



***Istraživanje dobijanja i karakterizacija
biorazgradivih kompozitnih filmova na
bazi biljnih proteina***

Doktorska disertacija | *Senka Popović*

Mentor: *Prof. dr Draginja Peričin*

Novi Sad, 2013.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

**Redni broj:
RBR**

**Identifikacioni broj:
IBR**

**Tip dokumentacije:
TD** Monografska dokumentacija

**Tip zapisa:
TZ** Tekstualni štampani materijal

**Vrsta rada
(dipl., mag., dokt.):
VR** Doktorska disertacija

**Ime i prezime autora:
AU** Senka Popović, dipl. inž.

**Mentor (titula, ime,
prezime, zvanje):
MN** dr Draginja Peričin, red. prof., Tehnološki fakultet, Novi
Sad, Univerzitet u Novom Sadu

**Naslov rada:
NR** **Istraživanje dobijanja i karakterizacija biorazgradivih
kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina**

**Jezik publikacije:
JP** Srpski (latinica)

**Jezik izvoda:
JI** Srpski/Engleski

**Zemlja publikovanja:
ZP** Srbija

**Uže geografsko
područje:
UGP** AP Vojvodina

**Godina:
GO** 2013.

Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 6, broj stranica 156, broj slika 71, broj tabela 15, broj literaturnih navoda 352
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo, Primenjene inženjerske hemije
Naučna disciplina: ND	Biohemija, Biohemija proteina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Biljni proteini, biorazgradivi kompozitni filmovi, fizičko-mehaničke, barijerne, biološke, strukturne karakteristike
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka, Tehnološki fakultet, Novi Sad Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: dobijanja i IZ	Predmet doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti karakterizacija novih biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Osnovno istraživanje se bazira na ispitivanju mogućnosti dobijanja kompozitnih filmova na bazi obnovljivih sirovina, vlažnim postupkom ("casting" metoda), karakterizaciji dobijenih filmova i modifikaciji uslova dobijanja radi poboljšanja osobina formiranog filma. Istraživanja se zasnivaju na dobijanju filmova na bazi pogače uljane tikve golice (<i>Cucurbita pepo</i> L. c. v. Olinka) (pumpkin oil cake – PuOC), njenog proteinskog izolata i njihove kombinacije sa drugim filmogenim polimerima (proteinima i polisaharidima). Istraživanje podrazumeva procenu mogućnosti primene PuOC radi delimične zamene opšte poznatih filmogenih materijala, kao i produkciju filmova od PuOC i od proteinskog izolata PuOC. Za produkciju filmova, od važnosti je ispitivanje procesnih parametara (temperatura, pH, period denaturacije, uslovi sušenja, itd.) i komponenti koje formiraju film (količina polimera sa sposobnošću formiranja filma, količina i vrsta plastifikatora, količina i vrsta agenasa za umrežavanje, itd.). S obzirom na velik broj parametara koji utiču na formiranje filma, kao i na osobine formiranih filmova, ispitano je međusobno delovanje više faktora na mogućnost produkcije i osobine dobijenog filma. Odabir i optimizacija procesnih parametara i

modelovanje produkcije filmova izvedeno je implementiranjem nove kompjuterske i analitičke metodologije. Osobine značajne za dalju primenu dobijenih filmova podrazumevaju mehaničke osobine (zateznu jačinu i izduženje pri kidanju), barijerne (propustljivost gasova) i fizičko-hemijske karakteristike (rastvorljivost, količinu rastvorljivih proteina, biološku aktivnost u vidu antioksidantne aktivnosti), a ispitane su u cilju deklarisanja potencijalne aplikacije filma. Dodatno, ispitana je mogućnost produkcije kompozitnih filmova proteinski izolat/hitozan, kao i primena enzimskog umrežavanja (cross-linking) enzimom transglutaminaza (TGaza), radi dobijanja filmova sa unapređenim karakteristikama. Istraživanja su vođena i u smeru karakterizacije strukture nastalih filmova, primenom tehnika elektron skenirajuće mikroskopije, deferencijalne skening kalorimetrije, gasne hromatografije i Furije transformišuće infracrvene spektrofotometrije.

**Datum prihvatanja
teme od NN-veća:
DP**

21.04.2011.

**Datum odbrane:
DO**

**Članovi komisije:
(Ime i prezime, titula,**

dr Vera Lazić, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik

**Zvanje, naziv organizacije,
status)**

dr Svetlana Trivić, redovni profesor, član
Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad,

KO

dr Draginja Peričin, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad, član

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF TECHNOLOGY

Keyword documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph documentation

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

PhD Thesis

CC

Author:

Popović Senka, MSc

AU

Mentor:

Dr Draginja Peričin, Professor, Faculty of Technology
Novi Sad, University of Novi Sad

MN

Title:

The study of production and characterization of biodegradable,
composite films based on plant proteins

TI

Language of text:

Serbian (latinic)

LT

Language of abstract:

Serbian/English

LA

Country of publication:

Serbia

CP

Locality of publication:

AP Vojvodina

LP

Publication year:

2013.

PY

Publisher:

Author reprint

PB

Publish place:

Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

PP

Physical description: Chapters 6, pages 156, figures 71, tables 15,
PD references 352

Scientific field: Applied and Engineering Chemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry, Protein biochemistry
SD

Subject, Keywords: Biodegradable composite films; physico-mechanical, barrier,
SKW biological, structural properties; plant proteins

UC

Holding data: Faculty of Technology Novi Sad (library),
HD Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

Note: None
N

Abstract: The subject of the doctoral dissertation is to examine the possibility of
AB production and characterization of new biodegradable composite films based on plant proteins. The research is based on an examination of the possibility of obtaining composite films based on renewable raw materials, using the casting method, on the characterization of the obtained films and the requirement for the modification to improve the properties of the formed film. The research is aimed to evaluate the possibility of the production the new biodegradable films based on hull-less pumpkin (*Cucurbita pepo* L. c. v. Olinka) oil cake (pumpkin oil cake - PuOC), its protein isolates and their combinations with other filmogenous polymers (proteins and polysaccharides). The study involves partial replacement of commonly well-known filmogenous materials with PuOC, and production of films based on the whole PuOC and the protein isolates from PuOC. For film production, it is important to investigate the process parameters (temperature, pH, denaturation period, drying conditions, etc.), film-forming components (the amount of polymer with film-forming ability, the amount and type of plasticizer, the amount and type of cross-linking agents, etc.). As the large number of parameters influence the film formation, as well as the properties of formed films, the interaction of several factors which affect the possibility of the production and properties of the obtained film, was examined. Selection and optimization of process parameters and modeling of film production will be carried out by implementing a new computer and analytical methodology. Characteristics important for further application of the obtained films include mechanical properties (tensile strength and elongation at break), barrier (gas permeability) and physical-chemical properties (solubility, the amount of soluble proteins, biological activity in the form of antioxidant activity) and were tested for the purpose of declaring potential application of the

produced films. Additionally, the possibility of production of composite films protein isolate/chitosan, and the application of enzymatic networks (cross-linking) by the enzyme transglutaminase, in order to obtain films with improved properties, was examined. Research was conducted in the direction of the characterization of films formed by applying the techniques of scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, gas chromatography and Fourier transforming infrared spectrophotometry.

**Accepted on Scientific
Board on:
AS**

21.04.2011.

**Defended:
DE**

**Thesis defend board:
DB**

Dr Vera Lazić, Professor, Faculty of Technology Novi Sad,
president,

Dr Svetlana Trivić, Professor, Faculty of Natural Sciences
and Mathematics, Novi Sad, member,

Dr Draginja Peričin, Professor, Faculty of Technology, Novi
Sad, member

Ova disertacija urađena je u laboratoriji odeljenja Biohemija i Enzimsko inženjerstvo, Katedreza primenjene i inženjerske hemije, na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, pod mentorstvom Prof. dr Draginje Perčin i u okviru projekata Ministarstva za nauku Republike Srbije OŠ 142046.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru Prof. dr Draginji Perčin na ukazanom poverenju, prenesenom znanju, brojnim savetima i pomoći koje mi je pružila od prvog dana naše saradnje. Veliko hvala i na idejama i strpljivoj podršci tokom izrade doktorske disertacije, kao i na pruženoj kreativnoj slobodi tokom rada na disertaciji.

Najsrdanije se zahvaljujem Prof. dr Veri Lazić za ogromnu podršku, znanje i pomoć koju mi je pružila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije. Zahvaljujem se i Prof. dr Svetlani Trivić na kritičkom čitanju disertacije i dragocenim savetima i sugestijama.

Posebno se zahvaljujem saradnicama dr Ljiljani Popović, dr Žužani Vaštag i Mileni Sanovićna stručnoj pomoći i prijateljstvu. Takođe se zahvaljujem si kolegama sa predmeta Ambalaža i pakovanje na pomoći u izvođenju dela eksperimenata na njihovom odeljenju, kao i na lepim trenucima provedenim tamo.

Koristim ovu priliku da se najsrdačnije se zahvalimi svim drugim kolegama sa Tehnoškog fakulteta na saradnji i pomoći.

Mojoj porodici, posebno Vladimiru, Slavku i Žuku se zahvaljujem na ljubavi, strpljenju i razumevanju.

Spisak publikacija proisteklih neposredno iz rada na doktorskoj disertaciji:

1. **Popović S.**, Lazić V., Popović Lj., Vaštag Ž., Peričin, D. (2010). Effect of the addition of pumpkin oil cake to gelatine to produce biodegradable composite films. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 1184-119.
2. **Popović, S.**, Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, Lj., Lazić, V. (2011). Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 470-476.
3. **Popović, S.**, Peričin, D., Vaštag, Ž., Lazić, V., Popović, Lj. (2012). Pumpkin oil cake protein isolate films as potential gas barrier coating. *Journal of Food Engineering*, 110, 374–379.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Cilj disertacije	3
2.OPŠTI DEO	4
2.1 Biorazgradivi filmovi	4
2.1.1 Proteinski filmovi	8
2.2 Postupci dobijanja biorazgradivih filmova	13
2.3 Osobine proteinskih filmova	19
2.3.1 Mehaničke i barijerne osobine.....	19
2.3.2 Fizičko-hemijska i biološka svojstva.....	24
2.3.3 Strukturne osobine.....	34
2.4 Nedostaci i prednosti biorazgradivih filmova na bazi proteina.....	42
2.4.1 Nedostaci biorazgradivih filmova na bazi proteina.....	42
2.4.2 Prednosti biorazgradivih filmova na bazi proteina.....	44
2.5 Tehnike modifikacije i poboljšanja karakteristika biorazgradivih filmova	46
2.6 Dobijanje i osobine kompozitnih filmova	53
2.7 Primena biorazgradivih filmova.....	58
3. MATERIJAL I METODE	60
3.1 Materijali	60
3.2 Priprema proteinskog izolata uljane tikve.....	61
3.3 Priprema biorazgradivih filmova	63
3.4 Ispitivanje fizičko-mehaničkih karakteristika biorazgradivih filmova	65

3.5 Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika biorazgradivih filmova	66
3.6 Ispitivanja antioksidativnog potencijala biorazgradivih filmova	68
3.7 Ispitivanje barijernih svojstava biorazgradivih filmova.....	70
3.8 Ispitivanje strukturnih karakteristika biorazgradivih filmova.....	70
3.9 Statistička obrada podataka.....	71
4. REZULTATI I DISKUSIJA	74
4.1 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova na bazi proteina	74
4.1.1 Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma želatin/pogača uljane tikve	74
4.1.2 Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma na bazi pogača uljane tikve.....	82
4.1.2.1 Izbor plasticizera - uticaj vrste i koncentracije plasticizera na dobijanje biorazgradivog filma na bazi pogača uljane tikve.....	83
4.1.2.2 Ispitivanje uticaja procesnih parametara (temperatura i pH) na dobijanje i karakteristike biorazgradivog filma na bazi pogača uljane tikve	90
4.2 Dobijanje i karakterizacija biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata uljane tikve	103
4.2.1 Modifikacija uslova dobijanja i karakteristika biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata uljane tikve	113
4.2.1.1 Umrežavanje enzimom transglutaminaza.....	113
4.2.1.2 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve /hitozan	117
4.2.1.3 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve /hitozan sa transglutaminazom	122
5. ZAKLJUČAK.....	126
6. LITERATURA.....	129
PRILOG	157

SKRAĆENICE

AA(%) - antiradikalska aktivnost

AA_{DPPH} - antiradikalska aktivnost rastvorenog dela biorazgradivog filma prema slobodnim DPPH[•] radikalima

AA_{ABTS}^{+•} - antiradikalska aktivnost rastvorljivih proteina prema ABTS^{•+} radikal katjonu

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

[ABTS]_{H₂O} – apsorbanca u slepoj probi

[ABTS]_t - apsorbanca u probi sa rastvorljivim proteinima iz filma (t=10 min).

ACE - angiotensin I konvertujućí enzime

AM – antimikrobni

ASAE - ameriĉko udruženje inženjera poljoprivrede

ASTM - ameriĉko udruženje za testiranje i materijale

ATR - atenuacija totalne refleksije

a_w - aktivnost vode

BHT – butilovani hidroksitoluen

BOPP – biaksijalno orijentisani polipropilen

BSA - goveđi serum albumin

CMC - karboksimetil celuloza

D - proizvod koeficijenta difuzije

DMA - dinamiĉko-mehaniĉka analiza

DPPH[•] - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

[DPPH]_{H₂O} - koncentracija DPPH[•] radikala u slepoj probi

[DPPH]_t - koncentracija DPPH[•] radikala u probi sa rastvorljivim proteinima filma

DSC - diferencijalna skening kalorimetrija

EB - izduženje pri kidanju

EC50 - efektivna koncentracija

EDTA - etilendiamintetrasirĉetna kiselina

EG - etilen glikol

EVOH - etilen vinil alkohol kopolimer

FA - formaldehid

FTIR - infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Gli – glioksal

GTA - glutaraldehid

HDPE - polietilen visoke gustine
LDPE - polietilen male gustine
M - sadržaj vlage
MSI - izotrema sorpcije vlage
NMR – nuklearno magnetno rezonantna spektroskopija
OTR - brzina propustljivosti kiseonika
P - koeficijent propustljivosti
PC – proteinski koncentrat
PE – polietilen
PEG - polietilen glikol
PG - propilen glikol
PHAs - polihidroksialkonoati
PLA – polimlečna kiselina
PS - koncentracija rastvorljivih proteina
PVC - poli(vinil hlorid)
PVDC – poli(viniliden hlorid)
PI – proteinski izolat
PI PuOC - proteinski izolat uljane tikve
PPI – proteinski izolat kikirikija
PuOC - pogača uljane tikve
RH - relativna vlaga
RSM - metoda odzivnih površina
S - rastvorljivost
SC - natrijum kazeinat
SD - standardna devijacija
SEM - elektron skenirajuća mikroskopija
SPI – sojin protinski izolat
Td - temperatura denaturacije
Tg - temperatura staklastog stanja
TGaza - transglutaminaza
Tm - početna temperatura
TMA - termo-mehanička analiza
TS - zatezna jačina
TSM - ukupna rastvorljivost filma

WC - sadržaj vlage

WG - pšenični gluten

WPI - proteinski izolat surutke

WVTR - brzina propustljivosti vodene pare

x – realna vrednost odabrane promenljive

X - kodirana vrednost promenljive

x_{max} - realne maksimalne vrednosti promenljivih

x_{min} - realne minimalne vrednosti promenljivih

Y - Young-ov modul elastičnosti

1. Uvod

Sa povećanjem broja stanovništva i ograničenosti resursa i ugrožavanja životne sredine, upotreba biopolimernih materijala za proizvodnju jestivih i biorazgradivih filmova, koji mogu poboljšati kvalitet proizvoda i/ili smanjiti problem otpada, intenzivno se istražuje. Obnovljive sirovine i agroindustrijski otpad se izdvajaju kao ključna alternativa konvencionalnim sintetičkim materijalima. Zbog svoje niske cene, predstavljaju odličan izvor biorazgradivih polimera, pogodnim za produkciju biorazgradivih i jestivih filmova, a takođe rešavaju problem odlaganja otpada, konverzijom u korisne proizvode.

Biopolimeri dobijeni iz agroindustrijskih izvora postaju ključna alternativa konvencionalnim materijalima, ne samo kao biorazgradivi ambalažni materijali, već i kao poljoprivredna oprema, oprema za automobile, pomorska infrastruktura, a primenu su našli i u civilnom inženjerstvu. Mnoge napredne tehnologije primenjuju bioplastiku za različite vidove valorizacije, uključujući tehnologiju aktivnog pakovanja, ojačavanje prirodnih vlakana, imobilizaciju enzima, nanotehnologije i dizajn inovativnih proizvoda. Upotreba ovih materijala u mnogome rešava problem otpada i zagađenja pa je, zbog povećane ekološke svesti, poslednjih decenija sve veći interes za proizvodnjom bioplastike u vidu jestivih i biorazgradivih filmova. Na ovaj način, kao i zbog dostupnosti i niske cene, obnovljive sirovine i agroindustrijski otpad predstavljaju odličan izvor biorazgradivih polimera.

Jestivi i/ili biorazgradivi filmovi se proučavaju u cilju primene za pakovanje hrane i farmaceutskih proizvoda, zbog njihove mogućnosti da štite proizvod od zagađenja, da u sebi nose aktivne komponente – enzime, antimikrobne i antioksidantne agense, pojačivače ukusa i mirisa i da zadrže mehanički integritet upakovanog sadržaja. U odnosu na konvencionalne nejestive polimere, imaju brojne prednosti, zbog njihove biorazgradivosti i sve više nalaze praktičnu primenu u pakovanju hrane i produženju njenog roka trajanja, ali i u farmaceutskoj industriji i dr. Sojini proteini, proteini surutke, pšenični gluten, kukuruzni zein, želatin, ali i celuloza, škrob i njihovi derivati, hitozan, karagenan i alginati, samo su neki od prirodnih polimera koji se koriste za proizvodnju biorazgradivih filmova. Jestivi i/ili biorazgradivi filmovi, mogu se proizvesti i kombinacijom dva ili više polimera. Takvi filmovi mogu biti kompozitni ili laminatni, dobijeni iz smeše više polimera ili laminiranjem jednog polimera drugim. Interakcija protein-protein ili protein-polisaharid su najčešće prisutne pri formiranju kompozitnih biofilmova. Zbog svog hemijskog sastava, agro-industrijski nuzproizvodi, bogati proteinima, polisaharidima i lipidima, predstavljaju pravi potencijal u proizvodnji ekološki prihvatljive plastike.

Prema biorazgradivosti, proteinski filmovi spadaju u grupu „brzo“ razgradivih. Zbog toga je njihova primena u proizvodnji bioplastike posebno interesantna. Dobijeni materijali imaju širok opseg primene, uslovljene jedinstvenom strukturom svakog proteina. Funkcionalnost proteinskih filmova je određena njihovom mikrostrukturom, koja izvorno zavisi od inicijalne strukture proteina i primenjene metode dobijanja. Vrsta i broj veza koje učestvuju u stabilizaciji proteinskog matriksa (disulfidne kovalentne veze, vodonične veze, elektrostatičko privlačenje i hidrofobne veze) su dirigovane amino-kiselinskim sastavom proteina, kao i uslovima same pripreme filma. Interakcija protein-protein određuje stepen umreženosti i hidrofilni/hidrofobni karakter filma, ali i njegove fizičko-hemijske, mehaničke i barijerne karakteristike.

Zbog svog hemijskog sastava i strukture, proteini formiraju odlične filmove koji predstavljaju dobru barijeru za kiseonik, arome i ulja, pri niskim ili srednjim vrednostima relativne vlažnosti, slično najboljim sintetičkim filmovima. Mehanička svojstva proteinskih filmova su, generalno, lošija od osobina sintetičkih i polisaharidnih filmova, ali su zadovoljavajuće za većinu aplikacija i mogu se poboljšati različitim metodama modifikacije. Modifikovanjem proteinske strukture i/ili interakcijom između molekula proteina i drugih polimera, mogu se znatno poboljšati karakteristike dobijenog filma. To se može postići uvođenjem polisaharida ili hidrofobnih materijala (lipida ili voskova), a prisustvo plastifikatora je neophodno, jer smanjuju krtost filma. Na strukturu proteina i međusobnu interakciju utiču i enzimi, npr. transglutaminaze, a karakter formiranih veza određuje se primenom savremenih metoda indentifikacije: elektron skenirajuće mikroskopije, diferencijalne skening kalorimetrije, gasne hromatografije, Furije transformišuće infracrvene spektroskopije i SDS-gel elektroforezom.

Veliki broj istraživanja je posvećen formiranju filmova od različitih proteina i kvantifikaciji svojstava dobijenih proteinskih filmova.

Značajan napredak u produkciji biorazgradivih filmova ostvaren je zamenom formiranja filmova metodom razlivanja (vlažni metod), metodom termoplastičnog procesuiranja tj. ekstruzijom (suvi metod). Primena suvog metoda dobijanja biorazgradivih filmova zahteva širok spektar istraživanja, od termičkih svojstva proteina bitnih za ekstrudiranje, do optimalnih uslova za formiranje filmova odgovarajućih svojstva. Takva mogućnost je od suštinskog značaja za maksimiziranje potencijala proteinskih filmova i sličnih biorazgradivih proizvoda.

1.1 Cilj disertacije

Cilj disertacije je produkcija novih biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Prateći svetske trendove u proizvodnji biorazgradivih materijala, dobijanje ekološki prihvatljivih polimera od sekundarnih sirovina poljoprivrede i prehrambene industrije, ne samo da zadovoljava zahteve potrošača, nego i rešava problem odlaganja i deponovanja nutritivno vrednih nuzproizvoda agro-industrije. Takođe, zamenom skupih sirovina jeftinijim i dostupnijim, ali i kombinovanjem više različitih polimera, dobijaju se kvalitetniji i ekonomski pogodniji proizvodi. Pri izučavanju procesa dobijanje novih biorazgradivih kompozitnih filmova, primenjena je cela pogača uljane tikve golice i njen proteinski izolat. Za dobijanje kompozitnih filmova primenjen je vlažni postupak, tj. „casting method“. Hemijskom i enzimskom modifikacijom postupka dobijanja, ispitana je mogućnost optimizovanja uslova neophodnih za dobijanje filmova i poboljšanje osobina proteinskih kompozitnih filmova. S obzirom na velik broj procesnih parametara koji utiču na formiranje filma (temperatura, pH, količina i vrsta dodatog plastifikatora), kao i na osobine formiranih filmova, neophodno je bilo ispitati međusobno delovanje više faktora na mogućnost same produkcije i osobine dobijenog filma. Odabir i optimizacija procesnih parametara i modelovanje produkcije filmova izvedena je implementiranjem nove kompjuterske i analitičke metodologije. Izvršena su ispitivanja osobina značajnih za potencijalnu primenu dobijenih filmova, koje podrazumevaju fizičko-mehaničke osobine (debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju), barijerne (propustljivost gasova) i fizičko-hemijske karakteristike (rastvorljivost, količina rastvorljivih proteina, biološka aktivnost u vidu antioksidantne aktivnosti). Dodatkom enzima – transglutaminaze i/ili dodatkom drugog biopolimera, tipa polisaharida, rađeno je na poboljšanju karakteristika dobijenih filmova. Istraživanja su vođena i u smeru karakterizacije strukture nastalih filmova, primenom metoda elektron skenirajuće mikroskopije, diferencijalne skening kalorimetrije i infracrvene spektrofotometrije.

