>, Urdanpilleta, M.<sup>2</sup>, Guerrero, P.<sup>1</sup>, de la Caba, K.<sup>1</sup>

BIOMAT Ikerketa Taldea. Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila (1),  
Fisika Aplikatua I Saila (2). Unibertsitate Eskola Politeknikoa. Universidad del País  
Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)  
alaitz.etxabide@ehu.eus

### Laburpena

Laktosa kantitate ezberdineko arrain gelatinazko filmak ingurune basikoan prestatu dira, eta saretze erreakzio natural baten bidez, proteinaren propietateak aldarazi dira. Laktosadun film garden eta homogeneoei aplikaturiko bero tratamenduak, disolbagarritasuna gutxitu eta argiarekiko babesa hobetu ditu, filmei horixka kolorea emateaz gain. Proteinaren egituraren aldaketa infragorri espektroskopia (FTIR), X-izpien difrakzioa (XRD) eta indar atomikoko mikroskopia (AFM) erabiliz aztertu da.

Hitz gakoak: Arrain gelatina, laktosa, Maillard erreakzioa, FTIR, XRD, AFM

### Abstract

*Fish gelatin films were prepared in basic medium by mixing gelatin with different percentages of lactose, and then protein properties were modified by a natural cross-linking reaction. Transparent and homogeneous films were obtained and afterwards, these films were heated in order to promote cross-linking. Heated films showed a decrease of solubility and an improvement of light resistance, together with a color change. The change in gelatin structure was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and Atomic Force Microscopy (AFM).*

*Keywords: Fish gelatin, lactose, Maillard reaction, FTIR, XRD, AFM*

## 1. Sarrera eta motibazioa

Azkeneko urteetan, petroliotik eratorritako plastiko zabor kantitate handiek ingurumenean izan duten inpaktu negatiboagatik sorturiko kezken hazkuntzak eragin du medikuntza eta industria aplikazioetan erabilgarriak diren iturri berriztagarrietan oinarritutako material biodegradagarriak geroz eta ikertuagoak izatea. Elikagaiak babesteko filmetan edota geruzetan gehien erabiltzen diren biopolimeroen artean, animalien ehunetan aurkitzen den kolagenoaren hidrolisitik lortzen den gelatina dago. Kolagenotik gelatinarako eraldaketan, helize-hirukoitza egitura desegiten da, kateen arteko nahiz kate barruko interakzioak gutxitzen direlako, eta honi, desnaturalizazioa deritzo (Duconseille et al., 2015). Nahiz eta elikagaiak babesteko gelatinazko filmek propietate oso interesgarriak aurkeztu, urarekiko portaera higroskopikoa arazo bat da. Proteinen mikroegituran eragiten duen erreakzio garrantzitsua, polimero kateen saretzea da. Azukreen presentzian proteina berotzerakoan, ikusi da haren barruko interakzioak eta konfigurazioak alda daitezkeela, hainbat etapa dituen Maillard izeneko erreakzioa bideratzen delako (Van Boekel, 1998). Azukrearen karbonilo taldearen eta proteinaren amino talde baten artean gertaturiko erreakzioan, propietateetan eragiten duten konposatuak sortzen dira, biopolimeroa elikagaiak biltzeko material hobea bilakatuz.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Industria-hondakinetatik edota elikagaien osagaietatik eratorritako material biodegradagarriek (polisakaridoak, proteinak eta lipidoak), elikagaiak babesteko erabiltzen diren plastiko konbentzionalak ordezkatzeko erakutsi duten gaitasunagatik, interes handia erakarri dute. Bakoitzaren propietateak hobetzeko, materialak elkarren artean nahasi egiten dira, hainbat sistema sortuz, adibidez: arto olio, eguzki-lore olio, kitina eta kitosanoa, gelatinarekin nahasi dira materialaren barrera-propietateak hobetzeko asmoz (Nur Hanani et al., 2014).

Ikerketa honek, elikagaiak ontziratzeke gelatinazko filmak sortzea du helburu. Proteina honen urarekiko portaera ahula hobetzeko asmoz, Maillard erreakzioa sustatuko duten bi aldagaiekin lan egin da; laktosa eta tenperatura. Beraz, azukre kantitateak nahiz tenperaturak gelatinazko filmen propietateetan duten eragina aztertu da.

### 3. Ikerketaren muina

#### 3.1 Materialak eta metodoak

##### Materiala

Arrain gelatina izan da ikerlan honetan erabili den oinarrizko materiala. % 11,06ko hezetasuna eta % 0,15ko errautsak ditu eta Weishardt Internatioalek (Eslovakia) ekoiztutakoa da. Gehigarri moduan, glizerola eta laktosa erabili dira, plastifikatzaile eta saretze erreaktibo gisa, hurrenez hurren. Azken bi hauek Panreacek (Bartzelona) ekoitziak dira.

##### Filmen prestaketa

Gelatinan oinarrituriko filmak disoluzio metodoa erabiliz prestatu dira. Lehenengo, arrain gelatina 5 g eta laktosa (portzentajearen arabera pisua, gelatina idorrarekiko) 100 mL ur distilatuan nahastu dira eta jarraian, 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran, 30 minutuz berogailu magnetiko batean irabiatzen utzi da nahastea. Ondoren, % 10 glizerola gehitu eta NaOH (1 N)-arekin pH-a 10an finkatu da, ingurune basikoan lan egiteko. Gero, nahastea beste 30 minutuz 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran irabiatzen utzi da, eta azkenik, Petri ontzietan banatu da. Nahastea 25 °C-an eta % 50eko hezetasuna duen kamara klimatiko batean uzten da, ura lurruntzeko eta filmak sortzeko (NH filmak delakoak). Film batzuek 105 °C-an 24 orduz bero tratamendua jaso dute (HT filmak delakoak), filmen propietateengan Maillard erreakzioaren eragina aztertzeko. Horrela, laktosak eta bero tratamenduak gelatinazko filmen propietate fisiko-kimikoetan duten eragina aztertu da, kolore aldaketa totala ( $\Delta E^*$ ) eta disolbagarritasun (TSM) balioak kalkulatu (Etxabide et al., 2013). Gainera, erreakzioaren eragina filmen egitura aztertu da, ikusgai-ultramareko espektroskopia (UV-vis), FTIR, XRD eta AFM erabiliz.

#### 3.2 Emaitzak eta eztabaida

Elikagaien bilgarri moduan erabiltzen diren materialen disolbagarritasuna ezagutzea oso garrantzitsua da, bere osotasuna eta produktuaren freskotasun-maila mantentzeko gaitasuna ebaluatzeko. **1. taulan** ikusi daitekeen bezala, HT laktosadun filmen disolbagarritasuna nabarmenki txikitu da. Horren arrazoia izan daiteke bero tratamenduarengatik gelatinan emandako saretzeak materialaren disolbagarritasuna gutxitzen duten pisu molekular handiko agregatuak osatzen dituelako (Chiou et al., 2006). Gainera, saretze maila handitzearekin disolbagarritasuna txikitzen denez, filmen urarekiko portaeraren aldaketa gelatina eta laktosaren arteko Maillard erreakzioaren eraginagatik izan daiteke. Aipatzekoa da, NH filmak guztiz disolbagarriak direla, tenperaturak Maillard erreakzioa bultzatzen duela frogatuz. % 20 laktosa gehituz gero, disolbagarritasuna % 12 ingurukoa dela ikusi da, eta nahiz eta azukre gehiago gaineratu, Maillard erreakzioa gehiago garatzen ez dela ikusi da. Disolbatu ez den % 12a, gehituriko glizerol guztia (% 10) eta proteinarekin erreakzionatu ez duen laktosa izan daiteke, hidrogeno zubien bidez gelatinarekin elkarreragin dutelako.