2. Opšti deo

2.1 Biorazgradivi filmovi

BIORAZGRADIVI FILMOVI predstavljaju prirodne materijale koji se u relativno kratkom vremenskom periodu razlažu na ugljen dioksid, vodu, metan ili biomasu, delovanjem kiseonika, mikroorganizama i/ili enzima.

Filmovi mogu biti jestivi i/ili biorazgradivi, u zavisnosti od formulacije, metode formiranja, i uslova formiranja. Kada se za proizvodnju filmova koriste proteini za humanu ishranu i prehrambeni aditivi (npr. plasticizeri, kiseline ili baze, soli i enzimi), a usled termičkog tretmana, pH modifikacije, dodatka soli, enzimske modifikacije itd., dolazi samo da promene proteina i gubitka vode, dobijeni filmovi spadaju u grupu jestivih (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997). Jestivi filmovi su biorazgradivi. Međutim, jestivost se gubi kada protein reaguje sa nejestivim hemikalijama, pre ili za vreme formiranja filma (npr. hemijsko ugrađivanje različitih molekula), ili kada se dodaju nejestive komponente u film. Biorazgradivi filmovi za pakovanje hrane i farmaceutskih proizvoda moraju biti pouzdani za takvu upotrebu, moraju biti jestivi i biorazgradivi (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997). Izazov kojem moraju odgovoriti biorazgradivi filmovi je da zadrže svoje osobine i da obavljaju svoju funkciju bezbedno i efikasno u željenom vremenskom periodu. Tek posle isteka roka upotrebe upakovanog proizvoda ili određenog vremena primene filma, biorazgradivost treba da nastupi. Pod biorazgradivošću filmova podrazumeva se da potpuno degradiraju u prisustvu mikroorganizama, u procesu kompostiranja, do ugljen-dioksida, vode, metana, i jednog dela ostatka u vidu biomase (Anonymous, 1993). Toplo, vlažno okruženje, uz odgovarajući pH, hranljive materije, kiseonik i vreme potrebno za rast mikroorganizama neophodno je da bi proces biorazgradnje bio uspešan.

Poreklo i sastav biorazgradivih filmova

Biorazgradivi filmovi predstavljaju smešu polimera velikih molekulskih masa, rastvarača i plasticizera. Različiti dodaci, kao što su antimikrobne komponente, antioksidanti, pojačivači ukusa, boje i dr. mogu biti inkorporirani, u cilju poboljšanja njihove funkcije (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997). Biorazgradivi filmovi, koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, proizvode se od jestivih polimera i prehrambenih aditiva, pa pored biorazgradivosti imaju i osobinu jestivih polimera. Za dobijanje biorazgradivih filmova primenjuju se komponente klasifikovane u tri kategorije: hidrokoloide (proteini i polisaharidi),

lipidi (masne kiseline, acilgliceroli i voskovi) i kompoziti (mogu biti kombinacija više hidrokoloida ili hidrokolida i lipida). Plasticizeri i drugi aditivi se kombinuju sa filmogenim biopolimerima u cilju modifikacije fizičkih karakteristika i funkcija filma. Kod jestivih biorazgradivih filmova, vrsta rastvarača je ograničena na vodu i etanol (Giancone, 2006).

Materijali koji se koriste za proizvodnju biorazgradivih filmova se mogu podeliti na prirodne (biopolimeri) i fosilne - neobnovljive polimere (Flieger, 2003). *Prirodni polimeri (biopolimeri)* su proizvedeni od obnovljivih ili prirodnih resursa, dok se *fosilni ili neobnovljivi* dobijaju sintetički iz ulja.

Biopolimeri se, prema njihovom poreklu i načinu proizvodnje, mogu podeliti na: 1) polimere ekstrahovane/izolovane direktno iz biomase; 2) polimere proizvedene klasičnim hemijskim sintezama od biomonomera i 3) polimere dobijene direktno iz prirodnih ili genetički modifikovanih organizama (Weber *i sar.*, 2000).

1) Polimeri ekstrahovani/izolovani direktno iz biomase

Ova kategorija biopolimera je najviše prisutna i eksploatisana. Polimeri ove kategorije dobijaju se od biljaka, morskih i domaćih životinja. Primeri su polisaharidi: celuloza, skrob i hitin; proteini: kazein i gluten. Ovi materijali imaju dobra barijerna svojstva za gasove, ali su veoma hidrofilni.

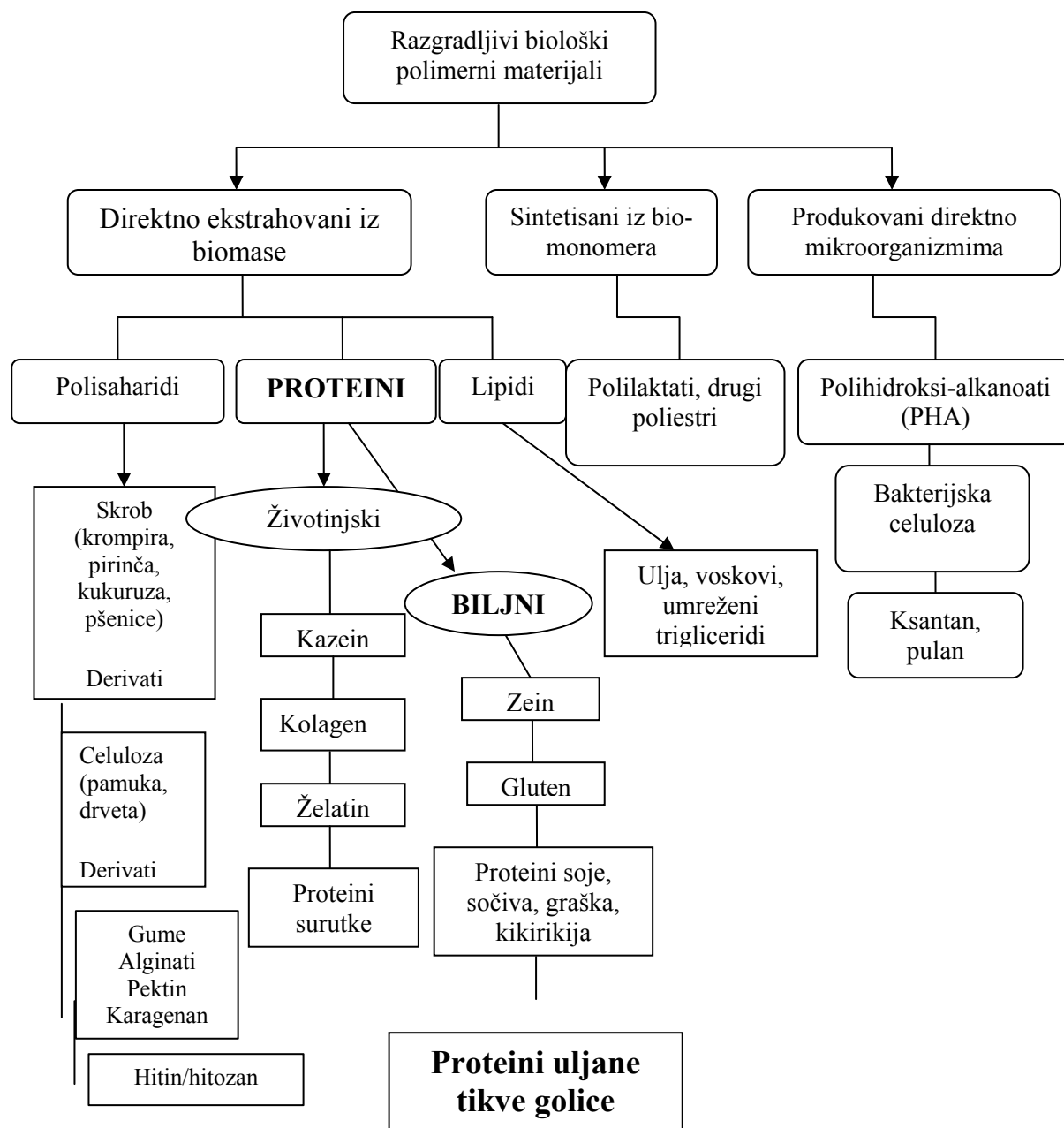
2) Polimeri proizvedeni klasičnim hemijskim sintezama od biomonomera

Hemijskom sintezom moguće je dobiti veliki broj biopoliestara. Teorijski, svi dosadašnji polimerni materijali mogu se zameniti novim vrstama dobijenim od obnovljivih monomera, ali je pitanje ekonomske opravdanosti. Najpoznatiji biopolimer iz ove grupe je polimlečna kiselina (eng. polilactic acid - PLA). Monomer polimlečne kiseline je mlečna kiselina koja se lako može dobiti fermentacijom iz ugljenohidratne sirovine. Kao izvor ugljenih hidrata može se koristiti kukuruz, pšenica ili alternativno surutka i šećerni sirup. PLA se može formirati u vidu folija, termoformiranih posuda ili raspršivanjem ukomponovati u kombinovane materijale.

3) Polimeri dobijeni direktno iz prirodnih ili genetički modifikovanih organizama

Ove polimere akumuliraju mnoge bakterije kao izvor energije i kao rezerve ugljenika. U ovu grupu spadaju polihidroksialkonoati (PHAs) i bakterijska celuloza. Njihove osobine najviše su povezane sa osobinama monomera od kojih su izgrađeni što omogućava široku lepezu različitih biopolimera koji se mogu sintetisati pomoću mikrobiološke fermentacije. Najčešće je u upotrebi derivat polihidroksibutirat.

Šematski prikaz vrsta biopolimera dat je na *Slici 1*.



Slika 1. Šematski prikaz vrsta i porekla biopolimera

Generalno, u poređenju sa konvencionalnim sintetičkim polimerima, dobijenim iz mineralnih ulja, biopolimeri imaju složeniju hemijsku strukturu i arhitekturu bočnih lanaca, dajući materijalu veće mogućnosti za formiranje krajnjeg proizvoda (Weber *i sar.*, 2000).

U cilju primene za dobijanje biorazgradivih filmova, čija je aplikacija moguća za pakovanje prehrambenih proizvoda, u proizvodnji omotača i kapsula u farmaceutskoj industriji itd., najviše proučavani biopolimeri su oni ekstrahovani direktno iz biomase.

Najpristupačniji i najviše eksploatisani biopolimeri, dobijeni iz morskih plodova, životinja i biljaka, u osnovi su lipidi i hidrokoloide.

Lipidi se već dugi niz godina koriste kao zaštitni omotači, ali obzirom da oni nisu polimeri, nemaju sposobnost da grade koherentne samostalne filmove. Mogu da poboljšaju sjaj površine polimera i, pošto su uglavnom nepolarne supstance, poboljšavaju barijerna svojstva prema vodi. Voskovi, kao što su karnaube vosak i parafin, i razne vrste lipida iz povrća koriste se u komercijalne svrhe još od tridesetih godina XX veka, kao omotači svežeg voća i povrća. Generalno, filmovi na bazi voskova imaju najveći stepen otpornosti prema migraciji vlage u odnosu na sve druge lipidne i nelipidne filmove. Filmovi na bazi voskova, masti i ulja se veoma teško primenjuju zbog svoje debljine i masne površine, a mogu imati i izražen ukus na mast.

Mono-, di- i triacilgliceroli su mono-, di- i triestri glicerola sa masnim kiselinama i koriste se kao omotači. Ove filmove karakterišu nezadovoljavajuće senzorne osobine, tendencija ka lomljenju prilikom skladištenja u uslovima hlađenja i zamrzavanja, apsorpcija stranih mirisa, i ostavljanje neprijatnog kiselog ili gorkog ukusa.

Hidrokoloidi – proteini i polisaharidi predstavljaju molekule izraženih filmogenih karakteristika i imaju široku primenu za dobijanje biorazgradivih filmova. Filmovi na bazi hidrokoloida se mogu primenjivati kada barijera prema vodenoj pari nije ključna. Ovi filmovi imaju odlična barijerna svojstva prema gasovima i lipidima. Većina ima dobre mehaničke karakteristike pa se primenjuju za poboljšanje strukturnog integriteta lomljivih i krutih proizvoda. Zagrevanjem hidrokoloidni filmovi se rastvaraju i, većina, ne utiče na senzorna svojstva upakovanog proizvoda (hrane ili leka) (Giancone, 2006).

Hidrokoloidi se klasifikuju prema sastavu, naelektrisanju molekula i rastvorljivosti u vodi. Prema sastavu dele se na proteine i polisaharide (Giancone, 2006). Za formiranje filmova, od velikog značaja je i naelektrisanje hidrokoloida, pa su zato neki hidrokoloidi npr. proteini osetljivi na promenu pH. U cilju primene hidrokoloidnih filmova, u nekim slučajevima neophodno je kombinovati molekule suprotnih naelektrisanja (Giancone, 2006).

Polisaharidi su prirodni polimeri. Polisaharidi i njihovi derivati imaju široku primenu u proizvodnji biorazgradivih filmova. To su, pre svih, alginati, pektini, hitozan, karagenani, skrob, hidrolizati skroba i derivati celuloze (Weber *i sar.*, 2000). Zbog hidrofilne prirode ovih molekula, njihova primena je ograničena jer pokazuju slaba barijerna svojstva prema vodi. Ipak, u slučaju kada je neophodno održati vlažnost proizvoda, filmovi na bazi polisaharida predstavljaju dobar izbor (Kester i Fennema, 1986).

Proteini se, prema poreklu, mogu podeliti na proteine biljnog (gluten, zein, proteini soje, graška, kukuruza) i životinjskog porekla (kazein, kolagen, želatin, keratin).

Proteini obuhvataju širok opseg polimernih materija koje pružaju strukturnu i biološku aktivnost biljkama i životinjama. Za razliku od polisaharida, proteini se sastoje od aminokiselina, povezanih peptidnim vezama. Međutim, zbog prisustva bočnih grupa vezanih za α -ugljenikov atom, aminokiseline se međusobno povezuju, stvarajući veliki broj proteina, različite veličine, strukture i funkcije.

Većina proteina se sastoji od oko 100 - 500 aminokiselinskih ostataka. Zavisno od redosleda aminokiselina (primarna struktura), njihovog povezivanja vodoničnim, van der Valsovim, elektrostatičkim, hidrofobnim i disulfidnim vezama (sekundarna, tercijarna i kvartenarna struktura), formiraju se fibrilarni ili globularni molekuli, različite strukture i aktivnosti. Generalno, hemijska reaktivnost proteina zavisi od aminokiselinskog sastava, broja slobodnih amino i karboksilnih grupa i broja i vrste bočnih ostataka. Najreaktivniji bočni ostaci su serinski, hidroskiprolinski, treoninski, tirozinski, glutaminski, lizinski i argininski.

Viši nivoi uređenosti molekula proteina mogu biti narušeni delovanjem različitih faktora (fizički i hemijski agensi, toplota, pritisak, zračenje itd.) (Cheftel *i sar.*, 1985). Delovanjem spoljašnjih agenasa menja se konformacija proteina, interakcija i aktivnost, što se često koristi kod produkcije biorazgradivih proteinskih filmova (Ou *i sar.*, 2005).

2.1.1 Proteinski filmovi

Veliki broj proteina privlači pažnju zbog svojih filmogenih sposobnosti. Sojini proteini (Kokoszka *i sar.*, 2010; Mauri i Añón; 2008), proteini surutke (Wang *i sar.*, 2008), pšenični gluten (Lim *i sar.*, 2002), kukuruzni zein (Gillgren i Stading, 2008), želatin (Wang *i sar.*, 2009), kazein (Mendes de Souza *i sar.*, 2010), proteini kikirikija, graška, sočiva (Liu *i sar.*, 2004; Bamdad *i sar.*, 2006; Kowalczyk i Baraniak, 2011) itd. uspešno se koriste za proizvodnju biorazgradivih polimera.

Filmovi na bazi proteina životinjskog porekla

Filmovi na bazi želatina

Želatin je protein dobijen parcijalnom degradacijom kolagena i zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti i biorazgradivosti pokazuje veliki potencijal kao sirovina za proizvodnju biorazgradivih filmova (Jongjareonrak *i sar.*, 2006a, b). Postoji dva tipa želatina - A i B, u zavisnosti da li priprema uključuje ili ne kiseli ili alkalni predtretman, čime se konvertuju asparaginski i glutaminski ostaci u odgovarajuće kiseline, rezultujući povećanim viskozitetom

(Zhao *i sar.*, 2008). Kiseli predtretman (želatin tipa A) se primenjuje uglavnom na želatin dobijen iz kože svinja, a alkalni (želatin tipa B) kod želatina izolovanog iz kostiju životinja. Postupak dobijanja želatina iz kolagena obuhvata dve faze: (1) termičku denaturaciju, na 40°C, čime se raskidaju vodonične i elektrostatičke veze, i (2) hidrolitičku razgradnju kovalentnih veza (Eastoe i Leach, 1977).

Želatin pokazuje odlične osobine neophodne za formiranje filmova, a dobijeni filmovi imaju dobre mehaničke karakteristike. Treba istaći da je želatin jedinstven među hidrokolidima po tome što formira termo-reverzibilne filmove, sa tačkom topljenja bliskoj telesnoj temperaturi, što je posebno značajno kod proizvodnje jestivih i filmova za farmaceutsku upotrebu (Achet i He, 1995). Istraživanja govore o velikim mogućnostima produkcije želatinskih jestivih filmova ali i kompozitnih filmova, kojima je jedna od komponenti želatin tipa A (Denavi *i sar.*, 2009; Gomez-Estaca *i sar.*, 2009a; Wang *i sar.*, 2009) ili želatin tipa B (Cao *i sar.*, 2009).

Filmovi na bazi kazeina

Kazein je protein dobijen iz mleka. Sastoji se iz četiri glavne podjedinice: alfa s1-kazein, alfa s2-kazein, beta-kazein i kapa-kazein, koje predstavljaju 38%, 10%, 36% i 13% udela kazeina (Audic *i sar.*, 2003). Alfa s1 je Ca^{2+} zavisna podjedinica, molekule mase 23.6 kDa. Alfa s2 i beta-kazein su, takođe, Ca^{2+} zavisne podjedinice, za razliku od kapa-kazeina koji nije osetljiv na kalcijumove jone (Audic *i sar.*, 2003). Lako se procesira zahvaljujući svojoj nasumično namotanoj strukturi. U prisustvu plasticizera, na temperaturama od 80 do 100 °C, proizvodi filmove različitih mehaničkih karakteristika, od krutih do elastičnih (Tang i Jiang, 2007; Mendes de Souza *i sar.*, 2010). Rastop proteina je visoko rastegljiv što omogućava razvlačenje filmova i laku manipulaciju. Filmovi proizvedeni od kazeina su mutni. Kazein se ne rastvara direktno u vodi, ali pokazuje porast mase za 50%, bubrenjem u vodi, u toku 24 h (van Tuil *i sar.*, 2000). Glavni nedostatak kazeina je njegova relativno visoka cena.

Filmovi na bazi proteina surutke

Proteini surutke predstavljaju nuzproizvod u industriji proizvodnje sira i predstavljaju smešu nekoliko pojedinačnih proteina: β -laktoglobulin, α -laktalbumin, goveđi serum albumin (eng. Bovine Serum Albumin - BSA) i imunoglobulini (Kinsella, 1984). Proteini surutke se razlikuju od kazeina po negativnom naelektrisanju molekula. Sadrže

unifromno raspoređene hidrofobne, polarne i naelektrisane amino kiseline (Dangaran *i sar.*, 2009).

Beta-laktoglobulin je protein molekulske mase 18.3 kDa, koji sadrži oko 160 amino kiselina, u zavisnosti od genetičkog varijeteta, i predstavlja 48-58% ukupnih proteina surutke. Ne denaturiše usled promene pH, ali je temolabilan. Ima mali udeo tirozinskih ostataka (Etzell, 2004), pa ima ograničenu mogućnost umrežavanja preko bi-tirozinskih veza, koje se inače formiraju kada je protein izložen tretmanu zračenja.

Alfa-laktalbumin je drugi po zastupljenosti protein surutke, i predstavlja 13-19% ukupnih proteina surutke, molekulske mase 14.2 kDa. Sadrži četiri interna disulfidna mosta. BSA je najveći molekul među proteinima surutke, sastavljen iz jednog lanca, molekulske mase 66 kDa, a imunoglobulini predstavljaju mešavinu nekoliko, vrlo termolabilnih proteina.

Proteini surutke imaju relativno visoku nutritivnu vrednost, dostupni su u velikoj količini i u znatnoj meri ispitani kao sirovina za proizvodnju jestivih omotača i filmova (Gouna *i sar.*, 2007; Wang *i sar.*, 2008; Ferreira *i sar.*, 2009). Lako se procesuiraju i uz određenu modifikaciju imaju potencijal za primenu kao spoljni omotači, u cilju smanjenja osetljivosti na vlagu. S obzirom na dostupnost i dobre karakteristike filmova, iskorišćenje proteina surutke za pravljenje biorazgradivih filmova predstavlja logičnu strategiju.

Filmovi na bazi proteini biljnog porekla

Filmovi na bazi zeina

Zein obuhvata grupu proteina rastvorljivih u alkoholu, izolovanih iz endosperma kukuruza. Komercijalni zein je nuzproizvod kukuruzne mlinske industrije. Zein poseduje visoki procenat nepolarnih i mali udeo baznih i kiselih aminokiselina (Dangaran *i sar.*, 2009). Tri najzastupljenije aminokiseline u zeinu su glutamin (21-26%), leucin (20) i prolin (10%) (Shukla i Cheryan, 2001). Glavne frakcije zeina predstavljaju alfa-zein i beta-zein. Alfa-zein je rastvorljiv u 95% etanolu, i čini oko 80% ukupnih prolamina kukuruza, dok je beta-zein rastvorljiv u 60% etanolu. U molekulu zeina dominantna je helikoidna sekundarna struktura (Shukla i Cheryan, 2001).

Mogućnost zeina da formira biorazgradive filmove poznata je decenijama i predstavlja najčešći vid primene ovog proteina (Andres, 1984; Padua *i sar.*, 2000). Danas se zein, uglavnom, koristi za proizvodnju omotača za prehrambene i farmaceutske proizvode. Filmovi se mogu formirati izlivanjem, izvlačenjem i ekstruzijom (Lai i Padua, 1997; Ha, 1999). Dobijeni filmovi su kruti i neophodno je dodavanje plasticizera (van Tuil *i sar.*, 2000).

U poslednje vreme, sve se više prave kompozitni filmovi na bazi zeina: zein/mlečni proteini (Oh *i sar.*, 2004), zeina/proteini surutke (Ghanbarzadeh i Oromiehi, 2008a) itd. Veliki je broj radova koji govore o inkorporiranju aktivnih komponenti u zeinske filmove, čime se povećava njihovo antimikrobno i antioksidantno delovanje (Hoffman *i sar.*, 2001; Güçbilmez *i sar.*, 2007).

Filmovi na bazi glutena

Gluten (eng. Wheat Gluten – WG) je glavni rezervni protein pšenice. Sadrži mali udeo naelektrisanih amniokiselina (lizin, histidin i arginin) i veći deo nepolarnih aminokiselina, koje agregiraju zahvaljujući hidrofobnim interakcijama (Haard i Chism, 1996). Postoje četiri frakcije proteina pšenice, klasifikovane prema rastvorljivosti: albumini (rastvorljivi u vodi), globulini (rastvorljivi u razblaženim rastvorlima soli), gliadini (rastvorljivi u 70-90% etanolu) i glutenini (nerastvorni pod predhodno pomenutim uslovima) (Haard i Chism, 1996).