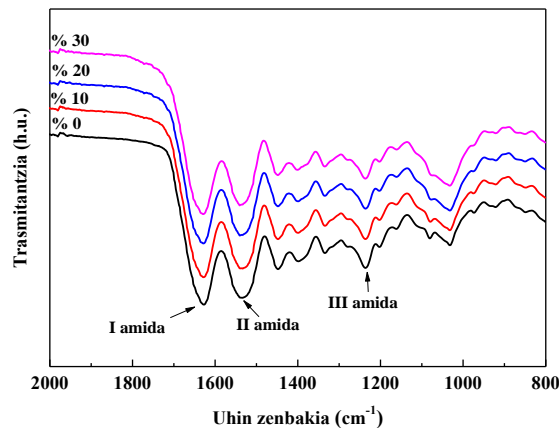
##### 1.taula. Bero tratamendu gabeko (NH) eta trataturiko (HT) laktosaren kopuruaren arabera filmen disolbagarritasuna.

Laktosa (%)	TSM (%)	
	NH	HT
0	100	77 ± 6
10	100	16 ± 2
20	100	12 ± 4
30	100	12 ± 3

Proteina eta azukrearen arteko interakzioak aztertzeko FTIR erabili da eta laktosa kopuru ezberdineko HT filmen espektroak **1. irudian** ikusi daitezke. Gelatinaren absortzio banda nagusiak C=O loturaren luzatzea (1630 cm<sup>-1</sup>, I amida), N-H loturaren tolestea (1530 cm<sup>-1</sup>, II amida) eta C-N loturaren luzatzea (1230 cm<sup>-1</sup>, III amida) dira (Schmidt et al., 2005). Glizerolaren absortzio banda garrantzitsuenak aldiz, C-C eta C-O loturen bibrazioekin erlazionaturikoak dira: 850, 940 eta 1000

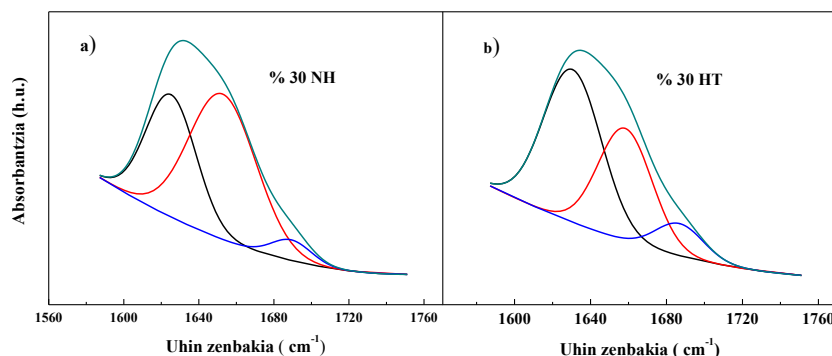
$\text{cm}^{-1}$ eko bandak C-C loturekin bat datozenak, eta  $1050$  eta  $1100 \text{ cm}^{-1}$  C-O loturenak (Basu et al., 2011). Laktosaren bandak berriz,  $1180$  eta  $953 \text{ cm}^{-1}$ -eko uhin luzeren artean kokatzen dira;  $979$  eta  $987 \text{ cm}^{-1}$ -eko bandak C-C bibrazioekin bat datoz, eta  $1034 \text{ cm}^{-1}$ -eko banda aldiz  $\text{CH}_2\text{-OH}$  taldearen C-O bibrazioarenak dira (Wang et al., 2013). **1. irudian** ikusi daitekeen moduan,  $1100\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ eko tartean kokaturik duden bi bandak, laktosa kantitatea igo heinean, intentsitate handiagoko banda bakarri izatera pasatzen dira.

**1. irudia. Trataturiko (HT) filmen FTIR espeketroak, laktosa kantitatearen funtziopean.**



I amida banda proteinaren bigarren egituraren menpekota denez, Maillard erreakzioaren eraginez gelatinan emandako egitura aldaketan analisi kuantitatiboa egin daiteke. **2. irudian** ikus daitekeen moduan, proteinaren banda nagusia den  $\alpha$ -helize egitura ez-ordenatuaren ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) eta  $\beta$ -xafla egiturari egokitutako  $1630\text{-}1615 \text{ cm}^{-1}$  eta  $1700\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$  tarteetako banden intentsitateen aldaketek (Hu et al., 2010), erreakzioaren eraginez proteinaren destolestatzea gertatu dela adierazten dute. NH filmen kasuan,  $\alpha$ -helizeari dagokion bandaren intentsitatea handiagoa da  $\beta$ -xaflarekin konparatuz. HT filmetan berriz,  $\beta$ -xaflak eratzeak,  $1689$  eta  $1625 \text{ cm}^{-1}$ -eko banden intentsitateen igoera eragin duela ikusi da, eta ondorioz,  $\alpha$ -helize bandaren intentsitatea txikitu da. Izan ere, beroagatik desnaturalizatutako proteinetan,  $\beta$ -xafez osaturiko agregatuak egotea ohikoena da (Susi et al., 1967), eta ondorioz, nagusiki  $\beta$ -xafez osaturiko agregazioak sortzen direla ikusi da. Beraz, azterketa honekin, egitura erregular eta desordenaturiko segmentuetatik,  $\beta$ -xafla egiturara pixkanakako konbertsioa dagoela ikusi da (Quinn et al., 2003), Maillard erreakzioaren eragina gelatinaren egituran ikusiz.

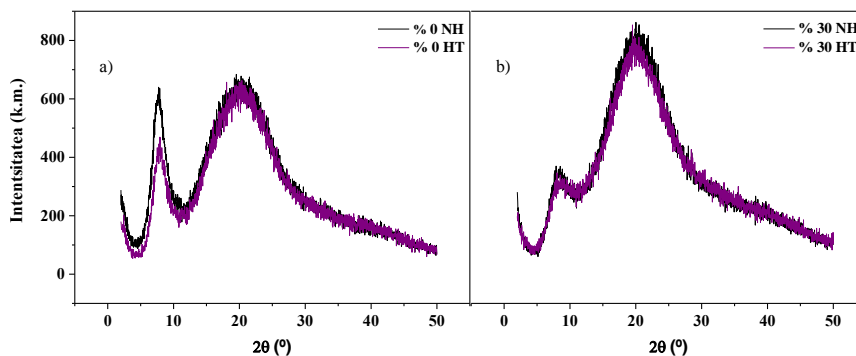
**2.irudia. I amidari egokituriko kurba espektra % 30 laktosadun filmentzat: a) bero tratamendu gabeko (NH) eta b) trataturiko (HT) filmentzat.**



Gelatinaren egiturari analisi sakonago bat egiteko, XRD teknika erabili da. **3. irudian** ikus daitekeen bezala, gelatinan oinarrituriko lagin guztiak bi difrakzio banda erakusten dituzte;  $21^\circ$ -ko pikoa gelatinaren zati kristalinoari dagokiona eta  $7,4^\circ$ -koa kolageno natiboaren helize-hirukoitzaren hondarrari dagokiona (Guerrero et al., 2012). Laktosadun laginak berotzerakoan, gelatinaren zati kristalinoa handitzen dela ikusi da, proteina eta azukrearen arteko lotura kobalenteen eraketak ordenamendu handiagoko egitura osatzen duelako. Aldiz, helize-hirukoitzaren banda txikitu egiten da, Maillard erreakzioaren eraturiko sareek gelatinaren kateen arteko elkarrekintzaren murrizketa eragin