Glutenin i gliadin su glavne komponente proteina pšeničnog brašna, čineći redom do 47, odnosno 34% ukupnih proteina pšenice (Kinsella, 1982). Glutenin je mešavina proteina, molekulskih masa od 100 do 1000 kDa, u zavisnosti od broja intermolekularnih disulfidnih veza. Gliadin predstavlja jednostruki lanac, molekulske mase 40kDa, sastavljen iz četiri frakcije: ω_5 , $\omega_{1,2}$, α/β , γ , gde su α/β i γ povezani intramolekularnim disulfidnim mostovima (Kinsella, 1982). Ove frakcije imaju značajnu ulogu u formiranju filmova, njihovoj jačini i elastičnosti.

Vodeni rastvor etanola se najčešće koristi kao rastvarač glutena, pri dobijanju biorazgradivih filmova. Alkalna i bazna sredina, takođe, mogu omogućiti formiranje filmova, ali su njihove karakteristike lošije u odnosu na filmove dobijene iz etanolnog rastvora glutena (Zhang i Mittal, 2010). Mehaničkim tretmanom glutena, obrazuju se disulfidni mostovi između cisteinskih ostataka, aminokiseline koja je relativno dobro zastupljena u glutenu. Disulfidne veze su te koje su odgovorne za formiranje snažnog, visko-elastičnog i voluminoznog testa, što otežava procesuiranje glutena. Za razliku od kazeina, disulfidni mostovi u glutenu moraju biti redukovani odgovarajućim agensima, radi dalje jednostavnije primene. Optimalna procesna temperatura, u zavisnosti od prisutnog plasticizera, je 70 – 100 °C, a mehaničke osobine dobijenih filmova mogu varirati slično kao kod kazeina (od krutih do elastičnih). „Glutenska plastika“ ima visoku staklastost (slično polipropilenu) i pod

određenim uslovima, pokazuje dobru otpornost prema vodi (van Tuil *i sar.*, 2000). Filmovi na bazi glutena su nerastvorni u vodi, ali je dobro apsorbuju.

Filmovi na bazi proteina uljane repice

Saćma uljane repice predstavlja nuzporizvod koji zaostaje nakon dobijanja ulja iz zrna repice i sa 40% proteina pruža veliki potencijal kao sekundarna sirovina. Proteini zaostali u saćmi interesantna su sirovina za dobijanje biorazgradivih filmova, s obzirom na slabo iskorišćenje zbog male rastvorljivosti (Larré *i sar.*, 2006). Još 1998. Wäsche *i sar.*, ukazali su na filmogena svojstva proteinskog izolata uljane repice. U studiji o proteinima uljane repice, Krause *i sar.* (2007), potvrđuju njihovu sposobnost da obrazuju biorazgradive filmove. Dok literaturni podaci iz 2011 (Jang *i sar.*, 2011a, b) detaljnije prikazuju mehaničke karakteristike jestivih filmova na bazi proteina uljane repice, ali idu i korak dalje i daju rezultate uticaja dobijenih filmova na kvalitet „Maehyang“ malina upakovanih u film.

Filmovi na bazi proteina soje

Proteini soje su dostupni kao komercijalni preparati – sojino brašno, koncentrat (eng. Protein Concentrate – PC) i proteinski izolat soje (eng. Soy Protein Isolate - SPI), koji se međusobno razlikuju u sadržaju proteina. Proteini soje se sastoje iz dve glavne proteinske komponente, poznate kao frakcije 7S (konglicinin, 35%, molekulske mase 140-170 kDa) i 11S (glicinin, 52%, 340-375 kDa). Glicinin je sastavljen iz šest AB podjedinica, gde ja A kiseli, a B bazni polipeptid, povezani međusobno disulfidnim vezama. Obe komponente sadrže cisteinske ostatke, koji omogućuju formiranje disulfidnih mostova, s toga je procesuiranje proteina soje slično glutenu, gde se formiraju filmovi sličnih mehaničkih osobina. Filmovi na bazi proteina soje, kao i glutenski, su nerastvorni u vodi (van Tuil *i sar.*, 2000). Od svih preparata proteina soje, najbolje rezultate daje proteinski izolat (sadrži u proseku 90% proteina), pa je i najveći broj istraživanja baziran na produkciji biorazgradivih filmova na bazi SPI (Cao *i sar.*, 2007; Mauri i Añón; 2008; Denavi *i sar.*, 2009; Jia *i sar.*, 2009; Kokoszka *i sar.*, 2010; Su *i sar.*, 2010). Biorazgradivi filmovi na bazi SPI dobijeni su vlažnim (eng. Casting) (Mauri i Añón, 2008; Sivarooban *i sar.*, 2008; Kokoszka *i sar.*, 2010) ili suvim (eng. Extrusion) postupkom (Kumar i Zhang, 2009; Mohanty *i sar.*, 2005; Verbeek i van den Berg, 2010). Karakteristike filmova modifikovane su inkorporacijom ekstrakata semena grožđa, nisina i etilendiamintetraairćetnom kiselinom (eng. Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA), u cilju poboljšanja antimikrobnog delovanja

(Sivarooban *i sar.*, 2008). Praćen je uticaj koncentracije proteina i glicerola na fizičko-hemijske osobine dobijenih filmova (Kokoszka *i sar.*, 2010); pravljene su kompozitni filmovi na bazi SPI i želatina (Cao *i sar.*, 2007; Denavi *i sar.*, 2009), SPI i karboksimetil celuloze (eng. Carboxymethyl cellulose – CMC) (Su *i sar.*, 2010), sve u cilju optimizacije uslova dobijanja i osobina biorazgradivih filmova, sa primenom u proizvodnji papira, mastila na bazi vode (Swain *i sar.*, 2004), poljoprivredne opreme, automobilske industriji, pomorstvu i civilnom inženjerstvu (Wool *i sar.*, 2000). Potencijalna primena bioplastike na bazi SPI, u proizvodnji kašika, kesa i igračaka uspešno je demonstrirana još krajem prošlog veka (Paetau *i sar.*, 1994; Wang *i sar.*, 1995, 1996).

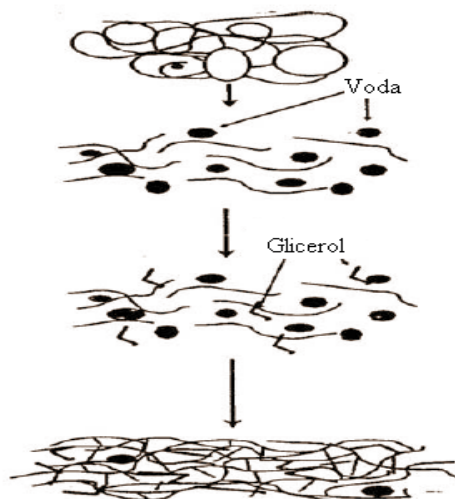
2.2 Postupci dobijanja biorazgradivih filmova

Uslovi dobijanja biorazgradivih filmova imaju značajan efekat na karakteristike dobijenih filmova. Procesuiranje filmova, omotača i drugih materijala na bazi proteina obuhvata 3 faze prikazane na *Slici 2* (Mariquie i Guilbert, 2002).

Faza I: Denaturacija proteina – podrazumeva raskidanje intermolekulskih veza (kovalentnih i nekovalentnih) koje stabilizuju polimernu strukturu u nativnoj formi, korišćenjem fizičkih metoda (rastvaranje ili termički tretman) i/ili hemijskih agenasa, pri čemu proteinski lanci postaju mobilni;

Faza II: Agregacija i orijentacija proteinskih lanaca u željenu formu. Faktori koji utiču na tok agregacije su vrsta proteina i pH vrednost rastvora;

Faza III: Formiranje novih intermolekulskih veza koje stabilizuju trodimenzionalnu strukturu filma. Struktura se stabilizuje hidrofobnom interakcijom, vodoničnim vezama, disulfidnim vezama, itd (Xiong i Brekke, 1989). Operacija obrazovanja matriksa filma podrazumeva primenu tretmana suprotnog od onog u fazi I, odnosno isparavanje rastvarača, hlađenje i umrežavanje.



Slika 2. Mehanizam formiranja filmova (Chinabhark, 2005)

Najčešće primenjivani metod, koji se bazira na predhodno opisanom principu je fizičko-hemijski metod, gde se formiranje filma zasniva na rastvaranju proteina u različitim rastvaračima, kalupljenju rastvora i, na kraju, sušenju. Ovaj proces, poznat kao „Casting“ intenzivno se proučava i primenjuje za proizvodnju proteinskih filmova (Embuscado i Huber, 2009).

Često primenjivani metod za dobijanje biorazgradivih filmova, podrazumeva termoplastično modifikovanje proteina i plasticizera, pri smanjenom sadržaju vlage, tj. ekstrudiranje, injekciono kalupljenje i kalupljenje pod pritiskom (Cuq *i sar.*, 1998).

Dobijanje biorazgradivih omotača i kapsula uključuje potapanje proizvoda u rastvor proteina ili raspršivanje rastvora po površini proizvoda. Ovaj metod zahteva isparavanje rastvarača iz rastvora proteina nakon što je nanet na površinu namirnice.

Razlivanje ili „Casting“ metod

„Casting“ metod podrazumeva rastvaranje ili dispergovanje proteina u odgovarajućem rastvaraču, uglavnom vodi, pri čemu se, ako je potrebno podešava pH i temperatura. Podešavanje pH rastvora proteina može biti važan faktor, jer su proteini osetljivi na promenu pH, zbog velikog broja naelektrisanih grupa. Generalno, dispergovanje i rastvaranje proteina vrši se u alkalnoj sredini jer se time promoviše razmotavanje molekula i povećava dostupnost većeg broja reaktivnih grupa (Swain *i sar.*, 2004). Proteinski filmovi se uglavnom formiraju isparavanjem vode ili vodenog rastvora etanola, iz rastvora proteina. Sa izuzetkom zeina iz kukuruza, pšeničnog glutena, kafirina iz sirka i keratina, većina proteina

koji imaju sposobnost formiranja filmova su rastvorljivi u vodi, odnosno kiselim ili baznom rastvaraču. Filmovi na bazi kukuruznog zeina i pšeničnog glutena moraju biti formirani iz vodeno-etanolnog rastvora ili vodene disperzije proteina. Degazacija je važan korak za eliminisanje prisutnih mehura vazduha iz filmogenog rastvora. Konačno, dobijeni proteinski rastvor se razliva, čime se omogućava isparavanje rastvarača i formiranje filma. Za produkciju filmova "Casting" metodom, rastvor proteina mora biti ravnomerno razliven po površini sa koje će film kasnije biti ukolnjen. Sušenje zagrejanim vazduhom pri niskoj vlažnosti povećava brzinu sušenja. Proizvodnja biorazgradivih filmova koja se bazira na etanolnim rastvorima zahteva odgovarajuće mere bezbednosti i zaštite životne sredine zbog oslobađanja rastvarača u atmosferu. U ovom slučaju, uklanjanje rastvarača predstavlja važan aspekt komercijalne upotrebe.

Optimalan sadržaj vlage suvih filmova je 5 - 10% (Skurtys *i sar.*, 2010). Očuvanje strukture filma zavisi od uslova sušenja (temperatura i relativna vlažnost), debljine razlivenog sloja, sastava filmogenog rastvora i uslova čuvanja filma (temperatura i relativna vlažnost). Generalno, brzo sušenje filmogenog rastvora smanjuje mogućnost formiranja intramolekularnih veza između molekula proteina, jer se isparavanjem rastvarača smanjuje pokretljivost proteinskih lanaca, a time mogućnost njihovog povezivanja (Sperling, 2006). Alcantara *i sar.* (1998) daju podatke o sušenju filmova na različitim temperaturama. Filmovi na bazi proteina surutke, sušeni na 95 °C, bili su tanji, čvršći i manje elastični, u poređenju sa filmovima sušenim na 21 °C. Filmovi dobijeni iz rastvora proteina su uglavnom kruti i najčešće pucaju tokom sušenja. U cilju prevazilaženja toga problema neophodan je dodatak plasticizera (Jongjareonrak *i sar.*, 2006b; Galdeano *i sar.*, 2009; Kokoszka *i sar.*, 2010). Tapia-Blácido *i sar.* (2005a) pratili su simultan efekat temperature sušenja, relativne vlažnosti i koncentracije glicerola na mehaničke osobine filmova na bazi brašna *Amarantha*, a dobijeni rezultati pokazuju da se filmovi sa najboljim mehaničkim osobinama dobijaju pri najnižim ispitanim vrednostima temperature i relativne vlažnosti i pri koncentraciji glicerola od 30% (g/g suve materija).

Plasticizeri

U cilju efikasne primene i rukovanja, biorazgradivi filmovi moraju biti dovoljno elastični i fleksibilni, male krutosti, velike otpornosti i sposobnosti da se ne lome tokom upotrebe i skladištenja (Barreto *i sar.*, 2003). Za poboljšanje osobina biorazgradivih filmova, na bazi proteina, primenjuju se molekuli plasticizera. Plasticizeri su hidrofilne, neisparljive

supstance, male molekulske mase, visokopolarne, sa velikim rastojanjem između polarnih grupa, koji pokazuju veliki plastifikujući efekat na polimerni sistem (Skurtys *i sar.*, 2010). Kako su molekuli proteina sposobni da formiraju velik broj kovalentnih veza, disulfidnih mostova, vodoničnih veza i sl, što rezultuje veoma jakom strukturom koja je veoma krta, i pri najmanjem dejstvu sile dolazi do njenog lomljenja, neophodno je dodati molekule plasticizera koji bivaju inkorporirani u matriks filma, redukujući broj vodoničnih veza između molekula proteina, time smanjujući krtost filma. Budući da su molekuli plasticizera raspoređeni u celoj strukturi matriksa filma - rezultat je pojava savitljivosti i rastegljivosti formiranog filma (Sothornvit i Krochta, 2000a). Neophodna količina plasticizera za pripremu biorazgradivog filma na bazi proteina varira od 10 do 60%, po gramu proteina, a u zavisnosti od njegove prirode i osobina. Plasticizeri koji se najčešće koriste u proizvodnji biorazgradivih filmova uključuju vodu, glicerol, polietilen glikol (PEG), sorbitol, propilen glikol (PG), etilen glikol (EG), neke monosaharide, disaharide i oligosaharide, lipide i njihove derivate (Anker *i sar.*, 1998; Sothornvit i Krochta, 2000a; Yang i Paulson, 2000; Irissin-Mangata *i sar.*, 2001; Pommet *i sar.*, 2003; Cao *i sar.*, 2009). Voda predstavlja univerzalni prirodni rastvarač, koji plasticizira i/ili antiplasticizira filmove, u zavisnosti od absorbovane količine na matriks filma (Chang *i sar.*, 2000). Ova pojava ima za posledicu veliki uticaj vlage na osobine filma, zavisno od relativne vlažnosti okruženja (Krotcha, 2002). Dodatak plasticizera značajno utiče na barijerne osobine filmova, povećavajući propustljivost gasova (ili komponenti arome) i mehaničke osobine, smanjujući zateznu jačinu (Mali *i sar.*, 2006). Pored vode, najčešće upotrebljavan plasticizer je glicerol. Mali, u vodi rastvorljivi molekuli, lako prodiru u proteinski matriks filma, vezujući se za aminokiselinske polarne grupe (Di Gioia i Guilbert, 1999). U poređenju sa sorbitolom, saharozom i PEG, glicerol pokazuje najbolje osobine kao plasticizer, za filmove na bazi β -laktoglobulina jer daje najbolje mehaničke osobine (Sothornvit i Krochta, 2000a). Pregled svojstava različitih plasticizera primenjenih za dobijanje filmova od proteina suncokreta i njihov uticaj na homogenost, dat je u Tabeli 1 (Orliac *i sar.*, 2003), gde se jasno vidi da je glicerol najefikasniji plasticizer.

Tabela 1. Homogenost filma na bazi proteina suncokreta i efikasnost različitih vrsta plasticizera

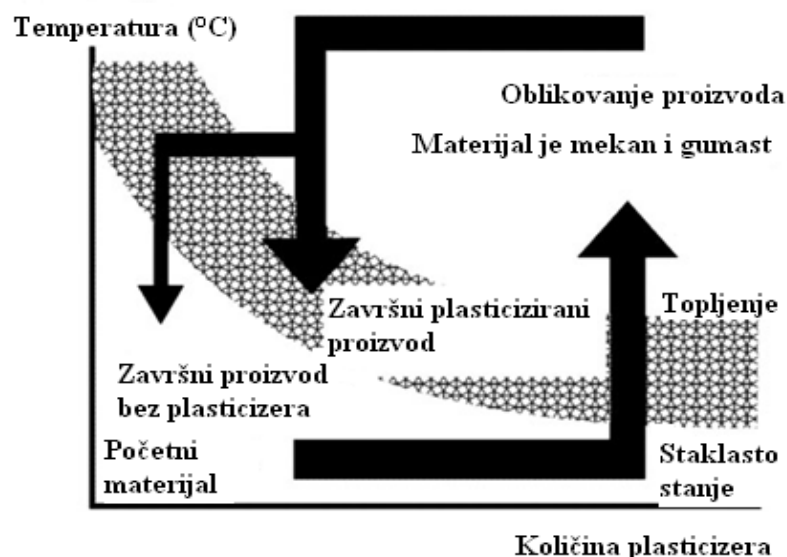
Vrsta plasticizera	Homogenost filma ⁽¹⁾	Efikasnost plasticizera ⁽²⁾
Glicerol	+++	+++
Etilen glikol	+++	+++
Dietilen glikol	+++	+++
Trietilen glikol	+++	+++
Tetraetilen glikol	+	+
Polietilen glikol 400	-	-
Polietilen glikol 1000	-	-
Polietilen glikol 3000	-	-
Propilen glikol	+++	+
Polipropilen glikol 400	-	0
Polipropilen glikol 1000	-	-
Polipropilen glikol 3000	-	-

(1) - Homogenost filma: „+++“ – glatka, homogena struktura; „0“ – zrnasta površina; „-“ – nehomogena struktura

(2) – Efikasnost plastifikatora: „+++“ – zadovoljavajuća elastičnost; „0“ – otporna ali lomljiva struktura; „-“ – krta struktura

Suvi metod

Mehanički metod – termoplastično procesovanje podrazumeva mešanje proteina i plasticizera, pri niskom sadržaju vlage, u cilju dobijanja visko-elastičkog materijala (Attenburrow *i sar.*, 1990). Termoplastične osobine proteina su vezane za teoriju staklastog stanja, koja objašnjava teksturalne promene tokom procesovanja termoplastike. Promene staklastog stanja podrazumevaju prelazak iz metastabilnog staklastog stanja u nestabilno gumasto stanje, pri specifičnoj temperaturi staklastog stanja (eng. glassy transition temperature - Tg) (Swain *i sar.*, 2004). Fenomen staklaste tranzicije zavisi od makromolekularnih karakteristika, npr. fleksibilnost, veličine i dužine lanca, veličine i polariteta bočnih grupa molekula. Zagrevanje amorfno termoplastičnog polimera na bazi proteina, iznad temperature staklastog stanja dovodi do stvaranja mekog, gumastog materijala, jednostavnog za rukovanje i oblikovanje (*Slika 3*). Hlađenjem na sobnoj temperaturi ovakav gumast materijal može preći u staklasto stanje, zauzimajući manje ili više rigidan oblik sa željenom strukturom. Shodno tome, materijali na bazi proteina mogu biti oblikovani ekstruzijom, mlevenjem ili termokalupljenjem.



Slika 3. Šematski prikaz termoplastičnog procesuiranja materijala na bazi proteina (Verbeek i van den Berg, 2010)

Biopolimerni filmovi tj. bioplastika se mogu dobiti upotrebom opreme koja se koristi za dobijanje sintetičkih filmova, uključujući opremu za termoformiranje, različite tipove injekcionih kalupa, kalupa za kompresiju, ekstruziju (filmova i vlakana) i ekstruziju omotača i laminata (Jerez *i sar.*, 2007). Ekstrudiono procesuiranje se zasniva na termoplastičnim osobinama polimera, u prisustvu plasticizera i povišene temperature, iznad temperature staklastog stanja, i pri smanjenom sadržaju vlage. Ekstruziono procesuiranje zahteva prisustvo plasticizera tipa polietilen glikol ili sorbitol u količini od 10-60% (w/w). U poređenju sa vlažnim postupkom, ekstruziona metoda je atraktivnija u smislu scale-up-a (Skurtys *i sar.*, 2010). Termoplastična ekstruzija predstavlja pogodnu metodu za formiranje proteinskih filmova jer se izbegava rastvaranje, a zatim uklanjanje rastvarača sušenjem. Međutim, indukovanje termoplastičnog ponašanja kod proteina nije dovoljno istraženo ili eksploatisano. Ipak, novija istraživanja ukazuju na porast interesovanja o ovom vidu dobijanja biorazgradivih filmova. Primeri dobijanja proteinskih biorazgradivih filmova ekstruzijom su mnogobrojni. Naga *i sar.* (1996) razvili su postupak dobijanja biorazgradivog filma na bazu proteina soje, postupkom ekstruzije. Koepff *i sar.* (1994) objavili su rezultate istraživanja produkcije želatinskih biorazgradivih filmova postupkom ekstruzije. Dobijeni filmovi imaju glatku površinu, prozirni su i homogeni. Sa porastom sadržaja vlage postaju izuzetno elastični. Wang i Padua (2003) govore o mehaničkim osobinama ekstrudiranih filmova na bazi zeina. Jednosmerno i dvosmerno orijentisani ekstrudirani filmovi imaju veće vrednosti izduženja pri kidanju i niže

zatezne jačine od neekstrudiranih filmova. Primeri ekstrudiranih proteinskih filmova uključuju i kolagenske filmove, široko primenjive u industriji mesa (Krochta, 2002).

U cilju dobijanja višeslojnih filmova, moguće je primeniti postupak koekstruzije (Skurtys *i sar.*, 2010). Ipak, razlike u fizičkim i hemijskim osobinama primenjenih polimera mogu uzrokovati različite defekte kod filma, koji dalje vode lošijim mehaničkim, barijernim i optičkim karakteristikama.

2.3 Osobine proteinskih filmova

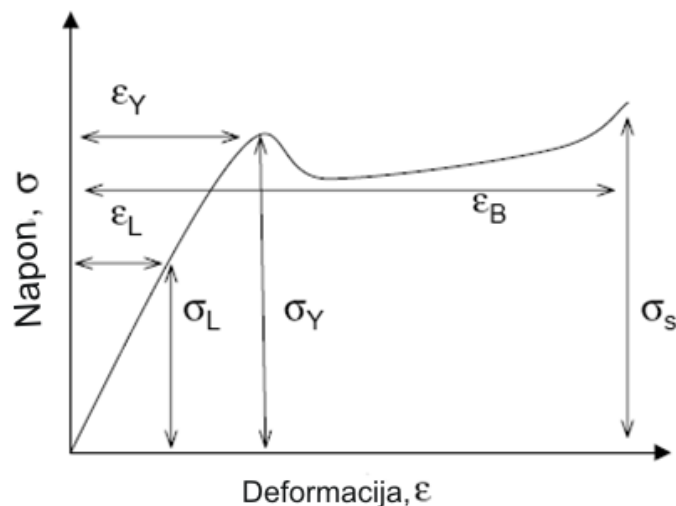
2.3.1 Mehaničke i barijerne osobine filmova

Debljina biorazgradivih filmova je važna karakteristika koja direktno utiče na ostale osobine filma (mehaničke, barijerne, biološke), na potencijalnu primenu filma i održivost upakovanog proizvoda. Efektivnost biorazgradivog filma u cilju zaštite upakovanog proizvoda primarno zavisi od kontrole rasipanja upakovanog proizvoda, što je direktna posledica debljine filma (Skurtys *i sar.*, 2010). Debljina filma ne sme prelaziti minimalnu i maksimalnu kritičnu vrednost, kako film ne bi drastično redukovao unutrašnju koncentraciju kiseonika ili povećao koncentraciju CO₂, kod anaerobne fermentacije upakovanog proizvoda.

Mehaničke osobine su veoma važene pri karakterisanju i odabiru biorazgradivih filmova. Mehanička otpornost hidrokolooidnih filmova, uglavnom, podrazumeva: zateznu jačinu (eng. Tensile Strenght – TS), Young-ov modul elastičnosti (Y) i izduženje pri kidanju (eng. Elongation at Break – EB).

Zatezna jačina podrazumeva: prirast zatezne jačine, maksimalnu zateznu jačinu, modul elastičnosti (Young's modulus) (Nielsen i Landel, 1994). Maksimalna TS je maksimalni stres pri razvlačenju koji film može da podnese do trenutka kidanja. *Izduženje pri kidanju* predstavlja maksimalnu promenu u dužini uzorka (izduženje) pre kidanja.

Zatezna jačina, izduženje pri kidanju i Young-ov modul se određuju sa krive „napor-deformacija“, prema normama Američkog udruženja za testiranje i materijale (American Society for Testing and Materials – ASTM). *Slika 4.* prikazuje krivu „napon-deformacija“ (eng. stress-strain).



Slika 4. Ponašanje „napon-deformacija“ hidrokoloidnih filmova (Skurtys et al., 2010)

Zatezna jačina se računa deljenjem maksimalnog opterećenja filma pre pucanja (δ_Y) sa inicijalnim površinom opterećenja (S).

Izduženje pri kidanju predstavlja osnovnu meru krтости filma (McHugh i Krochta, 1994). Izduženje pri kidanju se izražava kao procenat promene početne dužine uzorka filma nakon kidanja i mera je istezljivosti filma (ϵ_B). Young-ov modul se eksperimentalno determiniše kao nagib krive „napon-deformacija“ dobijene tokom testa opterećenja ($Y = \frac{\sigma_L}{\epsilon_L}$)

i karakteriše čvrstoću (Sperling, 2006). Veličine σ_L i ϵ_L predstavljaju zateznu jačinu i zatezno izduženje (izduženje pri kidanju) u elastičnom – lineranom opsegu delovanja sile.

Uslovi testiranja mehaničke otpornosti filma su veoma bitni jer mehaničke osobine hidrofилnih filmova zavise od uslova okruženja. Ponašanje pri naprezanju - deformaciji polimera u velikoj meri zavisi od temperature i relativne vlažnosti. Sa porastom temperature, Young-ov modul (Young's modulu), prirast zatezne jačine i maksimalna zatezna jačina generalno opadaju. Suprotno tome, pri takvim uslovima, izduženje pri porastu zatezne jačine i izduženje pri maksimalnoj zateznoj jačini imaju tendenciju rasta. Osobine dobijenih filmova zavise takođe i od vrste i koncentracije proteina, uslova rastvaranja, vrste i koncentracije plasticizera, dodatka aditiva itd. Sa porastom količine plasticizera, zatezna jačina se generalno smanjuje, a izduženje pri kidanju raste (McHugh i Krochta, 1994; Anker, 1996; Sothornvit i Krochta, 2000a; b).

Tabela 2. predstavlja pregled mehaničkih osobina nekih hidrokoloidnih i sintetičkih filmova.

Tabela 2. TS i EB različitih polimernih filmova

Vrsta polimera	Zatezna jačina (MPa)	Izduženje pri kidanju (%)	Referenca
Kolagen	1-70	10-70	Mark, 1999
Zein ^a	3-4	50-120	Wang i Padua, 2003
Želatin tip A tip B	25-85 28-140	7-22 7-12	Mark, 1999
Hitozan ^b	10-100	20-80	Lazaridou i Biliaderis, 2002
Celuloza ^c	acetat	44-64	Tharanathan, 2003
	hidroksipropil	14-15	
	metil	55-60	
Skrob	35-47	1.7-3.4	Mark, 1999
Polietilen	niske gustine	9-20	Mark, 1999
	visoke gustine	10-60	

Barijerne osobine filmova

Polimeri imaju dobre osobine, kao što su fleksibilnost, elastičnost, mala težina, lakoća oblikovanja i štampe, ali u poređenju sa staklom i metalom, imaju loše barijerne karakteristike jer u određenoj meri propuštaju gasove i vodenu paru. Izbor određenog polimera (kako sintetičkog tako i biorazgradivog) za konkretnu primenu, podrazumeva kompromis između njegovih mehaničkih i barijernih, ali i ekonomskih i ekoloških osobina.

Kod primene biorazgradivog filma za pakovanje hrane ili lekova, kvalitet i rok trajanja upakovanog proizvoda se znatno smanjuju, kada je proizvod u kontaktu sa spoljašnjim okruženjem, jer dolazi do povećanja ili smanjenja sadržaja vlage ili arome, dolazi do oksidacije ili mikrobiološke kontaminacije (Krochta i de Mulder-Johnston, 1997). Hemijski sastav površine proizvoda nije uravnotežen sistem, pa vremenom dolazi do promena nastalih pod uticajem metabolizma prisutnih mikroorganizama, rastvorljivosti i propustljivosti gasova itd. Radi sprečavanja propustljivosti neželjenih agenasa kroz biorazgradivi film, i što dužeg očuvanja kvaliteta upakovanog sadržaja, barijerna svojstva filma se moraju optimizirati (Freeman *i sar.*, 2002).

Veličina koja karakteriše barijerna svojstva sintetičkih i biorazgradivih filmova je *Koeficijent propustljivosti* (eng. Permeability - P).

Koeficijent propustljivosti je proizvod koeficijenta difuzije (eng. Diffusion - D) i rastvorljivosti (eng. Solubility - S):

$$P \text{ (mol/msPa)} = D \text{ (m}^2\text{/s)} S \text{ (mol/m}^3\text{Pa)} \quad (1)$$

Koeficijent difuzije ukazuje koliko brzo će se permeat kretati kroz polimerni matriks, dok koeficijent rastvorljivosti daje količinu permeata absorbovanog u polimeru, sa kontaktne površine (Bastioli, 1997).

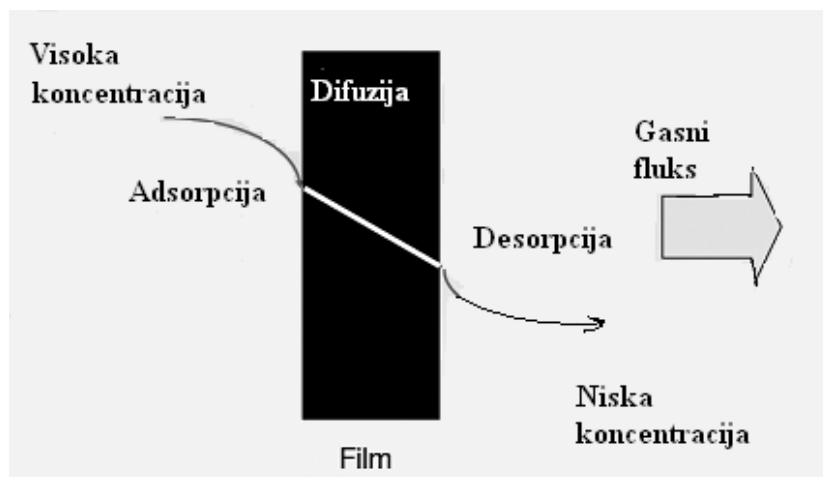
Koeficijent propustljivosti nije samo funkcija hemijske strukture polimera, nego zavisi i od mnogih fizičkih faktora kao što su gustina, kristalnost, umreženost, sadržaj plasticizera, osetljivost na vlagu i temperaturu. Tako, osobine filmova trebaju biti testirane pod uslovima približnim onim pod kojim je film dobijen i pod kojim će biti primenjen.

Brzina propustljivosti kiseonika (eng. Oxygen Transmission Rate - OTR) i brzina propustljivosti vodene pare (eng. Water Vapour Transmission Rate - WVTR) su dva najbitnija parametra koja utiču na funkciju filma, odnosno kvalitet upakovanog proizvoda. U cilju dobijanja željenih barijernih svojstava, zajedno sa zateznom jačinom i elastičnošću, izbor polimera, plasticizera i uslova formiranja filma predstavljaju glavni zadatak.

Propustljivost gasova

Propustljivost gasova, posebno kiseonika iz okruženja kroz film, ima veliki efekat na kvalitet i održivost upakovane namirnice. Kiseonik izaziva oksidaciju lipida i vitamina dovodeći do promena u senzornom i nutritivnom kvalitetu proizvoda (Anker, 2000). Zbog velikog broja vodoničnih veza, biorazgradivi filmovi na bazi proteina su hidrofilni, pa predstavljaju odličnu barijeru nepolarnim supstancama, kao što je kiseonik (Miller i Krochta, 1997). Suprotno tome, zbog izražene hidrofilnosti, proteinski filmovi predstavljaju lošu barijeru prema drugim gasovima. Barijerna svojstva biorazgradivih filmova u velikoj meri zavise od relativne vlažnosti okruženja, a propustljivost gasova raste sa porastom vlage. Modifikacijom strukture polimera, u kombinaciji sa izborom odgovarajućeg plasticizera, može se proizvesti film, koji pri niskim vrednostima relativne vlage, predstavlja barijeru za kiseonik, jednako dobru kao poli(vinil hloridni) (PVC) ili etilen vinil alkohol kopolimerni (EVOH) filmovi (Olabarrieta, 2005).

Transport molekula gasova kroz biorazgradivi film podrazumeva tri faze: (i) adsorpciju molekula gasa na površinu biorazgradivog filma; (ii) difuziju molekula gasa kroz matriks filma i (iii) desorpciju molekula gasa sa druge strane filma (*Slika 5*).



Slika 5. Transport molekula gasova kroz biorazgradivi film (Skurtys et al., 2010)

Mnoga istraživanja propustljivosti biopolimernih filmova su fokusirana na propustljivost kiseonika i ugljendioksida, s'obzirom da ta dva gasa imaju najveći uticaj na primenu biorazgradivih filmova, odnosno oksidaciju i „disanje“ upakovane hrane, kao što je to slučaj kod voća i povrća (Emmambux i Minnaar, 2003; Skurtys *i sar.*, 2010). Biorazgradivi filmovi na bazi proteina predstavljaju dobru barijeru za gasove, u poređenju sa filmovima na bazi polisaharida i lipida (Ou *i sar.*, 2005). Kada ne sadrže veliku količinu vlage, biorazgradivi filmovi na bazi sojinih proteina imaju 500, 260, 540 i 670 puta manju propustljivost kiseonika, u poređenju sa poletilenom male gusine (eng. Low Density Polyethylene – LDPE), metilcelulozom, skrobom i pektinom (Cuq *i sar.*, 1998). Dobru barijeru prema kiseoniku, pored visokog sjaja i dobrih mehaničkih osobina, pokazuje biorazgradivi filmovi na bazi proteina surutke (Hong i Krochta, 2006). Kako je kiseonik odgovoran za većinu degradabilnih reakcija u hrani i farmaceutskim proizvodima, uključujući rast mikroorganizama, enzimsko tamnjenje proizvoda i oksidaciju specifičnih molekula tipa proteina, vitamina, nezasićenih ulja itd., propustljivost filmova prema kiseoniku je najvažniji pokazatelj barijernih svojstava prema gasovima (Fennema, 2007). Propustljivost proteinskih filmova prema kiseoniku predstavlja fundamentalni aspekt njihove funkcionalnosti. Razvoj biorazgradivih filmova sa selektivnom propustljivošću prema gasovima od velikog je interesa zbog kontrolisanja razmene gasova tokom zrenja upakovanog proizvoda, pakovanja u modifikovanoj atmosferi itd. (Gontard *i sar.*, 1996; Makino i Hirata, 1997).

Propustljivost vodene pare

Prirodni biorazgradivi polimeri pokazuju dobar barijerni potencijal prema gasovima, aromama, lipidima itd., ali zbog svoje hidrofilnosti imaju ograničenu primenu je su osetljivi na vlagu (Olabarrieta, 2005).

U poređenju sa voskovima, koji se uglavnom koriste kao omotači za voće, povrće, lekove itd. i LDPE-om, koji se najčešće koristi kao zaštita za hranu i lekove od vlage, proteinski filmovi imaju veliku propustljivost vodene pare (Krochta, 2002).

Slično transportu gasova kroz polimerni film, transport vodene pare obuhvata sledeće faze (Debeaufort i Voilley, 1994): (i) adsorpcija vodene pare na površini filma, (ii) ulazak vodene pare, difuzija i rastvorljivost u polimernom matriksu i (iii) desorpcija vodene pare na drugoj površini polimera.

Propustljivost vode definiše brzinu transporta molekula kroz polimer, kao rezultat kombinovanog efekta difuzije i rastvorljivosti. U idealnom slučaju, kada ne bi bilo interakcije između polimera i propuštene vodene pare, koeficijent propustljivosti bi bilo nezavisan od ravnotežnog pritiska vodene pare, koji je u funkciji aktivnost vode (water activity - a_w) filma. Propustljivost vodene pare hidrofobnih filmova, kao što je polietilenski, je nezavisna od pritiska pare. Međutim, proteinski filmovi, kao i drugi hidrofilni filmovi, pokazuju zavisnost propustljivosti od pritiska vodene pare (Roy *i sar.*, 2000). Hidrofilni biopolimerni materijali, kao što su proteinski filmovi, odstupaju od idealnog ponašanja zbog interakcije propuštenih molekula vode sa polarnim grupama u strukturi filma (Miller i Krochta, 1997).

2.3.2 Fizičko-hemijska i biološka svojstva filmova

Optičke karakteristike: sjaj, prozirnost i boja

Optičke karakteristike površine biorazgradivog filma, boja, sjaj i prozirnost, važne su osobine filma koje utiču na potencijalnu primenu filma kao ambalažni materijal. Optičke osobine karakterišu površinu koja je od krucijalnog značaja za budućeg konzumenta proizvoda. Takođe, prozirnost i boja određuju propustljivost svetlosti kroz film, utičući time na hemijske promene upakovanog sadržaja. Unutrašnja i spoljašnja mikrostruktura filma igra važnu ulogu u određivanju optičkih karakteristika filma. Intenzitet reflektovane svetlosti sa površine filma određen je svetlošću direktno reflektovanom između vazduha i površine filma (direktna refleksija) i svetlosti reemitovane sa površine nakon penetracije u film i upakovani

proizvod (indirektna refleksija) (Skurtys *i sar.*, 2010). Direktna refleksija zavisi od sjaja površine filma i određuje se prema ASTM standardu D-523.

Sadržaj vlage

Fizičke, mehaničke i barijerne osobine biorazgradivog filma zavise od krajnjeg sadržaja vlage tj. vode vezane za matriks filma (Gontard *i sar.*, 1993; Gennadios *i sar.*, 1994; Chowdhury i Das, 2010).

Aktivnost vode (a_w) predstavlja meru energetskog statusa sadržaja vlage sistema, i utiče na određene karakteristike biopolimernog materijala (Chowdhury i Das, 2010). Visoka a_w vrednost vodi ka hemijskoj i mikrobnoj nestabilnosti. Najjednostavniji prikaz aktivnosti vode je preko jednačine ravnoteže aktivnosti vode:

$$a_w = p/p_o \quad (2)$$

gde je: p - parcijalni pritisak vodene pare vode vezane u materijalu

p_o - parcijalni pritisak vodene pare čiste vode, iste temperature kao ispitivani materijal.

U slučaju čiste vode a_w je jednako 1, kako je $p = p_o$.

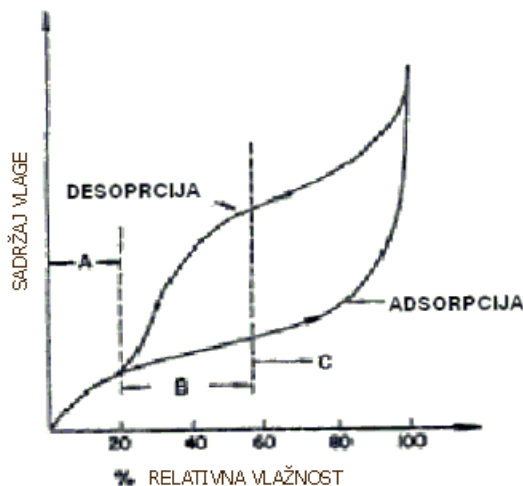
Aktivnost vode je u korelaciji sa relativnom vlagom (eng. Relative Humidity – RH), preko jednačine:

$$\%RH = p/p_o \cdot 100 = a_w \cdot 100 \quad (3)$$

Jednačina ravnoteže aktivnosti vode (čija vrednost može biti 0.0 - 1.0) i odgovarajućeg sadržaja vlage, na određenoj temperaturi, predstavlja izotremu sorpcije vlage (eng. Moisture Sorption Isotherm - MSI), i važan je činilac pri projektovanju uslova primene biorazgradivog filma (pakovanje i skladištenje). Kriva MSI (*Slika 6*) se može dobiti na jedan od sledećih načina:

(i) *adsorpciona izoterma* se dobija izlaganjem potpuno suvog materijala okruženju u kome raste relativna vlaga i merenjem porasta njegove mase, usled adsorbovanja vode iz atmosfere;

(ii) *desorpciona izoterma* se dobija izlaganjem inicijalno vlažnog materijala istim uslovima okruženja i merenjem gubitka mase (Labuza, 1968).



Slika 6. Kriva izoterme sorpcije vlage (Al-Muhataseb *i sar.*, 2002)

Postoji veliki broj jednačina koje predstavljaju model funkcije generalne sorpcije, $M = f(a_w)$, gde M predstavlja sadržaj vlage (eng. Moisture – M) (Chirife i Inglesias, 1978; Van den Berg i Bruin, 1981). Neke od njih uzimaju u obzir uticaj temperature (Coupland *i sar.*, 2000). Modifikovana Chung–Pfošt (Chung i Pfošt, 1967), modifikovana Henderson-ova (1952), modifikovana Halsey-jeva (1948), modifikovana Oswin-ova (1946) i Guggenheim–Anderson–de Bour (GAB) (Van den Berg, 1984) jednačina su usvojene kao standardne jednačine, prema Američkom udruženju inženjera poljoprivrede (ENG. American Society of Agricultural Engineers - ASAE), u cilju opisivanja sorpcionih izoterma (ASAE, 1995). Jednačine Brunauer–Emmett–Teller (BET) (Brunauer *i sar.*, 1938) and GAB opisuju monoslojni kontakt i sadržaj vlage, i smatraju se najpraktičnijim u određivanju uslova optimalne vlažnosti za kvalitetno čuvanje stabilnosti materijala, posebno onih sa manjim sadržajem vlage - dehidrirani.

Da bi se uspešno primenila, jednačina modela mora dobro da fituje eksperimentalne podatke u širokom opsegu a_w , uz primenu što manjeg broja nezavisnih promenljivih. Neki parametri se primenjuju jer daju podatke o određenim fizičkim veličinama (npr. količina vode neophodna da bi se vezali svi primarni aktivni centri), ali može biti dvosmislena u nekim slučajevima (Coupland *i sar.*, 2000).

U svojim istraživanjima, Gennadios i Weller (1994), prikazali su izoterme filmova na bazi kukuruznog zeina, pšeničnog glutena, smeše glutena i SPI. Oni su ukazali da GAB model najbolje odgovara fitovanju u ispitanom opsegu a_w vrednosti. Coupland *i sar.* (2000), takođe, smatraju da je GAB model najprihvatljiviji za fitovanje i optimizaciju izoterma.

$$M = \frac{M_0 C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (4)$$

gde je: M - sadržaj vlage (kg/kg suve materije),

M_0 - sadržaj vlage monosloja,

C i K - konstante vezane za enetriju interakcije između prvog i sledećih molekula na pojedinačnom sorpcionom mestu. Teoretski, one su povezane sa entalpijom sorpcije (Van der Berg i Bruin, 1981):

$$C = c_0 \exp\left[\frac{H_m - H_n}{RT}\right] \quad (5)$$

$$K = k_0 \exp\left[\frac{H_l - H_n}{RT}\right] \quad (6)$$

gde su: c_0 i k_0 entropijski faktori,

H_m , H_n i H_l molarne sorpcione entalpije monoslojeva, višeslojnih materijala i rastvora, redom (kJ/mol),

R , T predstavljaju gasnu konstantu ($R = 8.314472$ J/Kmol) i apsolutnu temperaturu izraženu u Kelvinima.

Coupland *i sar.*, 2000, su dali rezultate ispitivanja sorpcione izoterme filmova na bazi proteina surutke, u zavisnosti od uticaja količine plasticizera. Na osnovu dobijenih rezultata došli su do zaključka da jednačina koja opisuje sadržaj vlage u filmu u velikoj meri zavisi od količine dodatog plasticizera.

Optimizacija i fitovanje sorpcione izoterme predstavlja korisnu alatku u dizajniranju uslova primene filmova. Optimizacija MSI različitih biorazgradivih filmova na bazi zeina, proteina surutke, proteina kikirikija, soje itd., bila je zadatak mnogih istraživanja (Jangchud i Chinnan, 1999; Coupland *i sar.*, 2000; Romero-Bastida *i sar.*, 2004; Su *i sar.*, 2010).

Rastvorljivost i bubrenje

Ukupna rastvorljivost je važna karakteristika biorazgradivih filmova za njihovu održivost i potencijalnu primenu. Visokomolekularni proteini su nerastvorni ili neznatno rastvorni u vodi, pa se od njih mogu proizvoditi voodoporni biorazgradivi filmovi. Niskomolekularni proteinski lanci, monomeri i kratki peptidi, koji nastaju prilikom razaranja

nativnih proteina, imobilizovani su u strukturu filma ili vezani vodoničnim vezama i čine proteinsku komponentu koja se rastvara u vodi. Delovanjem uslova spoljašnje sredine – kiseonika, temperature, vode i mikroorganizama, kompletna struktura filma može biti narušena, a time i ceo matriks filma može preći u rastvorno stanje. Umrežavanje molekula, takođe, može znatno redukovati rastvorljivost komponenti biorazgradivog filma (Lacroix, 2009). Vachon *i sar.* (2000) su redukovali ukupnu rastvorljivost filma za više od 75%, umrežavanjem uz dejstvo zračenja.