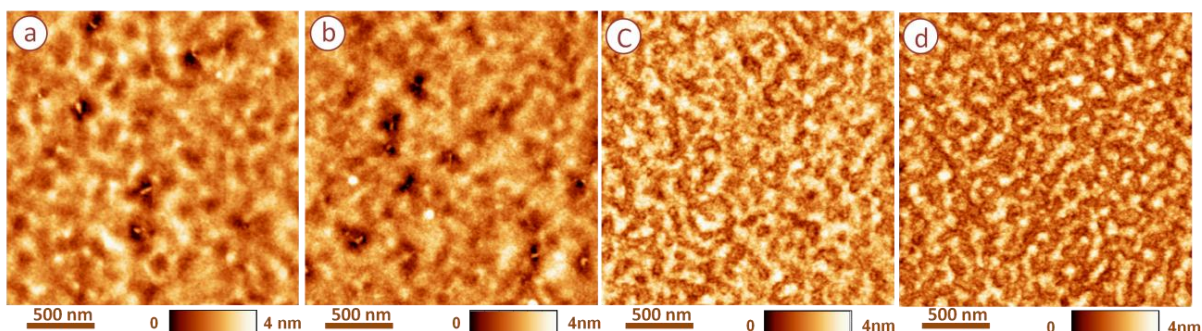
dutelako, eta ondorioz, kolagenoaren helize-hirukoitzaren berrantolaketa oztopatzen du (Elharfaoui et al., 2007).

### 3. irudia. Bero tratamendu gabeko (NH) eta trataturiko (HT) filmen XRD espeketroak: a) laktosa gabekoak eta b) % 30 laktosadunak.



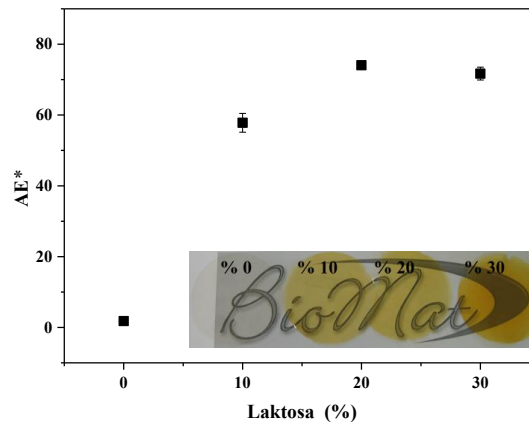
Arrain gelatinazko filmen gainazaleko egituraren azterketa egiteko, AFM teknika erabili da, eta emaitzak **4. irudian** ikus daitezke. NH filmetan (**4. irudia a**), eraztun formako poroak (Wang et al., 2008) eta XRD bidez ikusitako helize-hirukoitzaren presentziarekin bat datorren zuntz-egiturak ikusten dira. Tenperaturaren eragina aztertzeko, laktosa gabeko filmak berotu egin dira (**4. irudia b**), eta zuntz-egiturak txikitu eta forma irregularreko agregatuak agertu direla ikusi da, XRD bidez tenperaturarengatik helize-hirukoitzari dagokion bandaren txikitzearekin bat etorritik. Laktosaren eraginak gelatinaren nano-egitura aldatu egiten duela ikusi da (**4. irudia c**). Izan ere, azukrearen gehitzeak helize-hirukoitza txikitzeaz gain, pisu molekular baxuko agregatuak eratzen ditu. Azkenik, tenperatura nahiz laktosaren eraginak (**4. irudia d**) aztertzerakoan, gelatinaren egitura nabarmenki aldatu dela ikusi da, Maillard erreakzioan sorturiko pisu molekular altuko konposatuek ordenamendu ezberdineko domeinu bereizgarriak sortzen dituztelako (Liu eta Zhong, 2012).

### 4. irudia. Filmeko nano-egitura: a) laktosarik eta berotu gabeko filmena, b) laktosarik gabeko eta trataturiko filmena, c) % 30 laktosadun eta berotu gabeko filmena, eta d) % 30 laktosadun eta trataturiko filmena.



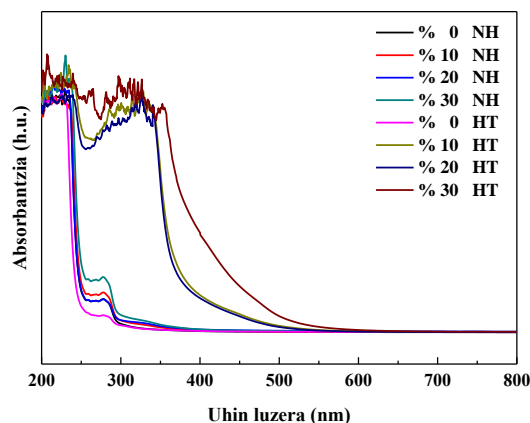
Filmek duten kolorea ere garrantzizkoa da ontziraturiko produktuen itxuran zuzenean eragiten duelako, eta ondorioz, eroslearen onarpenean (Monedero et al., 2009). **5. irudian** ikusten den bezala, filmak homogeenak eta gardenak izaten jarraitzen dute, nahiz eta laktosaren gehikuntzak eta bero tratamenduak kolore horixka eman. Kolorearen eraldaketa azukre eta proteinaren arteko Maillard erreakzioaren azkeneko etapan sortzen diren melanoidina konposatuek eragiten dute. Bestetik, gehituriko laktosa kantitateak kolore aldaketa totalen ( $\Delta E^*$ ) eragina duela frogatu da (**5. irudia**), izan ere, geroz eta azukre gehiago, orduan eta karbonilo talde gehiago egongo dira proteinaren amino taldeekin errazago eta azkarrago erreakzionatuko dutenak. Ondorioz, gehituriko laktosa kantitateak Maillard erreakzioaren garapen abiaduran eragiten duela esan daiteke.

**5. irudia. Trataturiko (HT) filmen kolore aldaketa totala ( $\Delta E^*$ ) laktosa kantitatearen funtziopean.**



Filmek, UV argiak eragin ditzaken aldaketa kimikoetatik babestu behar dute elikagaia, eta horregatik, gelatina eta laktosaren arteko saretzeak filmengan duen eragina UV-vis espektroskopia erabiliz aztertu da. **6. irudian** ikusi daitekeen moduan, laktosa kantitate ezberdineko NH filmek argiarekiko babes propietate oso onak aurkeztu dituzte, gelatinaren berezko lotura peptidiko (200-250 nm) eta aminoazido aromatikoengatik, hala nola, tirosina eta fenilalanina kromoforoak (250-300 nm) (Samira et al., 2014). Filmek bero tratamendua jasaterakoan, UV argiarekiko babesa uhin-luzera handiagoetara zabaltzen da. Iza ere, Maillard erreakzioaren ondorioz aminoazido konposatu aromatikoaren kantitatea igotzen da (250-300 nm) eta laktosa eta gelatinaren arteko lotura kobalenteek eratutako egitura konjugatuak sortzen dira (300-400 nm).

**6. irudia. Filmek UV-vis argiarekiko babesa laktosa kantitatearen funtziopean, berotu gabeko (NH) eta trataturiko (HT) filmetan.**



**4. Ondorioak**

Elikagaiak babesteko erabili nahi diren arrain gelatinazko filmen propietate funtzionalak, laktosa portzentaje ezberdinak erabiliz hobetu dira. Laktosaren gehikuntzak eta bero tratamenduak Maillard erreakzioa bultzatzea eragin dute, proteinaren egitura  $\alpha$ -helizetik  $\beta$ -xaflara eraldatuz. XRD teknikak erakutsi bezala, laktosak eta bero tratamenduak helize-hirukoitza egitura kopuruaren gutxitzea eta zati kristalinoa handitzea eragin dute, AFMko emaitzen zuntz-egituren murriztearekin eta agregatuen eraketarekin bat eginez. Bestetik, erreakzioan sorturiko konpasatuek argiarekiko babesa hobetzen dute, filmek homogeneousuna eta gardentasuna mantenduz. Maillard erreakzioak arrain gelatinazko filmek propietateak hobetu dituela frogatu da.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Laborategi-mailan gelatinazko filmak lortu ondoren, eskala industrialeko prozesuetara hurbiltzeko helburuarekin, plastiko sintetikoaren prozesatzean gehien erabiltzen diren estrusio eta injekzio makinak bidez, gelatina termoplastikoa lortzeko bidea hartuko da. Injektaturiko laginen propietate termiko, mekaniko eta higroskopikotasuna aztertuko dira, laktosa kantitatearen eta tenperaturaren funtziopean.