Drugi vidovi modifikacije koji utiču na smanjenje rastvorljivosti biorazgradivih filmova uključuju primenu funkcionalnih agensa, koji se inkorporiraju u film, u cilju povećanja hidrofobnosti polimera, i povećanja nerastvorljivosti i barijere prema vodenoj pari samog filma (Lacroix, 2009). Funkcionalni agensi se definišu kao supstance koje su kovalentno vezane za polimerni matriks, sa ili bez agenasa za vezivanje. Primeri funkcionalnih jedinjenja uključuju gliceraldehid, acil-hloride, masne kiseline i anhidride (Lacroix, 2009).

U nekim slučajevima, poželjno je trenutno rastvaranje filma, kao npr. kod pakovanja namirnica u vrećice od rastvorljivog biopolimera. Sa druge strane, nerastvorljivi filmovi su praktičniji i imaju širu primenu, jer onemogućavaju uticaj vlage i čuvaju integritet upakovanog sadržaja. Kukuruzni zein i pšenični gluten su nerastvorni u vodi, pa formiraju i nerastvorne filmove (Gennadios, 2002). U vodi rastvorni proteini, daju filmove različite rastvorljivosti, u zavisnosti od vrste proteina, ali i uslova formiranja i čuvanja dobijenog filma. Nativni proteinski izolat surutke proizvodi filmove u potpunosti rastvorljive u vodi, dok se od termički denaturisanog rastvora proteinskog izolata surutke dobijaju nerastvorni filmovi (Perez-Gago *i sar.*, 1999).

Važna karakteristika filmova na bazi proteina je bubrenje. U kontaktu sa kompatibilnim rastvaračem, filmovi bubre (Ganji *i sar.*, 2010). Kada filmovi u inicijalnom stanju dođu u kontakt sa molekulima rastvarača, molekuli rastvarača, polarni molekuli vode bivaju privučeni hidrofilnom površinom filma, a zatim penetriraju u sam matriks, vezujući se za polarne grupe u njemu (Ganji *i sar.*, 2010).

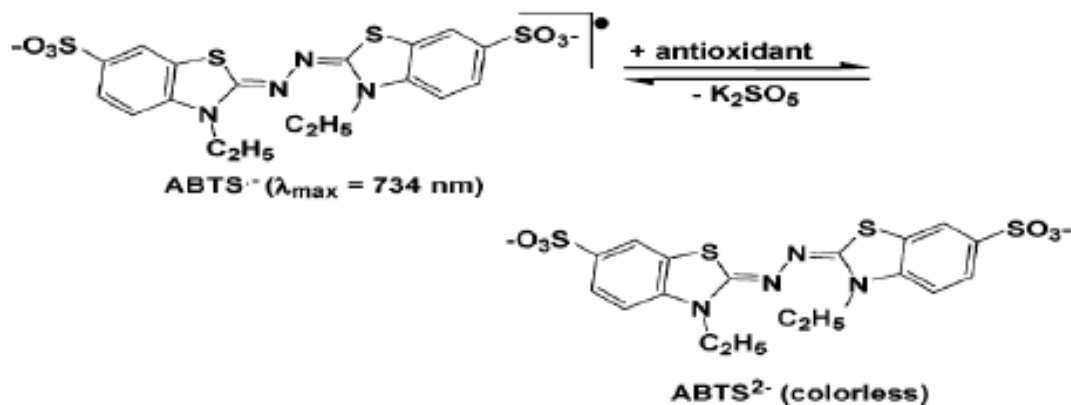
Bubrenje pojačava efekat oslobađanja antimikrobnih i antioksidantnih agenasa inkorporiranih u matriks filma. U kontaktu sa filmom, voda difunduje u film, rezultirajući pomeranjem polimernih lanaca, inkorporirajući se među njih i rastvarajući dodatne aktivne agense koji kasnije difunduju u sistem, ispoljavajući zaštitnu ulogu (Siepmann *i sar.*, 2002).

Antioksidantno delovanje

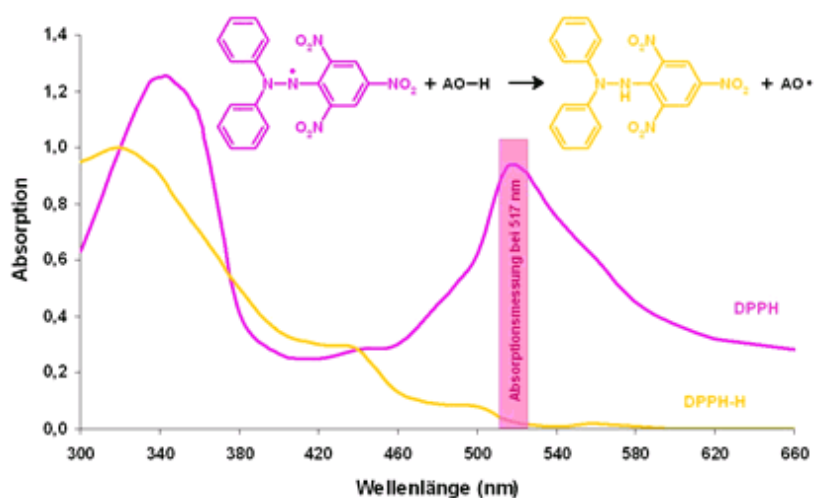
Potencijalna primena biorazgradivih filmova, kao ambalažni materijal, ogleda se u njihovoj mogućnosti da deluju kao barijera za vodu, sprečavajući dehidrataciju upakovanog proizvoda, i kao barijera za gasove i svetlost, redukujući oksidaciju lipida (Jung, 2002), s obzirom da su slobodno radikalske reakcije i peroksidacija lipida među glavnim uzročnicima brzog narušavanja senzornih i nutritivnih svojstava životnih namirnica, a potencijalno i izvori toksičnih jedinjenja u ishrani. Antioksidantni efekat biorazgradivih filmova, između ostalog, u tesnoj je vezi sa propustljivošću kiseonika (Bonilla *i sar.*, 2011). Razvoj antioksidativnih biorazgradivih filmova aktuelan je pravac poslednjih godina, kako oksidacija predstavlja veoma štetan faktor koji utiče na smanjenje održivosti namirnica koje sadrže lipide. Lipidna oksidacija je prouzrokovana prisustvom kiseonika u hrani, s obzirom na nemogućnost potpunog uklanjanja kiseonika tokom procesa pakovanja i skladištenja proizvoda. Iz tog razloga, dodatak antioksidantnih materija biorazgradivom omotaču nužan je korak u poboljšanju karakteristika biorazgradivih filmova i upakovanog sadržaja (Lee *i sar.*, 2004; Jingjareonrak *i sar.*, 2008). Inkorporirane antioksidativne komponente migriraju iz filma u upakovani proizvod, eliminišući radikalske vrste, nastale oksidacijom lipida, postepeno inhibirajući napredak oksidativnog procesa (Hoojjat *i sar.*, 1987).

Biorazgradivi filmovi na bazi proteina surutke uspešno se primenjuju u cilju redukcije lipidne oksidacije, u toku skladištenja smrznutog lososa (Stuchell i Krotchta 1995), prženog kikirikija (Mate i Krochta 1996; Lee i Krochta 2002) i oraha (Mate i Krochta 1997).

Drugi vidovi antioksidativnog delovanja biorazgradivih filmova se mogu detektovati: (i) direktnim hvatanjem slobodnih radikala (ABTS^{*+}, DPPH^{*}) (Slika 7 i 8), inicijatora ili intermedijera lančanih radikalskih reakcija; (ii) praćenjem redukujuće moći; (iii) heliranjem jona prelaznih metala (Fe, Cu) i (iv) inhibicijom oksido-redukcionih enzima (lipoksigenaza, polifenoloksidaza) (Lee i Krochta, 2002; Lee *i sar.*, 2002; Oussalah *i sar.*, 2004; Pérez Gago *i sar.*, 2006; Gómez-Estaca *i sar.*, 2007).



Slika 7. Reakcija antioksidanata i $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katjona



Slika 8. Reakcija slobodnih DPPH^{\bullet} radikala i antioksidanata (Mark i Alger, 1997).

Aktivne supstance, npr. biljni ekstrakti, α -tokoferol, BHT (eng. Butylated hydroxytoluene) ili proteinski hidrolizati mogu biti inkorporirani u strukturu filma, doprinoseći antioksidativnom i antimikrobnom delovanju filma (Oussalah *i sar.*, 2004; Kim *i sar.*, 2006; Gómez-Guillén *i sar.*, 2007; Jingjareonrak *i sar.*, 2008; Giménez *i sar.*, 2009; Gómez-Estaca *i sar.*, 2009a, b). Produžavanje delovanja antioksidantnih komponenti filma postiže se povećanjem njihove koncentracije na površini filma, čime se povećava i efikasnost delovanja filma kao aktivne ambalaže (Gómez-Estaca *i sar.*, 2007). Prema istraživanjima Papadokostaki *i sar.* (1997), za efikasnost otpuštanja aktivnih komponenti zadužena je polimerna struktura. Interakcija aktivne supstance sa proteinskim matriksom, ne samo da utiče na otpuštanje aktivnih molekula, nego menja i fizičko-hemijske osobine filma, utičući na njegovu rastvorljivost i barijerna svojstva (Gómez-Guillén *i sar.*, 2007).

Primeri nekih proteinskih i kompozitnih biorazgradivih filmova sa antioksidantnom aktivnošću su dati u Tabeli 3.

Tabela 3. Primeri proteinskih i kompozitnih antioksidantnih biorazgradivih filmova za pakovanje svežih ili minimalno procesuiranih namirnica

Vrsta filma	Antioksidantna komponenta	Primena	Analiza	Referenca
Proteini mleka (kalcijum kazeinat, proteinski izolat surutke)	Esencijalna ulja origana i/ili pimenta	Juneće meso	TBA	Oussalah <i>i sar.</i> , 2004
Želetin sa/bez hitozana; plastificiran	Esencijalna ulja ružmarina ili origana	Hladno dimljene sardine	Peroksidni broj, TBA, ukupni fenoli, FRAP metoda	Gómez-Estaca <i>i sar.</i> , 2007
Proteinski koncentrat surutke i pčelinji vosak	Askorbinska kiselina, cistein i 4-heksilresorcinol (4-heksil)	Jabuke	Gubitak mase, boja, senzorne karakteristike	Pérez Gago <i>i sar.</i> , 2006
Nativni ili temperaturno tretirani proteinski izolat surutke, glicerol, lecitin, metil-paraben	Vitamin E	Kikiriki	Sadržaj heksana	Lee i Krochta, 2002
Proteini surutke, glicerol, lecitin, metil-paraben	Vitamin E	Kikiriki	Senzorne karakteristike, sadržaj heksana	Lee <i>i sar.</i> , 2002
Proteini surutke, glicerol (60:40 i 50:50), destilovani acetilovani monogliceridi	-	Kikiriki	Peroksidni broj, sadržaj heksana	Maté <i>i sar.</i> , 1996

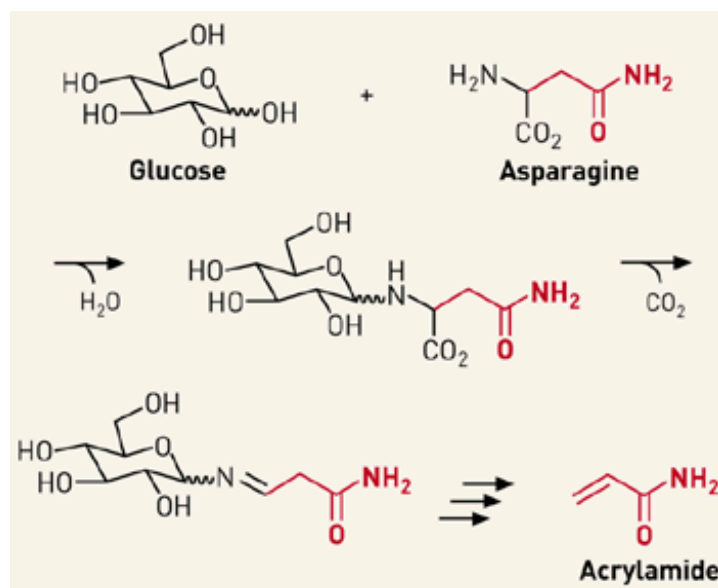
TBA - thiobarbituric acid, FRAP - ferric-reducing antioxidant power.

Sa porastom ekološke svesti potrošača i potrebom za zdravom hranom, sintetički antioksidanti gube na atraktivnosti, a primat zauzimaju prirodni antioksidanti. Takođe, veliki pomak je učinjen saznanjem da proteinski biorazgradivi filmovi sami poseduju antioksidantno delovanje, s obzirom na prisustvo peptida sa antioksidantnim delovanjem (Giménez *i sar.*, 2009; Weng *i sar.*, 2009). Smanjenom propustljivošću kiseonika i prisustvom peptida sa antioksidantnom aktivnošću znatno se redukuje oksidacija proizvoda (Cuq *i sar.*, 1998).

Poslednjih godina, veliku pažnju privlači antioksidantna aktivnost bioaktivnih peptida dobijenih enzimskom hidrolizom različitih proteina. Produkti mora i različiti nuzproizvodi predstavljaju dobar izvor antioksidantnih peptida (Giménez *i sar.*, 2009, Vaštag *i sar.*, 2010, 2011).

Veliki broj istraživanja dokazao je biološku aktivnost peptida, dobijenih enzimskom hidrolizom biljnih i animalnih proteina, koja podrazumeva inhibitornu aktivnost na angiotensin I konvertujući enzime (ACE), imunološku regulatornu aktivnost i antioksidantnu aktivnost (Pihlanto-Leppälä, 2000; Sarmadi i Ismail; 2010; Vaštag *i sar.*, 2010, 2011; Vioque *i sar.*, 2000). Podaci iz literature ukazuju na primenu proteinskih hidrolizata u cilju poboljšanja antioksidantne aktivnosti proteinskih filmova (Giménez *i sar.*, 2009; Salgado *i sar.*, 2011). Giménez *i sar.* (2009) pokazali su da inkorporacija rastućeg udela hidrolizata želatina u filmu na bazi želatina iz kože lignje rezultuje povećanjem antioksidantne aktivnosti filma, određenom FRAP i ABTS metodom, iako ima negativan uticaj na mehaničke osobine i propustljivost vodene pare. Salgado *i sar.* (2011) su pratili efekat dodatka hidrolizata goveđe plazme na antioksidantne osobine filmova na bazi proteina soje i suncokreta. U prisustvu hidrolizata došlo je do aktivacije antioksidantne aktivnosti proteina, konstituenata filmova. Sinergistično i antagonistično delovanje proteina soje, odnosno suncokreta sa hidrolizatom nije uočeno.

Biorazgradivi filmovi, kod kojih, tokom formiranja, dolazi do Maillard-ove reakcije između proteina i ugljenih hidrata, pokazuju pojačano antioksidantno delovanje (Beng *i sar.*, 2009; Zhang *i sar.*, 2011). Maillard-ova reakcija se odvija između karbonilne grupe redukujućih šećera i nukleofilne amino grupe amino-kiseline proteina, formirajući akrilamid (Thomas i Forbes, 2010) (Slika 9).



Slika 9. Maillard-ova reakcija (Yarnell, 2002)

Maillard-ova reakcija uspešno je primenjena u formiranju modifikovanog biorazgradivog filma na bazi SPI, sa pojačanom antioksidantnom aktivnošću (Beng *i sar.*,

2009). Dobijeni film se upotrebljavaju kao ambalaža za riblje ulje. Maillard-ova reakcija ili ne-enzimatsko tamnjenje, česta je pojava kod termički obrađene hrane, koja sadrži proteine i ugljene hidrate. Reakcija doprinosi poboljšanju ukusa i boje, kao i antioksidantnoj aktivnosti proizvoda (McGookin i Augustin, 1991, 1997). Otuda interes ka primeni Maillard-ove reakcije u cilju unapređenja funkcionalnih karakteristika proteina i proteinskih filmova (Hill *i sar.*, 1992). Zhang *i sar.* (2011) su ukazali na pojačanu antioksidantnu aktivnost biorazgradivih filmova, na bazi proteinskog izolata surutke (eng. Whey Protein Isolate – WPI) i ksiloze, pri čijem formiranju je došlo do Maillard-ove reakcije. Pozitivan efekat reakcije između proteina i polisaharida uočen je odlaganjem povećanja kiselosti jezgra oraha. Ovakav efekat nije uočen, primenom WPI filma.

Antimikrobno delovanje

U cilju primene biorazgradivih filmova kao dela sistema za pakovanje hrane, pored mehaničkih i barijernih svojstava prema gasovima, vodenoj pari i aromama, filmovi moraju predstavljati barijeru za mikroorganizme (Krochta i De Mulder-Johnston 1997; Cha i Chinnan 2004). Biopolimerni filmovi, u kombinaciji sa antimikrobnim (AM) agensima predstavljaju vitalan faktor u kontroli rasta mikroorganizama na površini upakovanog proizvoda, obezbeđujući time duži vek trajanja i/ili poboljšavajući mikrobiološku sigurnost proizvoda (Kourwel *i sar.*, 2011; Padgett *i sar.*, 1998).

Različiti antimikrobni agensi mogu biti inkorporirani u biorazgradivi film, ali je neophodno da budu neškodljivi za ljudsko zdravlje. Takvi agensi podrazumevaju organske kiseline i njihove soli, pr. benzoevu kiselinu, natrijum benzoat, sorbinsku kiselinu, kalijum sorbat, propionsku, mlečnu i sirćetnu kiselinu itd. (Cuppert, 1994; Han, 2000). Većina antimikrobnih agenasa izolovana je iz biljaka ili fermentisanih proizvoda. Prirodni antimikrobni agensi mogu biti enzimi (Min *i sar.*, 2005; Gücbilmez *i sar.*, 2007), proteini i peptidi (Hoffman *i sar.*, 2001), masne kiseline (Hoffman *i sar.*, 2001), pigmenti, arome, ulja (Oussalah *i sar.*, 2004; Rojas-Grau *i sar.*, 2006) i začina (Oussalah *i sar.*, 2004; Rojas-Grau *i sar.*, 2006). Zbog svoje prirode, očekuje se da imaju veliki potencijal za primenu kao antimikrobni aditivi u biorazgradivim filmovima bez negativnih efekata, koji prate hemijske konzervanse. Ipak, neophodno je detaljnije proučiti inhibitorni nivo, antimikrobni spektar i njihovu toksičnost, u cilju obezbeđivanja maksimalne efikasnosti biorazgradivog, antimikrobnog filma.

Upotreba prirodnih antimikrobnih agenasa u cilju poboljšanja efikasnosti biorazgradivih filmova datira još iz kasnih 1990tih. Zeinski film, inkorporiran nisinom

(Padgett *i sar.*, 1995) i kompozitni film SPI/zein, u prisustvu lizozima ili nisina (Padgett *i sar.*, 1998) testirani su kao antimikrobni omotači, čija se aktivnost ogledala u sprečavanju rasta *Lactobacillus plantarum*. Antimikrobni zeinski filmovi bili su tema istraživanja i drugih autora. Hoffman *i sar.* (2001) i Güçbilmez *i sar.* (2007) proučavali su antimikrobni efekat zeinskih filmova inkorporiranih lizozimom i EDTA, odnosno nisinom i laurinskom kiselinom na rast *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella*.

Kao omotač za kuvanu šunku i Bolonjsku kobasicu, Gill (2000) je aplicirao biorazgradivi film na bazi želatina koji sadrži lizozim, nisin i EDTA, u cilju kontrole rasta patogenih mikroorganizama. Antimikrobni film pokazao je baktericidno delovanje na gram-pozitivne patogene: *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella typhimurium* (Gill, 2000). Kompozitni film na bazi proteina uljane repice i želatina, koji sadrži ekstrakt semena grožđa pokazuje uspešno inhibirajuće delovanje na rast patogenih bakterija *E.coli* i *L.monocytogenes* (Jang *i sar.*, 2011a).

Kalijum sorbat, inkorporiran u film na bazi proteina surutke, pokazao je antimikrobno delovanje na *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* i *Penicillium roqueforti* (Ozdermir, 1999). Rodrigues i Han (2000) pokazali su inhibitorni efekat filmova na bazi proteina surtke, koji su sadržali lizozim, nisin, EDTA ili propil-*p*-benzoevu kiselinu, na rast *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Brochothorix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Pintado *i sar.* (2010) istraživali su inhibitorni efekat filmova na bazi proteina surutke inkorporiranih različitim AM agensima. Filmovi su pokazali inhibitorni efekat na *P.aeruginosa*, *L.monocytogenes*, *Y.lipolytica*, *P.roqueforti* i *P.commune*. Kristo *i sar.* (2008) istraživali su AM efikasnost biorazgradivih filmova na bazi natrijum kazeinata (eng. sodium caseinate - SC), sa nisinom, natrijum ili kalijum laktatom. Antimikrobni SC filmovi pokazali su visok inhibitorni efekat na rast *L.monocytogenes*. Sivarooban *i sar.* (2008) ispitali su karakteristike SPI filmova, koji sadrže 1% (w/w) ekstrakta semena grožđa i nisin (1×10^3 IU/g). U poređenju sa drugim ispitanim sistemima, AM SPI film pokazao je najveći inhibitorni efekat na rast *L.monocytogenes*.

2.3.3 Strukturne osobine filmova

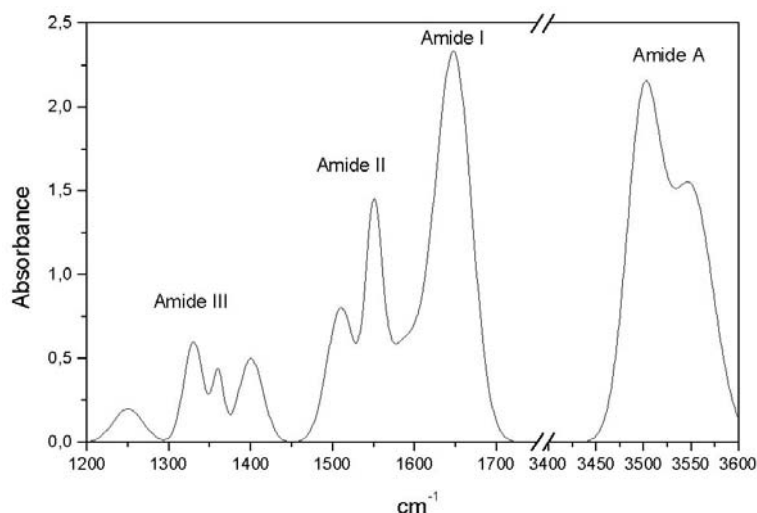
Karakteristike biorazgradivih filmova zavise od sledećih faktora: odnos kristalne i amorfne zone, mobilnosti polimernih lanaca, specifične interakcije funkcionalnih grupa polimernih lanaca i permeabilnosti amorfne zone. Najčešće primenjivane tehnike za

proučavanje strukture biorazgradivih filmova podrazumevaju: 1. Furije transformišuću infracrvenu spektroskopiju (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR), 2. elektron skenirajuću mikroskopiju (eng. Scanning Electron Microscopy - SEM), 3. diferencijalnu skening kalorimetriju (eng. Differential Scanning Calorimetry – DSC), termo-mehaničku analizu (eng. Thermo-Mechanical Analysis – TMA) i dinamičko-mehaničku analizu (eng. Dynamic-Mechanical Analysis – DMA).

1. Furije transformišuća infracrvena spektroskopija

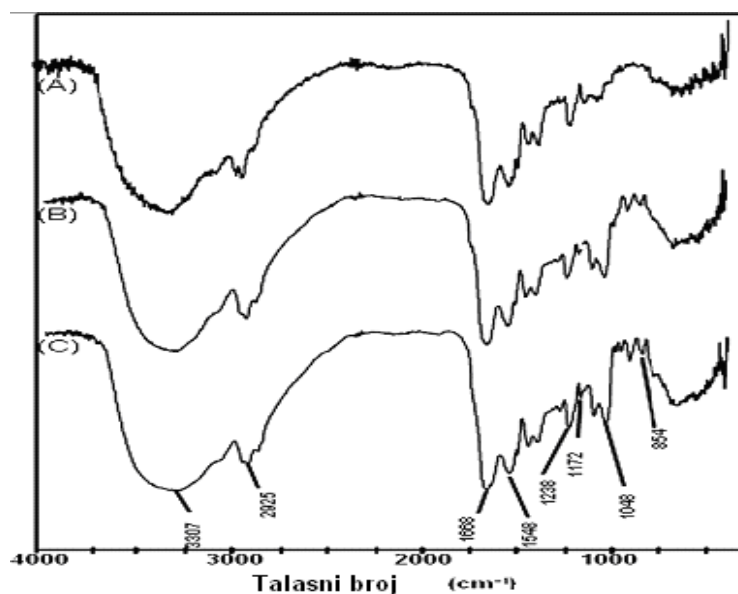
Furije transformišuća infracrvena spektroskopija predstavlja korisnu tehniku za određivanje mikrostrukturnih karakteristika biorazgradivih filmova, posebno kompozitnih, jer definiše prostojeće veze u molekulima matriksa filma i formirane veze između različitih komponenti filma (Embucado i Huber, 2009). FTIR pruža informacije o sekundarnoj strukturi proteina, za razliku od kristalografije X zracima i NMR (eng. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy), koje daju informacije o tercijarnoj strukturi. FTIR spektroskopija radi po principu prolaska i apsorpcije infracrvene svetlosti, određene talasne dužine, kroz uzorak. Svaka komponenta filma, kao i svaka formirana veza ima karakterističan set absorbcionih traka i karakterističan interferogram.

Karakteristične absorpcione regije spektra proteina i polipeptida uključuju devet oblasti, nazvanih Amid (A, B; I, II, III, IV, V, VI i VII) (*Slika 10*). Ove oblasti potiču od veza formiranih između amino kiselina. Oblast Amid A (oko 3500 cm^{-1}) i Amid B (oko 3100 cm^{-1}) potiču od Fermi rezonance između prvog preklapanja Amida II i vibracije istezanja N-H veze. Amid I i Amid II su dve glavne oblasti infracrvenog spektra proteina. Amid I regija (između 1600 i 1700 cm^{-1}) potiče od vibracije istezanja C=O veze (70-85%) i direktno je povezana sa konformacijom primarne strukture. Amid II potiče od vibracije vezivanja N-H veze (40-60%) i vibracije istezanja C-N veze (18-40%). Ove vibracije, pa i sama oblast adsorbovanja su konformaciono osetljive (Venyaminov i Kalnin, 1990). Kako su veze C=O i N-H uključene u formiranje vodoničnih veza između različitih elemenata sekundarne strukture, lokacija Amid I i Amid II je određena karakterističnom sekundarnom strukturom svakog molekula proteina (Barth, 2007; Gallagher, 1997).



Slika 10. FTIR spektar - karakteristične adsorpcione oblasti (Amid A, I, II i III) molekula proteina (Venyaminov i Kalnin, 2000)

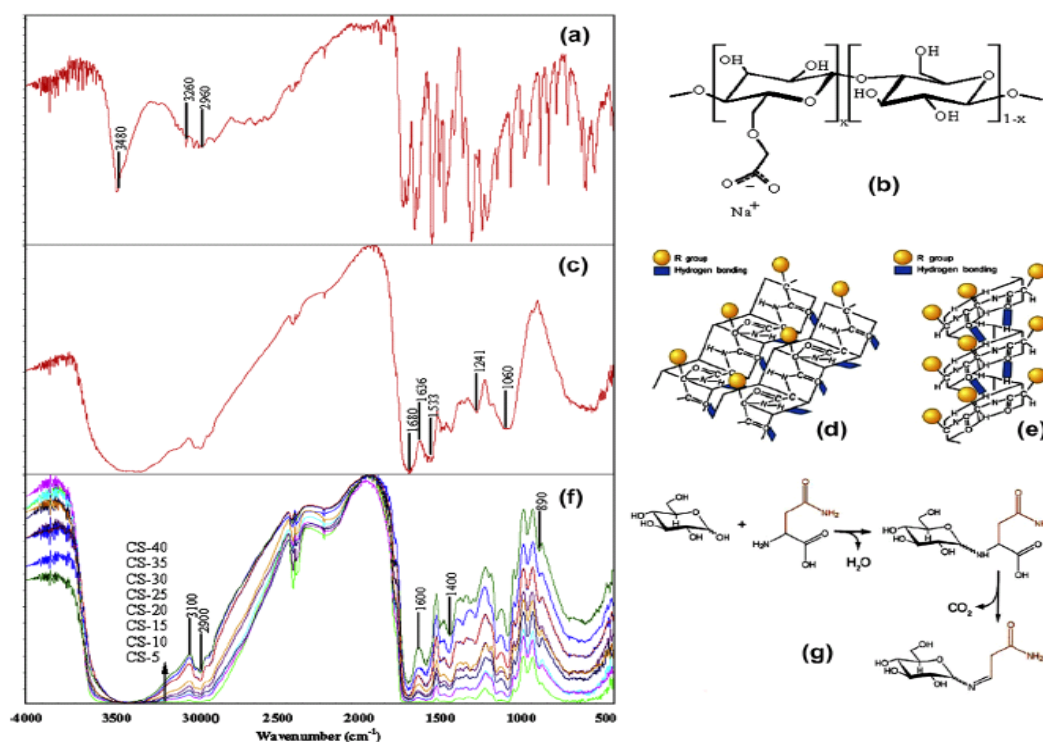
Gonzales *i sar.* (2011) su FTIR analizom potvrdili umrežavanje molekula proteina soje, prilikom formiranja biorazgradivih filmova. Karakteristične adsorpcione trake SPI uočene su na talasnim brojevima 3000–3500 cm^{-1} (potiču od istežanja O–H i N–H veza), 2925 cm^{-1} (potiču od istežanja C–H veze), 1668 cm^{-1} (amide I, potiču od istežanja C=O veze), 1548 cm^{-1} (amide II, potiču od istežanja N–H veze) i 1238 cm^{-1} (amide III, potiču od istežanja C–N veze).



Slika 11. FTIR spektar SPI filma sa (A) 0%; (B) 5% i (C) 10% (w/w SPI) genapina (Gonzales *i sar.*, 2011)

Nakon umrežavanja sa genapinom, na talasnom broju 1668 cm^{-1} došlo je do relativnog povećanja pika, zbog formiranja novih amidnih veza usled umrežavanja SPI i genapina. Takođe, uočen je relativni porast adsorpcije na 2925 cm^{-1} , prilikom istežanja C–H veze i pojave sledećih pikova usled adsorpcije veza: na 1048 cm^{-1} usled istežanja C–O veze, na 1238 cm^{-1} usled istežanja C–N veze (Amid III) i na 854 cm^{-1} koja potiče od C–H veze (vibracija izvan ravni), izvedene iz veze C=C (Slika 11).

FTIR analizom moguće je identifikovati i veze između molekula različitih vrsta, pa se ova metoda uspešno primenjuje pri potvrđivanju Maillard-ove reakcije, nastale pri dobijanju kompozitnih filmova protein/polisaharid i umrežavanju molekula različitih proteina, pri obrazovanju kompozitnog filma protein/protein (Denavi *i sar.*, 2009; Elizondo *i sar.*, 2009; Su *i sar.*, 2010).



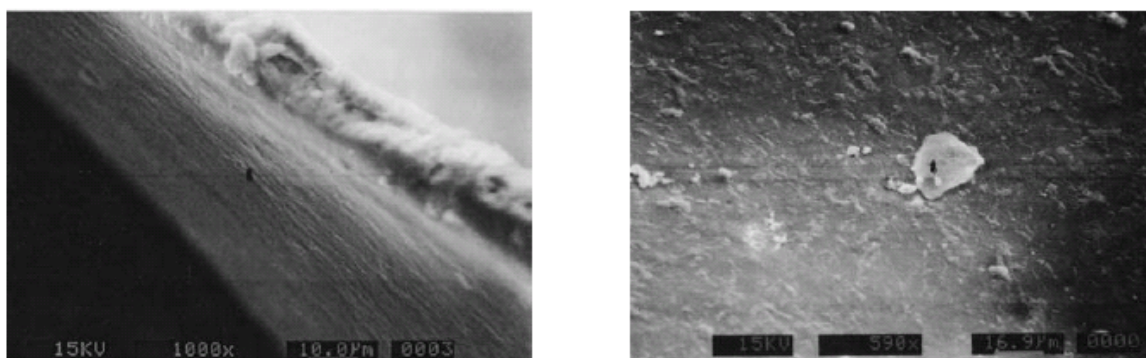
Slika 12. Dokaz Maillard-ove reakcije FTIR-om, (a) FTIR spektr CMC, (b) molekulska struktura CMC sa stepenom supstitucije x , (c) FTIR spektar SPI, (d i e) molekulska struktura SPI, (f) FTIR spektar CS-5, CS-10, CS-15, CS-20, CS-25, CS-30, CS-35 i CS-40 CMC/SPI filma, (g) tipična Maillard-ova reakcija između CMC i aminokiseline (glutamine, gln) (Su *i sar.*, 2010); CS- x predstavlja sastav filma CMC/SPI, gde je x udeo CMC u ukupnoj masi CMC i SPI.

Slika 12. prikazuje interferogram i molekulsku strukturu CMC i SPI, kao i Maillard-ovu reakciju između njih. Kada je CMC dodata SPI, došlo je do postepenog smanjenja intenziteta adsorpcije na talasnim brojevima 3100–2900, 1600–1400 i 890 cm^{-1} .

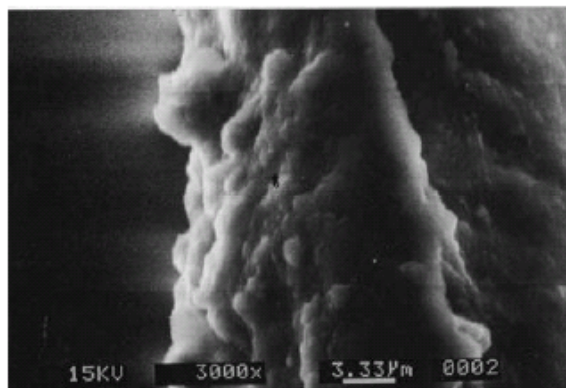
Promena u jačini adsorpcije reflektuje modifikaciju oblasti Amid I, na 1632 cm^{-1} , koja potiče od vibracije vezivanja N–H veze. Adsorpciona traka na 1241–1472 cm^{-1} potiče od vibracije istezanja C–N veze. *Slika 12.* ukazuje da su –OH grupa u CMC i amno grupa u SPI izreagovale tokom procesa mešanja i formiranja filma, pri povišenoj temperaturi. Takođe, nove adsorpcione trake su se pojavile na talasnom 1647 cm^{-1} i potiču od vibracije istezanja C=N veze (Su *i sar.*, 2010).

2. Elektron skenirajuća mikroskopija

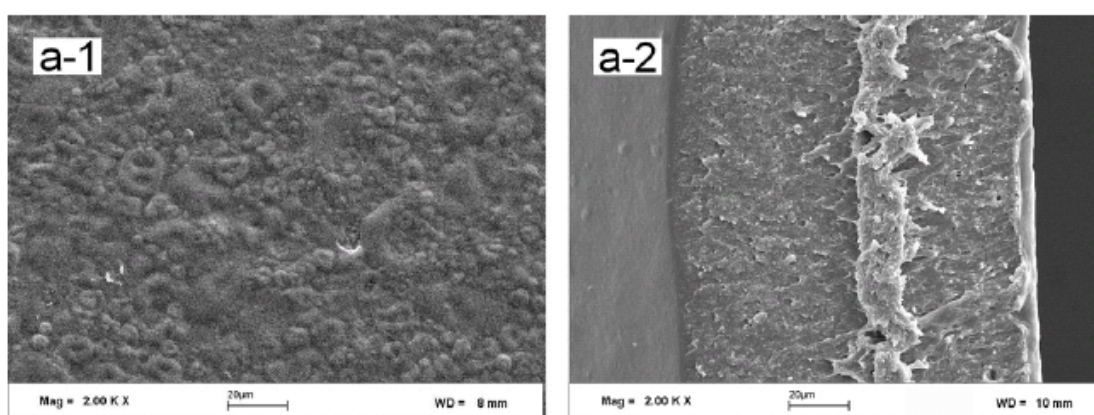
Elektron skenirajuća mikroskopija primenjuje se za ocenu homogenosti filma, strukture, glatkoće površine, debljine, prisutnosti pora i pukotina. Prisustvo plasticizera u filmu, često uzrokuje pojavu mehurića u strukturi filma, koji nakon pucanja ostavljaju pore, odgovorne za povećanu propustljivost filma (Saremnzhad *i sar.*, 2011). SEM pruža informacije o površinskoj mikrostrukutri i poprečnom preseku filma (*Slika 13, 14 i 15*). Na SEM snimku gornje i donje površine filma, može se jasno uočiti razlika u glatkoći površine koja je bila u kontaktu sa ravnom površinom („donja“ površina filma), i one koja je bila u dodiru sa vazduhom, tokom sušenja filma. „Donja“ površina ima staklast izgled, veoma je glatka, sa uniformnom depozicijom komponenti. Suprotno tome, strana izložena atmosferi, može sadržavati rupice neravnomernog rasporeda (Hewage i Vithanarachchi, 2009).



Slika 13. SEM snimak donje i gornje površine filma na bazi proteina cowpea (Hewage i Vithanarachchi, 2009).



Slika 14. SEM snimak poprečnog preseka filma na bazi proteina cowpea (Hewage i Vithanarachchi, 2009).



Slika 15. SEM snimak (uvećanje 2000 x) biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata graška (eng. Pea Protein Isolate – PPI), plastificiranog glicerolom; (a-1) površina, (a-2) poprečni presek; (Kowalczyk i Baraniak, 2011).

Unutrašnja struktura kvalitetno formiranih filmova pokazuje homogen poprečni presek (Kowalczyk i Baraniak, 2011) (*Slika 15*). Na poprečnom preseku proteinskih filmova često se uočava hrapava i rupičasta stuktura (Hewage i Vithanarachchi, 2009; Saremnzhad *i sar.*, 2011). Pukotine koje se uočavaju u unutrašnjoj strukturi uglavnom su odgovorne za lošije mehaničke karakteristike filma (Jang *i sar.*, 2011b).

Elektron skenirajuća mikroskopija je kvalitetna tehnika i za karakterizaciju strukture laminiranih i kompozitnih filmova i pruža informacije o strukturi svakog sloja i o homogenosti kompozita. Kod dobro homogenizovanih kompozitnih filmova na bazi proteina i lipida mogu se uočiti uniformno raspoređene mikropore koje potiču od dispergovane faze, slično kao kod emulzija. Kod kompozitnih filmova na bazi proteina i polisaharida, struktura je gušća i kompaktnija (Elizondo *i sar.* 2009).

3. Diferencijalna skening kalorimetrija

Diferencijalna skening kalorimetrija je tehnika koja se uspešno primenjuje za karakterizaciju termičkih karakteristika proteina - denaturaciju (Meng, i Ma, 2001; Ellepola i Ma, 2006), promenu staklastog stanja (Morales i Kokini, 1997), kao i za ocenu stanja kristalne strukture matriksa biorazgradivih filmova na bazi proteina. Uslovi pripreme i čuvanja utiču na termičke karakteristike dobijenog filma. Prisustvo plasticizera ograničava širenje staklastog područja filma i rekristalizaciju, snižavajući vrednost entalpije (ΔH) i vrednost temperature degradacije tj. denaturacije.

Fazni prelazi su promene u fizičkom stanju materijala, usled promena u temperaturi ili pritisku. Promene prvog reda ogledaju se u promeni entalpije, entropije i zapremine na temperaturi faznog prelaza (Aguilera i Stanley, 1999). Topljenje, kristalizacija, uparavanje, kondenzacija, sublimacija, geliranje ili denaturacija proteina spadaju u prelaze prvog reda (Aguilera i Stanley, 1999). Materijali sa amorfnom ili delimično amorfnom strukturom pokazuju prelaze iz tvrdog, staklastog čvrstog stanja u gumasto stanje ili stanje velikog viskoziteta, pri temperaturi specifičnoj za dati materijal - temperaturi koja se označava kao temperatura staklastog stanja (T_g) (Kalichevski *i sar.*, 1992).

Temperatura staklastog stanja (T_g) je važan parametar u proučavanju formiranja i ponašanja biorazgradivih filmova. Generalno, T_g se povećava povećanjem broja veza, brojem bočnih grupa, umrežavanjem između više molekula i stepenom kristalnosti, a smanjuje se sa povećanjem količine niskomolekularnog plasticizera. U slučaju biorazgradivih filmova, voda se ponaša kao plasticizer, smanjujući vrednost T_g (Gontard i Ring, 1996). Voda, kao niskomolekularna komponenta, povećava zapreminu slobodnog prostora i omogućava mobilnost slobodnih krajeva molekula, dovodeći do strukturne relaksacije pri nižim temperaturama. Smanjenje vrednosti T_g , u zavisnosti od plasticizacije amorfne komponente vodom ili drugim plasticizerom može imati značajan efekat na održivost i stabilnost filma (Ghanbarzadeh i Oromiehi, 2008b).

Kako sa porastom vlage amorfno materijala, vrednost T_g opada, na datoj temperaturi skladištenja, biorazgradivi film sa niskim sadržajem vlage (u staklastom stanju) ostaje duže vreme stabilan, dok isti matriks, sa povećanim sadržajem vlage prelazi u gumasto stanje, gde dolazi do molekularne reorganizacije i promene osobina materijala. U gumastom stanju, polimerni lanci poseduju veću mobilnost, koja onemogućava širenje staklastog područja i prelazak u uređeno stanje. U cilju definisanja osobina i potencijalne primene neophodno je određivanje vrednosti T_g biorazgradivih filmova. Definisane T_g moguće je upotrebom DSC i

TMA tehnika, ali treba uzeti u obzir da, su vrednosti Tg dobijene DSC niže od vrednosti Tg dobijene TMA. Chang i Randall (1992) ukazali su na veću osetljivost TMA tehnike, u poređenju sa DSC, pri određivanju Tg. U prisustvu plasticizera, dolazi do smanjenja vrednosti Tg, jer molekuli plasticizera slabe intermolekularne sile između polimernih lanaca (Guilbert i Gontard, 1995).

Zhang *i sar.* (2001) su, takođe, proučavali efekat sadržaja vlage na termičke karakteristike filmova na bazi soje, primenom DSC tehnike. Njihovi rezultati ukazuju da je sadržaj vlage krucijalan u određivanje termičkih osobina. Sa porastom sadržaja vlage, Tg proteina se značajno pomera ka nižim vrednostima, reflektujući plasticizirajući efekat vode na proteinsku mrežu.

Kokoszka *i sar.* (2010) nisu zabeležili Tg filmova na bazi SPI, u ispitivanom opsegu temperatura (25-110°C). Rezultati Su *i sar.* (2007, 2010) pokazuju da je Tg osušenog SPI≈60 °C, a da 25% udela glicerola u SPI filmu spušta Tg ispod -50 °C, a trend opadanja se nastavlja sa povećanjem sadržaja vlage. Temperatura staklastog stanja glicerola je u opsegu -50 do -80 °C, u zavisnosti od saržaja vode (Claudy *i sar.*, 1997).

Analizom DSC termograma moguće je odrediti dva važna parametra - temperaturu denaturacije (Td) i entalpiju denaturacije (Aschaffenburg i Drewry 1957). Td je temperatura koja se postiže kada entalpija denaturacije dostigne toplotnu energiju neophodnu da denaturiše protein. Entalpija denaturacije se može izračunati integraljenjem površine ispod pika Td. Drugi parametar, početna temperatura (Tm) se definiše kao tačka preseka bazne linije i krive koja se završava pikom (Td). Ona predstavlja temperaturu početka endotermnog procesa. S obzirom da na Tm koncentracija manje utiče, njena vrednost može biti određena samo na osnovu oblika krive. Sa druge strane, Td je zavisna od koncentracije ali se lakše određuje i češće se prikazuje (Wright, 1984; Harwalkar i Ma, 1996).

Kada je u pitanju Td, takođe je uočen fenomen pomeranja vrednosti Td kao posledica uticaja sadržaja vlage u uzorku. Sa porastom sadržaja vlage i dodatkom plasticizera tipa poliola, temperatura denaturacije se smanjuje. Zhang *i sar.* (2001) su proučavali efekat sadržaja vlage na termičke osobine SPI ekstrudiranih filmova i zaključili da sadržaj vlage ima ključnu ulogu u determinaciji termičkih karakteristika filma. U svojim istraživanjima Kokoszka *i sar.* (2010) ispitali su termičke osobine filmova na bazi SPI, sadržaja vlage 16 i 18 g/g s.m. i sa količinom dodatog glicerola od 40 do 70% (w/w). Vrednosti maksimalne temperature degradacije ispitanih filmova su od 64.9 ± 0.8 do 71.8 ± 2.4 °C. Suprotno tome, Denavi *i sar.* (2009) pratili su Td filmova na bazi SPI i uočili dva pika na 110 i 130 °C. Endotermni pik na 110 °C odgovara denaturaciji β-konglicinina (7S frakcija SPI), a pik na

130 °C odgovara Td temperaturi denaturacije glicinina (11S frakciji). Pomerene vrednosti Td za filmove na bazi SPI, ispitane u radu Denavi *i sar.* (2009), verovatno su posledica nižeg sadržaja vlage filmova, kao i manje količine dodatog plasticizera (1.5%, w/v).

2.4 Nedostaci i prednosti biorazgradivih filmova na bazi proteina

S obzirom na biorazgradivost i ekološku kompatibilnost, prirodni polimeri ili polimeri koji potiču od prirodnih proizvoda, poput proteina hrane ili proteina nuzporizvoda agroindustrije, pružaju dobre mogućnosti za dobijanje biorazgradivih filmova (Krochta i De Mulder - Johnston 1997). Dodatno, filmovi dobijeni na bazi proteina nuzporizvoda omogućavaju dodatnu valorizaciju i iskorišćenje ovih proteina (Gennadios i Weller, 1990). Ideja o korišćenju biorazgradljivih filmova kao ambalažni materijal, za pakovanje hrane, zasniva se na osobinama filmova koje im daju karakteristike ambalažnog materijala. Uprkos tome, postoje i faktori koje ograničavaju njihovu primenu (skepticizam prodavaca i korisnika, cena uvođenja nove tehnologije proizvodnje, karakteristike novih filmova). U cilju efikasne primene kao ambalažni materijal, filmovi moraju imati zadovoljavajuće barijerne karakteristike. Proteinski filmovi imaju odlična barijerna svojstva prema gasovima, ali zbog hidrofilne prirode pokazuju veliku propustljivost vodene pare (Krochta, 2002). Iako pokazuju konkurentne mehaničke osobine, u poređenju sa sintetičkim polimerima, biopolimeri se teško procesuiraju pa im je i primena ograničena. Karakteristike biorazgradljivih polimera koje predstavljaju prepreku i nedostatak za njihovu širu primenu prvenstveno su osetljivost na vlagu i starenje usled hemijskih i fizičkih promena u filmu.