## 6. Erreferentziak

- Basu, S., Shivhare, U. S., Singh, T. V. eta Beniwal, V.S. (2011). Rheological, texture and spectral characteristics of sorbitol substituted mango jam, *Journal of Food Engineering*, 105, 503-512.
- Chiou, B. S., Vena-Bustillos, R. J., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P. J. eta Imam, S. H. (2006). Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins, *Polymer*, 47, 6379-6386.
- Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F. eta Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review, *Food Hydrocolloids*, 43, 360-376.
- Elharfaoui, N., Djabourov, M. eta Babel, W. (2007). Molecular weight influence on gelatin gels: structure, enthalpy and rheology, *Macromolecular Symposia.*, 256, 149-157.
- Etxabide, A., Leceta, I., Guerrero, P. eta de la Caba, K. (2013). Arrain gelatinan oinarrituriko film biodegradagarriak, *Ekaia*, 26, 53-67.
- Guerrero, P., Beatty, E., Kerry, J. P. eta de la Caba, K. (2012). Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content, *Journal of Food Engineering*, 110, 53-59.
- Hu, X., Lu, Q., Sun, L., Cebe, P., Wang, X., Zhang, X. eta Kaplan, D. L. (2010). Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin-hyaluronic acid hydrogels, *Biomacromolecules*, 11, 3178-3188.
- Liu, G. eta Zhong, Q. (2012). Glycation of Whey Protein To Provide Steric Hindrance against Thermal Aggregation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9754-9762.
- Monedero, F. M., Fabra, M. J., Talens, P. eta 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.
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H. eta Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products, *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94-102.
- Quinn, G., Monahan, F. J., O'Sullivan, M. eta Langares, A. (2003). Role of covalent and noncovalent interactions in the formation of films from unheated whey protein solutions following pH adjustment, *Journal of Food Science*, 68, 2284-2288.
- Samira, S., Thuan-Chew Tan, T.C. eta Azhar, M.E. (2014). Effect of ribose-induced Maillard reaction on physical and mechanical properties of bovine gelatin films prepared by oven drying, *International Food Research Journal*, 21, 269-276.
- Schmidt, V., Giacomeli, C. eta Soldi, V. (2005). Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate, *Polymer Degradation and Stability*, 87, 25-31.
- Susi, H., Timasheff, S.N. eta Steves, L. (1967). Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions: I. The amide I band in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O solutions, *Journal of Biological Chemistry*, 242, 5460-5466.
- Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reaction in milk, *Food Chemistry*, 62, 403-414.
- Wang, W. Q., Bao, Y. H. eta Chen, Y. (2013). Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system, *Food Chemistry*, 139, 355-361.
- Wang, Y., Yang, H. eta Regenstein, J. M. (2008). Characterization of fish gelatin at nanoscale using force microscopy, *Food Biophysics*, 3, 269-272.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Egileek, Euskal Herriko Unibertsitateak UPV/EHU (GIU12/06 ikerketa taldea), Eusko Jaurlaritzak (S-PE12UN002 eta S-PE13UN057 proiektuak), eta Gipuzkoako Foru Aldundiak (OF144/2014 (B)) emandako diru laguntza eskertzeaz gain, UPV/EHUko Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorrari (SGIKer) eskertu nahi diete. Alaitz Etxabidek, UPV/EHUri ikerketarako emandako diru-laguntza (PIF13/008) eskertzen dio.