2.4.1 Nedostaci biorazgradivih filmova na bazi proteina

Glavni problem pri primeni biorazgradivih filmova je njihova hidrofilna priroda, s obzirom na potrebe ambalažnih materijala za pakovanje hrane da budu rezistentni na vlagu. Većina biorazgradivih proteinskih filmova je nerastvorna ili teško rastvorna u vodi, ali pokazuje veliki stepen absorbovanja vode i bubrenja, i veliku propustljivost vodene pare. Veliki nedostatak je promena mehaničkih i barijernih karakteristika usled povećanja vlage u okruženju. Osetljivost na vlagu dovodi do spontane, brže i nekontrolisane razgradnje delovanjem bakterija (primer loše strane biorazgradivosti) (Olabarrieta, 2005).

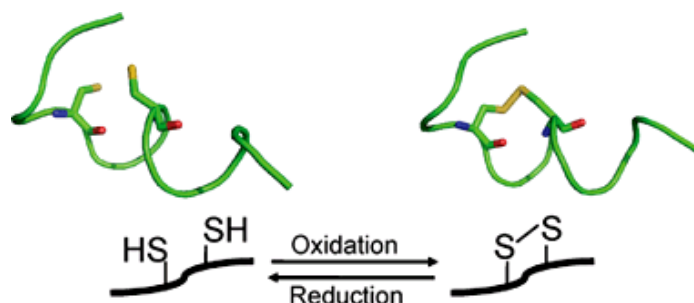
Drugi veliki nedostatak biorazgradivih filmova je promena osobina tokom vremena tj. starenje. Jedan od uslova za uspešnu primenu biorazgradivih polimera je kontrolisan vek trajanja. Biorazgradivi materijal mora biti stabilan i funkcionalan za vreme skladištenja i

primene upakovanog proizvoda, a nakon toga mora biti efikasno biorazgradiv. Jedino adekvantom kontrolom aktivnosti vode, pH, nutrijenata, temperature, nivoa kiseonika i vremena, može se očuvati integritet upakovanog proizvoda i mikrobiološka stabilnost. Zbog toga, biorazgradivi proteinski filmovi čuvani u suvom okruženju mogu biti upotrebljeni za pakovanje suvih prehrambenih proizvoda u relativno dugom vremenskom periodu, dok je čuvanje u vlažnim uslovima i namernica sa većim sadržajem vlage ograničeno (Krochta i De Mulder, 1997).

Biorazgradivi proteinski filmovi podložni su promenama karakteristika tokom vremena i starenja, pa je njihova komercijalna primena, još uvek, ograničena. Starenje filmova može biti posledica fizičkih ili hemijskih reakcija polimernog matriksa. Najčešće promene koje dovode do starenja filmova su: 1. Fizičko starenje usled migracije plasticizera i matriksa i 2. Hemijsko starenje oksidacijom

1. *Fizičko starenje* je fizički proces kom podleže film zbog migracije plasticizera na površinu filma. Generalno, migracija niskomolekularnih komponenti dovodi do ugušćenja i neelastičnosti polimerne mreže, što može dovesti do smanjenja zaštitne uloge filma i postepenog smanjenja roka trajanja upakovanog proizvoda (Olabarrieta, 2005). Molekulska masa, koncentracija i hidrofobni/hidrofilni karakter utiču na migraciju plasticizera iz matriksa filma. Voda, kao najsnažniji plasticizer proteinskih biorazgradivih filmova, takođe vremenom migrira iz matriksa ka površini i isparava, povećavajući krtost filmova (Gontard i Ring, 1996).

2. *Hemijsko starenje* oksidacijom - ispitivanja pokazuju da vremenom dolazi do formiranja disulfidnih veza tiolnom oksidacijom za vreme skladištenja glutenskih filmova, čak i pod uslovima (temperatura i relativna vlažnost) pod kojim je mobilnost molekula redukovana. Zbog toga dolazi do promena u mehaničkim osobinama, u zavisnosti od brzine tiolne oksidacije nastale tokom sušenja i starenja filma (Morel *i sar.*, 2000).



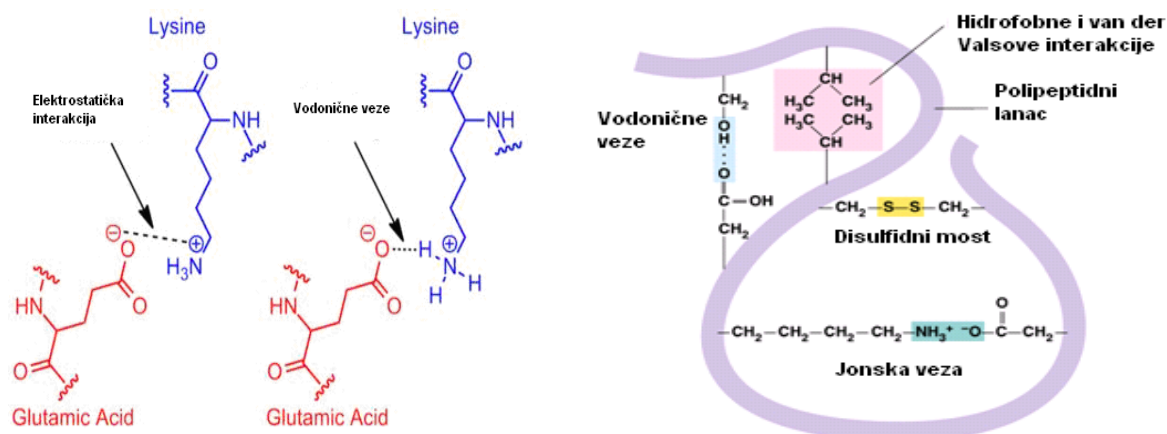
Slika 16. Šema reakcije tiolne oksidacije u molekulu proteina

Sulfhidrilne grupe u cisteinu su odgovorne za disulfidno umrežavanje tokom procesa tiolne oksidacije (*Slika 16*) (Gällstedt, 2004). Ovaj proces je povezan sa temperaturnim

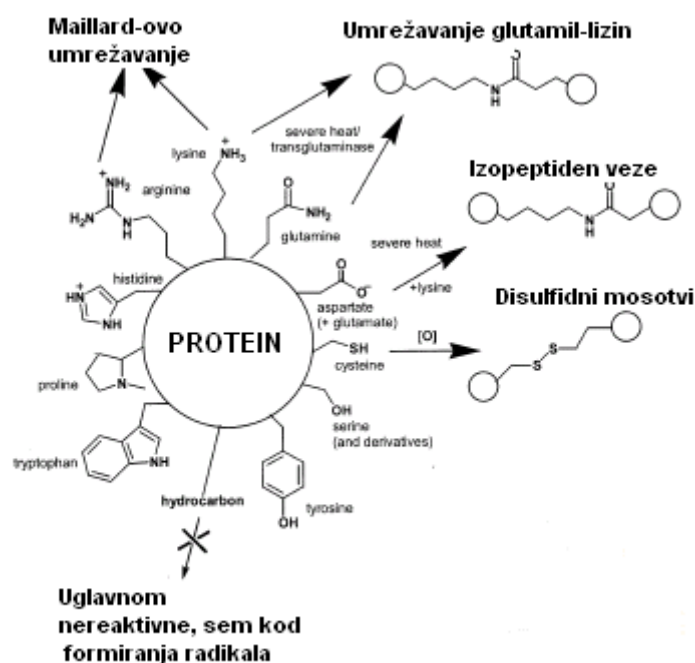
tretmanom tokom formiranja filma, i od ključnog je značaja za dobijanje dobrih mehaničkih osobina filma (Roy *i sar.*, 1999). Za vreme skladištenja, može doći do oksidacije neizreagovanih tiolnih grupa i reorganizacije intramolekulatrnih disulfidnih veza u intermolekularne veze, reakcijama tiol-disulfidne razmene. Ovaj proces indukuje porast agregacije proteina i krtosti strukture filma (Lindsay i Skerritt, 1999).

2.4.2 Prednosti biorazgradivih filmova na bazi proteina

Mehaničke osobine biorazgradivih filmova na bazi proteina bolje su u poređenju sa osobinama filmova na bazi polisaharida i lipida, zahvaljujući jedinstvenoj strukturi molekula proteina koja daje širi opseg funkcionalnih svojstava, a posebno visok potencijal intermolekularnog umrežavanja (Cuq *i sar.*, 1995). U filmovima na bazi proteina može se formirati veliki broj veza na različitim pozicijama u molekulima (Ou *i sar.*, 2005). Zahvaljujući velikom broju reaktivnih polarnih grupa i ekstenzivnoj interakciji među polimernim lancima proteina, formirani filmovi imaju impresivne barijerne karakteristike prema gasovima, u poređenju sa sintetičkim filmovima i sa biorazgradivim filmovima na bazi polisaharida i lipida (Bourtoom, 2008). Filmovi se formiraju i stabilizuju putem elektrostatičkih interakcija, vodoničnih veza, van der Valsovih sila, kovalentnih veza i disulfidnih mostova (Krochta *i sar.*, 1994) (*Slika 17 i 18*). Proteini imaju višestruke aktivne centre na kojima hemijski reaguju, što im omogućava povezivanje i poboljšanje osobina filma. Disulfidni mostovi predstavljaju najčešći tip kovalentnog povezivanja proteina, koji je i najznačajniji za formiranje filmova. Promene koje nastaju usled formiranja disulfidnih veza utiču na povećanje sposobnosti formiranja filmova kod raznih vrsta proteina uključujući proteine mleka, soje, jaja, mesa i nekih biljnih proteina. Prisustvo cisteina omogućava formiranje disulfidnih veza, visoka koncentracija leucina, alanina ili drugih nepolarnih amino kiselina daje nekim proteinima hidrofobni karakter (npr. zein) (Dangaran *i sar.*, 2009). Za efiksanost umrežavanja u prisustvu transglutaminaze, odgovorni su glutaminski i lizinski ostaci, dok je Maillard-ova reakcija tipična za lizin i arginin. Netipično Maillard-ovo umrežavanje se može javiti kod proteina koji sadrže histidin, prolin i triptofan (Gerrard, 2002).



Slika 17. Primeri veza koje stabilizuju proteinsku mrežu u biorazgradivom filmu



Slika 18. Modifikovana šema reakcija umrežavanja koje se dešavaju tokom procesuiranja hrane (Feeney i Whitaker, 1988; Singh, 1991; Friedman, 1999a; Gerrard, 2002).

Proteinski filmovi dobijeni „Casting“ metodom, uglavnom se dobijaju iz proteinskih rastvora ili disperzija. Primena rastvarača je ograničena na vodu, etanol ili smešu etanol-voda (Kester i Fennema, 1986). Generalno, proteini moraju biti denaturisani toplotom i delovanjem kiseline, baze, i/ili rastvarača i oslobađaju funkcionalne, aktivne grupa molekula, neophodne za umrežavanje i formiranje filma. Jednom narušena proteinska struktura, ponovnim povezivanjem vodoničnim, jonskim, hidrofobnim i kovalentnim veza, ponovo se uspostavlja, uređena na drugi način. Uniformna raspodela polarnih, hidrofobnih, i/ili tiolnih grupa duž

polimernog lanaca povećava verovatnoću odgovarajućih interakcija. Povećana interakcija među proteinskim lancima, uzrokuje dobijanje jačih, ali manje fleksibilnih filmova, koji manje propuštaju gasove (Kester i Fennema, 1986). Polimeri sa funkcionalnim grupama, koje se povezuju vodoničnim ili jonskim vezama, daju filmove koji imaju odlična barijerna svojstva prema kiseoniku, ali su osetljivi na vlagu (Salame, 1986). Tako se od proteinskih filmova očekuje da budu dobra barijera za kiseonik, pri niskoj vlažnosti vazduha. Pri malim količinama vlage, biorazgradivi filmovi na bazi sojinih proteina imaju nekoliko stotina puta manju propustljivost kiseonika, u poređenju sa LDPE, metilcelulozom, skrobom i pektinom (Cuq *i sar.*, 1998). Dobra barijerna svojstva prema kiseoniku pokazuju biorazgradivi filmovi na bazi proteina surutke (Hong i Krochta, 2006).

2.5 Tehnike modifikacije i poboljšanja karakteristika biorazgradivih filmova

Veliki broj istraživanja bavi se poboljšanjem svojstava biorazgradivih filmova na bazi proteina (Oh *i sar.*, 2004; Tang i Jiang, 2007; Bourtoom, 2009; Cao *i sar.*, 2009). Metode modifikacije karakteristika filmova obuhvataju hemijske (Ke *i sar.*, 2011), fizičke (Hoque *i sar.*, 2010; Kowalczyk i Baraniak, 2011) i enzimske metode (Di Pierro *i sar.*, 2006, 2011), sve u cilju poboljšanja mehaničke čvrstoće i barijernih svojstva prema vodenoj pari.

Sve primenjene metode poboljšanja karakteristika biorazgradivih filmova, prevashodno utiču na strukturu proteina i način njihovog povezivanja. Na strukturu proteina i međusobnu interakciju u filmu, velik uticaj imaju uslovi rastvaranja proteina, tretman proteinskog rastvora/ekstrakta, kao i uslovi umrežavanja tj. obrazovanja filma. Na primer, ultrazvučni tretman prilikom dobijanja filma verovatno će remetiti postojeći proteinske interakcije, dovodeći do povećane molekularne interakcije (Banerjee *i sar.*, 1996). Temperaturni tretmani rastvora filma uzrokuju denaturaciju proteina, kao posledicu raskidanja disulfidnih i vodoničnih veza. Rezultat je mogućnost novog unakrsnog povezivanja proteina i formiranja novih intermolekularnih veza, a time i promena osobina filma. Većina proteina prolazi kroz takav tretman tokom obrazovanja filma, a uticaj različitih spoljnih faktora na formiranje proteinske mreže i na svojstva nastalih filmova može biti drastičan (Peres-Gago *i sar.*, 1999). Modifikovana interakcija proteina može nastati i zbog promene pH rastvora filma (Mauri i Añón, 2006; 2008; Wang *i sar.*, 2008; Kowalczyk i Baraniak, 2011). Generalno, uticaj pH na karakteristike biorazgradivih filmova može biti veći i od uticaja temperature (Lent *i sar.*, 1998). Rezultati ispitivanja uticaja uslova dobijanja proteinskih filmova ukazuju

da povećanje pH filmogenog rastvora poboljšava mehaničke karakteristike (TS i EB) i rastvorljivost filmova na bazi proteina boba (eng. Faba bean), a smanjuje propustljivost vodene pare i prozirnost (Sarmnezhad *i sar.*, 2011). Uočen je i značajan uticaj pH sredine na fizičko-hemijske osobine filmova na bazi proteinskog izolata *Vigna unguiculat*. Bourtoom (2008) je ukazao na značajan uticaj pH i temperature na osobine filmova na bazi proteina boba, za razliku od vremena temperaturnog tretmana, koje nije imalo značajan uticaj.

Hemijske metode modifikacije filmova

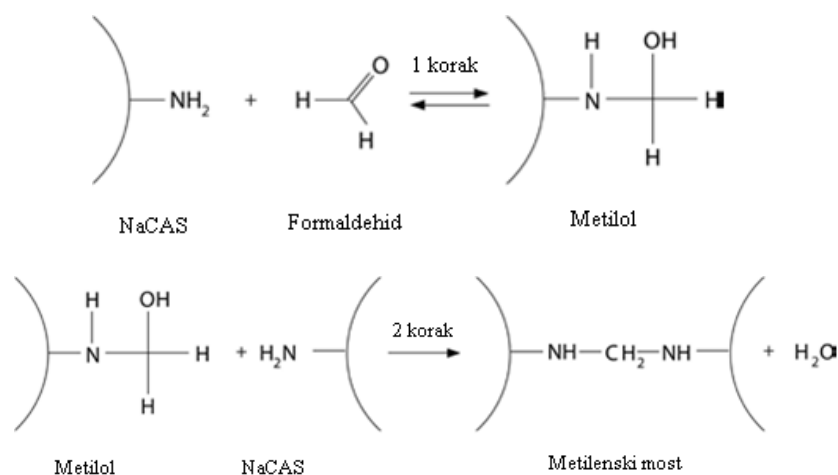
Radi poboljšanja karakteristika filma, neophodno je prisustvo plasticizera, koji smanjuju krutost. Vrsta i količina primenjenog plasticizera utiču na interakcije među molekulima proteina, smanjujući jačinu intermolekularnih sila i povećavajući elastičnost. Plasticizeri se dodaju da bi se smanjila krutost filma i povećalo izduženje pri maksimalnoj zateznoj jačini. Generalno, sa porastom količine plasticizera, povećava se propustljivost filma i izduženje pri maksimalnoj TS, dok TS opada (Krochta, 2002; Skurtys *i sar.*, 2010; Jang *i sar.*, 2011b; Vieira *i sar.*, 2011). Pri produkciji filmova na bazi proteina, odabir odgovarajućeg plasticizera omogućava postizanje željenih mehaničkih osobina, uz minimalan uticaj na barijerna svojstva. Ipak, neophodna su dodatna istraživanja u cilju optimizacije vrste i količine plasticizera, da bi njihova primena bila što efikasnija. Optimalan izbor plasticizera može da poboljša, već odličnu barijernu sposobnost proteinskog filma prema kiseoniku. Prisutni plasticizer ne može da smanji propustljivost vodene pare proteinskog filma. Kako upotreba niskomolekularnih plasticizera, npr. glicerola, prouzrokuje mnoge probleme pri korišćenju biorazgradljivih filmova (porast difuzije gasova i vodene pare kroz film, migracija plasticizera), moguća je njihova zamena plasticizerima većih molekulskih masa, sa hidrofobnim karakterom (Pommet *i sar.*, 2003). Supstance proučavane kao moguća zamena glicerolu su amfifilni molekuli, uključujući masne kiseline (oleinska, stearinska) (Pommet *i sar.*, 2003), oktanska i palmitinska kiselina, dibutil ftalat i tartarati (Di Gioia i Guilbert, 1999). Radi smanjenja migracije plasticizera, mnoga istraživanja su se bavila uporednom analizom više različitih hidrofilnih plasticizera (različitih dužina lanaca) i njihovog uticaja na mehaničke osobine proteinskih filmova (McHugh i Krochta, 1994; Sothornvit i Krochta, 2000b; Mangavel *i sar.*, 2003; Bortoom *i sar.*, 2006; Cao *i sar.*, 2009). Ipak, glicerol je i dalje najzastupljeniji i najefikasniji plasticizer proteinskih filmova (Orliac *i sar.*, 2003; Skurtys *i sar.*, 2010).

Jedna od mogućnosti poboljšanja osobina filma je modifikacija polimerne mreže umrežavanjem polimernih lanaca. Prisustvo reaktivnih bočnih grupa u molekulu proteina omogućava umrežavanje polipeptidnih lanaca hemijskim, enzimskim ili fizičkim tretmanom, u cilju poboljšanja funkcionalnosti dobijenog proteinskog filma. Hemijski tretmani kiselinama, bazama ili agensima za umrežavanje intenzivno se primenjuju za poboljšanje svojstva filmova.

Generalno, hemijska reaktivnost proteina zavisi od aminokiselinskog sastava, prisustva slobodnih amino i karboksilnih grupa (Means i Feeney, 1971). Najreaktivnije proteinske grupe su: kod serina (primarna -OH), hidrokisprolina (sekundarna -OH), treonina (sekundarna -OH), tirozina (fenolna -OH), aspartanske kiseline (-COOH), glutaminske kiseline (-COOH), lizina (-NH₂) i arginina (-C(:NH).NH₂) (Finch, 1983).

Još 1986. god., Guilbert je pokazao da denaturisani proteini obrazuju manje fleksibilne i transparentne filmove, ali sa većim stepenom otpornosti na vlagu. Teoretski, nakon hemijskog tretmana, kao što je modifikacija kiselinama i bazama, dolazi do većeg broja proteinskih interakcija i povećanja gustine proteinske mreže, čime se smanjuje propustljivost i povećava TS.

Hemijska sredstva koja se najčešće koriste za kovalentna umrežavanje proteina podrazumevaju aldehidne komponente, uključuju glutraldehid, formaldehid, gliceraldehid, glioksal itd (Bigi *i sar.*, 2001; Marquié, 2001; Orliac *i sar.*, 2002; Hernández-Muñoz *i sar.*, 2004; Audic i Chaufer 2005; Ke *i sar.*, 2011). Formaldehid je najjednostavnije sredstvo za umrežavanje i ima najširu specifičnost reakcije. Iako formaldehid sadrži jednu funkcionalnu grupu, može da reaguje dvo-funkcionalno i stoga može da učestvuje u umrežavanju. Reakciona šema umrežavanja proteina u prisustvu formaldehida prikazana je na *Slici 19*. Reakcija između formaldehida i proteina teče u dva koraka: prvi korak odgovara formiranju jedinjenja metilol, a drugi odgovara formiranju metilenskih mostova koji se uspostavljaju unakrsno između proteinskih lanaca. Glutraldehid je specifičniji od formaldehida, i može da reaguje sa lizinom, cisteinom, histidinom i tirozinom (Tae, 1983). Umrežavanje proteina u prisustvu glioksala podrazumeva prisutnost lizinskih i argininskih bočnih ostataka (Marquié, 2001), u alkalnoj sredini.



Slika 19. Šematski prikaz umrežavanja proteinskih ϵ -amino grupa u prisustvu formaldehida (Gueguen *et al.*, 1998).

Hernández-Muñoz *i sar.* (2004) objavili su rezultate istraživanja umrežavanja gluteninom bogatih filmova, u prisustvu hemijskih agenasa za umrežavanje - glutaraldehida (GTA), glioksala (Gli) i formaldehida (FA). Rezultati pokazuju da umrežavanje u prisustvu hemijskih agenasa poboljšava barijerna svojstva prema vodenoj pari, povećava otpornosti na lom, a smanjuje deformabilnosti filma. Formiranje otpornijih filmova sugerise pojavu novih kovalentnih veza između glutenina u proteinu, putem hemijskih reakcija FA, GTA i Gli i reaktivnih amino-kiselinskih bočnih grupa. FA je najefikasniji agens za umrežavanje, uzimajući u obzir sve ispitane osobine. Formaldehid je male molekulske mase, lako migrira između lanaca proteina i uspostavlja nove kovalentne veze sa Lis, Cis i His grupama proteina (Galiotta *i sar.*, 1998). Veće vrednosti TS za filmove tretirane formaldehidom mogu biti posledica nedostatka specifičnosti ovog hemijskog agenasa, prema različitim amino-kiselinskim bočnim grupama proteinskog lanca. Ipak, zbog toksičnosti hemijskih agenasa, primena biorazgradivih filmova za pakovanje hrane, dobijenih u prisustvu aldehidnih agenasa za umrežavanje je ograničena, zbog ostataka aldehida u filmu i njihove moguće migracije u upakovani prizvod (González *i sar.*, 2011). Novi, prirodni agens za umrežavanje – genipin, 10 000 puta je manje citotoksičan od glutaraldehida (Song i Zhang, 2009; Yuan *i sar.*, 2007). Literaturni podaci ukazuju na mogućnost primene genipina, kao umrežavajućeg sredstva, pri dobijanju biorazgradivih filmova na bazi želatina (Bigi *i sar.*, 2002; Yao *i sar.*, 2004) i protienskog izolata soje (González *i sar.*, 2011).

Mehanizam reakcije umrežavanja između genapina i proteina zavisi od pH sredine. U kiselom okruženju, nukleofilni napad amino grupe na olefinski C atom, praćen je otvaranjem dihidropirinskog prstena i napadom sekundarne amino grupe na novonastalu

aldehidnu grupu (Gonzales *i sar.*, 2011). Potvrda reakcije umrežavanja moguća je FTIR analizom. Karakteristični adsorpcioni pikovi SPI javljaju se na 3000–3500 cm^{-1} (potiču od istezanja O–H i N–H veza), 2925 cm^{-1} (potiču od istezanja C–H veze), 1668 (amide I, potiču od istezanja C=O veze), 1548 cm^{-1} (amide II, potiču od istezanja N–H veze) i 1238 cm^{-1} (amide III, potiču od istezanja C–N veze). Nakon umrežavanja sa genapinom, dolazi do povećanja adsorpcija u oblasti 1668 cm^{-1} usled formiranja novih amidnih veza između SPI i genapina. Takođe, uočen je relativni porast adsorpcije na talasnom broju 2925, 1048, 1238 i 854 cm^{-1} usled povećanja broja C–O, C–N i C–H veza (Gonzales *i sar.*, 2011).

Ostali hemijski agensi koji se primenjuju u cilju modifikacije i poboljšanja karakteristika biorazgradivih filmova podrazumevaju dodatak aktivnih komponenti, uključuju antioksidanse ili antimikrobne komponente koje pojačavaju zaštitno delovanje filmova, aditive, emulgatore (površinski aktivne materije) (Bourtoom, 2009).

Kreiranje kompozitnih filmova (uvođenjem polisaharida ili hidrofobnih materijala - lipida ili voskova) (Morillon *i sar.*, 2002; Ferreira *i sar.*, 2009; Perez-Mateos *i sar.*, 2009) takođe je vid hemijske modifikacije proteinskih filmova.

Fizičke modifikacije filmova

U cilju dobijanja filmova sa poboljšanim karakteristikama, mogu se primeniti različiti fizički postupci: jonizujuće zračenje – UV i gama zračenje (Ciésla *i sar.*, 2006; Lee *i sar.*, 2005; Soliman *i sar.*, 2009), termički tretman (Muñoz *i sar.*, 2004; Bonewll i Wetzell, 2009; Hernández- Hoque *i sar.*, 2010; Kowalczyk i Baraniak, 2011) itd.

Gama zračenje kao predtretman u postupku dobijanja koristi se za poboljšanje karakteristika biorazgradivih filmova. Umrežavanje gama zračenjem je efikasna metoda za poboljšanje i barijernih i mehaničkih osobina filmova (Rhim *i sar.*, 1999; Sabato *i sar.*, 2001; Lacroix *i sar.*, 2002; Ciesla *i sar.*, 2004). Drugi, slabiji oblik elektromagnetskog zračenja je ultraljubičasto zračenje (UV) (Rhim *i sar.*, 1999; Micard *i sar.*, 2000). Umrežavanje utiče na modifikaciju proteinske strukture (Bourtoom, 2009).

Gama zračenje utiče na promene konformacije molekula proteina, oksidacije aminokiselina, na raskidanje kovalentnih veza i formiranje proteinskih slobodnih radikala (Cheftel *i sar.*, 1985). Hemijske promene u proteinima koje su uzrokovane gama zračenjem podrazumevaju fragmentaciju molekula, unakrsno povezivanje, agregaciju, i oksidaciju radikalima kiseonika koji se generišu tokom radiolize vode (Schuessler i Schillinga, 1984; Filali-Mouhim *i sar.*, 1997; Cho i Song, 2000). Hidroksilni i super-oksid anjonski radikali,

koje se generišu zračenjem filmogenog rastvora, mogu modifikovati osobine molekula proteina, što dalje može dovesti do promene u kovalentnom umrežavanju proteina u rastvoru, nakon zračenja (Garrison, 1987). Umrežavanje indukovano gama zračenjem predstavlja efikasan metod za unapređenje barijernih i mehaničkih osobina biorazgradivih filmova na bazi proteina. Ozračivanjem vodenih rastvora proteina generišu se hidrosil radikali (OH*) koji proizvode stabilna jedinjenja kao što je bitirozin (Brault *i sar.*, 1997).

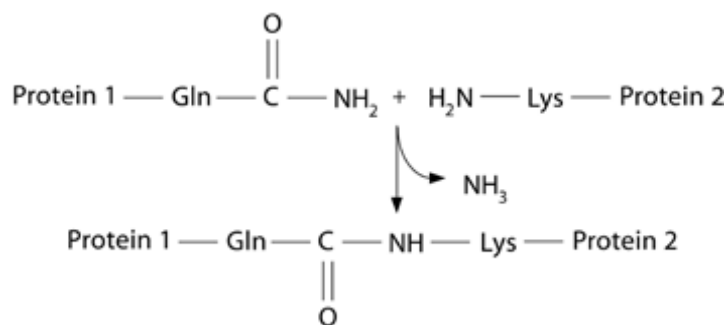
Lacroix *i sar.* (2002) ukazuju da je gama zračenje efikasna metoda za indukovanje procesa umrežavanja pri dobijanju biorazgradivih filmova na bazi proteina surutke, kazeina i sojinih proteina. Modifikacija konformacije proteina može biti posledica procesa zračenja, uključujući modifikaciju koja dovodi do stabilnije i uređenije strukture. Ouattara *i sar.* (2002) su primenili postupak umrežavanja, delovanjem gama zračenja, u cilju poboljšanja barijernih osobina i hemijske stabilnosti filmova proteina mleka. Rezultati su pokazali da gama zračenja statistički značajno ($p < 0.05$) smanjuje propustljivost vodene pare i povećana otpornost na mikrobiološke i enzimske biodegradacije. Uočeno je i povećanje koncentracije proteina visokih molekularnih masa u formiranom filmu. Uticaj gama zračenja se može objasniti učešćem većeg broja molekularnih ostataka u interakcijama između proteina različitih fizičko-hemijskih svojstava tokom procesa umrežavanja (Ouattara *i sar.*, 2002). Rezultati Lee *i sar.* (2004) pokazuju da gama zračenje rastvora SPI izaziva prekid uređenosti strukture molekula SPI, kao i degradaciju, agregaciju i umrežavanje polipeptidnih lanaca, što dovodi do smanjenja propustljivosti vodene pare za 13%. Pored toga, TS filmova na bazi SPI udvostručena je primenom gama zračenja. Rezultati jasno ukazuju da gama zračenje može biti vrlo korisno za intenziviranje procesa umrežavanja, tokom dobijanja proteinskih filmova i poboljšanja funkcionalnih osobina filmova. Lee *i sar.*, (2005) proučavali su efekat gama zračenja i na fizičko-hemijske osobine glutenskih filmova.

Termički tretman rastvora filma kao metoda za poboljšanje karakteristika biorazgradivih filmova veoma je zastupljen. Veliki broj studija opisuje karakteristike proteinskih filmova modifikovanih kontrolisanim termičkim tretmanom (Hernández-Muñoz *i sar.*, 2004; Pommet *i sar.*, 2004; Bonewill i Wetzell, 2009; Hoque *i sar.*, 2010; Kowalczyk i Baraniak, 2011). Rezultati ukazuju da zagrevanje pri povišenoj temperaturi povećava čvrstoću i otpornost ka vodenoj pari, što je posledica denaturacije molekula proteina i ponovno formiranje intermolekularnih disulfidnih veza, neophodnih za obrazovanje postojećih filmova (McHugh i Krochta, 1994; Hernández-Muñoz *i sar.*, 2004; Pommet *i sar.*, 2004; Karbowiak *i sar.*, 2007). Zagrevanjem se narušava prostorna struktura proteina, dostupniji postaje veći broj

funkcionalnih bočnih amino-kiselinskih ostataka, koje imaju sposobnost uspostavljanja većeg broja disulfidnih, vodoničnih i hidrofobnih veza.

Enzimske modifikacije filmova

Efikasna metoda za poboljšanje karakteristika je modifikacija matriksa filma umrežavanjem u prisustvu enzima. Enzim koji se najčešće koristi za umrežavanje proteina je transglutaminaza. Transglutaminaza (TGaza, protein-glutamin γ -glutamil transferaza, EC2.3.2.13) katalizuje acil transfer reakcije između γ -karboksamidne grupe glutaminskog ostataka (acil donatora) i ϵ -amino-grupa lizinskog ostataka (acil akceptor), što dovodi do ϵ -(γ -glutamini)lizin intra i intermolekularnog umrežavanja proteina (Yokoyama *i sar.*, 2004). Reakcija katalizovana glutamiltransferazom prikazana je na *Slici 20* (Yee *i sar.*, 1994). Zbog viske cene i male dostupnosti, primena transglutaminaze je bila ograničena. Danas, transglutaminaza, dobijena iz mikrobnih izvora, ima znatno nižu cenu i komercijalno je dostupna. To omogućava iskorišćenje potencijala ovog enzima kao umrežavajućeg agensa. TGaza mikrobiološkog porekla ima prednost u odnosu na druge TGaze jer njena aktivnost ne zavisi od koncentracije Ca^{2+} jona, za razliku od TGaze izolovane iz jetre sisara. Za dobijanje TGaze primenjuju se sojevi *Streptovercillium*-a, najčešće *S. griseocarneum*, *S. cinnamoneum* subsp. *Cinnamoneum* i *S. morbaraense*.



Slika 20. Reakcija umrežavanja proteina katalizovana transglutaminazom (Yee *et al.*, 1994)

Polimerizacija TGazom ispitivana je na različitim proteinima, uključujući SPI, kazein, proteine surutke, želatin, pšenični gluten, proteinski izolat kikirikija, kukurbitin iz tikve golice (Mariniello *i sar.*, 2003; Oh *i sar.*, 2004; Tang i Jiang, 2007; Popović *i sar.*, 2013). U većini slučajeva, TGaza se koristi za umrežavnje molekula jedne vrste proteina. Međutim, reakcija umrežavanja se može primeniti i na glutaminski i lizinski ostatak dva različita proteina, formirajući na taj način heteropolimer (Oh *i sar.*, 2004; Yokoyama *i sar.*, 2004; Taylor *i sar.*, 2005; Chambi i Grosso, 2006; Di Pierro *i sar.*, 2007). Umrežavanjem dva

proteina različite strukture dobija se molekul sa potpuno novim osobinama, ali je vrlo teško biti siguran da je došlo do umrežavanja dva proteina, a ne jednog od njih (Han i Damodaran, 1996). Indirektni dokaz o umrežavanju dva proteina je promena u funkcionalnim osobinama proteina (De Jong i Koppelman, 2002). Analiza SDS-gel elektroforezom može potvrditi formiranje heteropolimera (Oh *i sar.*, 2004; Chambi i Grosso, 2006). Oh *i sar.* (2004) su primenili TGazu za umrežavanje proteina surutke i kazeina, u prisustvu hidrolizata zeina. Ovako dobijeni filmovi pokazivali su veće EB, ali manju TS, dok je promena u propustljivosti vodene pare bila zanemarljiva. Heterogeno umrežavanje između dva proteina TGazom zavisi od kompatibilnosti smeše proteina kao supstrata prema aktivnom centru enzima (Han i Damodaran, 1996). Umrežavanja dve vrste proteina ili proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, izvedena su pri produkciji filmova na bazi hitozana i proteina surutke (Di Pierro *i sar.*, 2006; 2011), hitozana i ovalbumina (Di Pierro *i sar.*, 2007), proteina surutke i hidrolizata zeina (Oh *i sar.*, 2004), sojinog brašna i pektina (Mariniello *i sar.*, 2003), želatina i kazeina (Chambi i Grosso, 2006), čime su unapređene mehaničke i barijerne osobine dobijenih filmova.

2.6 Dobijanje i osobine kompozitnih filmova

Barijerna svojstva biorazgradivih filmova važan su parametar prilikom razmatranja potencijalne primene za pakovanje hrane i lekova. Proteinski filmovi imaju generalno dobra barijerna svojstva prema kiseoniku, pri niskim i srednjim vrednostima RH, ali predstavljaju lošu barijeru prema vodenoj pari, što je posledica hidrofilne prirode. U cilju efikasne primene, neophodna su bolja barijerna svojstva prema vodenoj pari, s obzirom na potrebu niskih a_w vrednosti upakovane namernice, kako bi se sprečila degradacija teksture i smanjile neželjene hemijske i enzimske reakcije (Kester i Fennema, 1986). Često primenjivana metoda za poboljšanje barijernih svojstava filmova prema vodenoj pari je inkorporacija hidrofobnih komponenti, npr. lipida u rastvor filma tj. produkcija *kompozitnih filmova protein/lipid* (Bortoom, 2009; Perez-Mateos *i sar.*, 2009; Wang *i sar.*, 2009; Zahedi *i sar.*, 2010). Umrežavanje lipidnih komponenti (voskova i masnih kiselina) ograničava migraciju vlage s obzirom na hidrofobnu prirodu lipida, filmovima poboljšava strukturni integritet i time im daje čvrstoću (Gontard *i sar.*, 1994). U cilju dobijanja kompozitnih filmova na bazi emulzije, rastvoru proteina se dodaje lipidna komponenta i površinski aktivna materija. Smeša se zagreva do temperature iznad tačke topljenja lipida, a nakon toga homogenizuje.

Istraživanja koja su se bavila efikasnošću inkorporacije lipida u proteinske filmove, potvrdila su pozitivan efekat masnih kiselina (stearinske i palmitinske), parafina ili pčelinjeg voska, estara masnih kiselina i karnauba voska (Bertan *i sar.*, 2005).

Kompozitni filmovi na bazi proteina i lipida, posebno onih visoke tačke topljenja, kao što su Karnauba i drugi voskovi (Morillon *i sar.*, 2002) predstavljaju efikasan model u rešavanju problema visoke propustljivosti vodene pare proteinskih filmova. Kompozitni filmovi protein/lipid mogu se podeliti, u zavisnosti od postupka dobijanja na: (i) laminirane (u kojem lipidna komponenta predstavlja poseban sloj unutar ili na površini biopolimernog filma) i (ii) emulgovane (u kojima je lipidna komponenta uniformno raspoređena u celom biopolimernom filmu). Postoje prednosti i laminiranih i emulgovanih filmova: laminirani filmovi su jednostavniji za dobijanje i primenu, u kontekstu primenjene temperature, zbog različite prirode matriksa i lipida (Koelsch, 1994). Tokom razlivanja lipidne komponente na proteinski film, temperature filma i lipida mogu se lako posebno kontrolisati. Kod proizvodnje filmova na bazi emulzije, temperatura emulzije mora biti iznad temperature topljenja lipida, ali ispod temperature primenjenog proteinskog rastvarača. Osnovni nedostatak laminiranog filmova je tehnika pripreme, koja zahteva četiri faze, dve za izlivanje i dve za sušenje. To je razlog manje primene laminiranih filmova u prehrambenoj industriji, uprkos njihovom dobrim barijernim svojstvima prema vodenoj pari (Limpisophon *i sar.*, 2010). Priprema filmova na bazi emulzija obuhvata jedno izlivanje i jednu fazu sušenja, ali dobijeni filmovi i dalje imaju prilično loše barijere karakteristike prema vodenoj pari, jer molekuli vode i dalje penetriraju kroz nelipidnu fazu. Razlog ovome je nehomogena distribucija lipida. Prednost ovih filmova su dobra mehanička svojstva, pored manjeg broja koraka neophodnih za pripremu. Pokazano je da kod pripreme emulzionih filmova, što su manje lipidne kapi, homogeniji film se dobija, pa je propustljivost vodene pare manja (Perez Gago i Krochta, 2001). Mnogi istraživači su se bavili ispitivanjem propustljivosti vodene pare i mehaničkim osobinama kompozitnih filmova na bazi proteina i lipida. McHugh (2000) i Morillon *i sar.* (2002) objavili su opširne revijalne radove na temu propustljivosti vodene pare proteinskih filmova inkorporiranih lipidima. Kompozitni filmovi protein/lipid imaju manje vrednosti za propusnost vodene pare od kontrolnih filmova na bazi želatina (Bertan *i sar.*, 2005; Jongjareonrak *i sar.*, 2006a), kazeina (Fabra *i sar.*, 2008), proteina surutke (Anker *i sar.*, 2002), SPI (Monedero *i sar.*, 2009) i proteina pistaća (Zahedi *i sar.*, 2010).

Emulzije kod kojih hidrofobnu komponentu čine masne kiseline i voskovi pokazuju malu propustljivost vodene pare (Bourtoom, 2009). Rezultati Gontard *i sar.* (1994) pokazuju da je vosak najefikasniji lipid koji poboljšava barijerna svojstva prema vodenoj pari filmova

na bazi pšeničnog glutena. Kombinovanje pšeničnog glutena sa diacetil tartarat estrom monogliceridom smanjuje propustljivost vodene pare, a povećava TS i održava transparentnost. Anker *i sar.* (2002) proizveli su kompozitni film (laminirani i emulzioni) na bazi WPI i lipida u cilju poboljšanja barijernih karakteristika proteinskog filma. Laminirani film WPI-lipid pokazuje smanjenu propustljivost vodene pare 70 puta, u poređenju sa WPI filmom. Propustljivost vodene pare emulzionih filmova dva puta je manja u poređenju sa propustljivošću WPI filma. Što se tiče mehaničkih osobina, rezultati pokazuju da lipidi funkcionišu kao efikasni plasticizeri poboljšavajući mehaničku otpornost filmova. Bertan *i sar.* (2005) su inkorporirali Brazilski elemi (visoko hidrofobno smolasto ulje) u želatinski film, u prisustvu palmitinske i stearinske kiseline, u cilju procene poboljšanja fizičkih karakteristika proteinskog filma, koji sadrži glicerol triacetat kao plasticizer. Filmovi sa dodatkom masnih kiselina i elemi predstavljaju bolju barijeru vodene pare, u odnosu na želatin/triacetil film. Međutim, mehanička otpornost i prozirnost su smanjene dodatkom masti, dok je količina rastvorljivih materija povećana.

Priprema *kompozitnih filmova kombinovanjem kompatibilnih polisaharida i proteina*, u cilju poboljšanja osobina biopolimera, pruža mogućnost „popravke“ mehaničkih karakteristika filmova (Mariniello *i sar.*, 2003; Denavi *i sar.*, 2009; Ferreira *i sar.*, 2009; Jia *i sar.*, 2009; Su *i sar.*, 2010).

Kompozitni filmovi na bazi proteina i polisaharida najčešće podrazumevaju kombinaciju proteina sa pektinom (Liu *i sar.*, 2007; Piazza *i sar.*, 2009), skorбом (Jagannath *i sar.*, 2003; Al-Hassan *i sar.*, 2012), hitozanom (Di Pierro *i sar.*, 2007, 2011; Ferreira *i sar.*, 2009; Jia *i sar.*, 2009; Rivero *i sar.*, 2009; Abugoch *i sar.*, 2011) i celulozom (prirodna vlakna) (Yoo i Krochta, 2011). Dobijanje kompozitnih filmova na bazi proteina i polisaharida predstavljaju atraktivnu oblast istraživanja, zato što su konstituenti filma ekološki, zamenljivi, jeftini, a dobijeni filmovi imaju prihvatljive mehaničke osobine i biorazgradivost. Mastromatteo *i sar.* (2009) su pokazali pozitivan uticaj dodatka pšenične slame biorazgradivim filmovima na bazi pšeničnog glutena. Dodatak vlakana uticao je na smanjenje propustljivosti vodene pare i porast fleksibilnosti kompozitnog filma, u poređenju sa proteinskim. Dodatak celuloznih vlakana (CMC i acetat celuloze) biorazgradivom filmu na bazi natrijum kazeinata uticao je na povećanje TS i mutnoće filma i smanjenje EB (Pereda *i sar.*, 2011). CMC pozitivno utiče na osobine biorazgradivih filmova na bazi SPI, poboljšavajući mehaničke osobine i redukuje propustljivost vodene pare (Su *i sar.*, 2010). Kompozitni film na bazi quinoa proteina i hitozana pokazuje poboljšane mehaničke i barijerne karakteristike, u poređenju sa proteinskim filmom (Abugoch *i sar.*, 2011). U

prisustvu hitozana, proteini surutke pokazuju filmogena svojstva u kiseloj sredini i mogu naći primenu u pakovanju hrane (Ferreira *i sar.*, 2009). Primenu kompozitnog filma hitozan/proteini surutke, u cilju produženja održivosti sira Ricotta predložili su Di Pierro *i sar.* (2011). Kompozitni film uspešno je primenjen kao omotač za sir, u periodu od 30 dana. Efikasnost primene kompozitnih filmova u mnogome zavisi od uslova pripreme i od odnosa konstituenata filma. Odnos hitozana i gliadina iz pšenice, značajno utiče na osobine pripremanih kompozitnih filmova (Li *i sar.*, 2010). Ispitivanja barijernih i mehaničkih osobina kompozitnog filma konjak-glukomanan/hitozan/SPI ukazuju da su sastav filma i pH najvažniji faktori koji determinišu propustljivost vodene pare, TS i EB ispitanih filmova (Jia *i sar.*, 2009). Autori Di Pierro *i sar.* (2007) primenili su postupak umrežavanja TGazom u cilju dobijanja kompozitnog filma hitozan/proteini surutke sa poboljšanim osobinama. Dobijeni filmovi imaju veću TS i manji stepen bubrenja, u odnosu na filmove bez TGaze. Barijerene karakteristike prema vodenoj pari su takođe poboljšane.

Relativno nova grupa kompozitnih filmova poznata kao *nanokompoziti*, razvijena je dodatkom nanokomponenti u polimerne filmove. Nanokomponente su čestice čije je bar jedna dimenzija reda veličine nanometra (Gilmer *i sar.*, 2002). Tu spadaju nanogline, nanooksidi, celulozna nanovlakna, ultrafini titanijum dioksid, ugljenične nanotube itd. (Akbari *i sar.*, 2007; Zhao *i sar.*, 2008). Efikasnost primene nanočestica u dobijanju biorazgradivih filmova na bazi proteina surutke (Hedenqvist *i sar.*, 2006; Li *i sar.*, 2010), SPI (Dean i Yu, 2005; Rhim *i sar.*, 2005; Chen i Zhang, 2006; Yu *i sar.* 2007; Kumar *i sar.*, 2010) i želatina (Zheng *i sar.*, 2002; Kim *i sar.*, 2005; Martucci i Ruseckaite, 2007) dokumentovana je od strane mnogih autora.

Sa ekonomskog i ekološkog aspekta, posebno su interesantni *kompozitni filmovi dobijeni direktno iz pogače, sačme, brašna, slame – nuzproizvoda agroindustrije*. Na ovaj način se rešava problem odlaganja i deponovanja, konverzijom obnovljivih u korisne proizvode. (Denavi *i sar.*, 2009; Su *i sar.*, 2010).

Još 1997. Rayas i Hernández su proizveli biorazgradive filmove na bazi tri tipa pšeničnog brašna. Mariniello *i sar.* (2003) su upotrebili sojino brašno i jabučni pektin za dobijanje kompozitnog filma. Filmovi su pripremani sa i bez dodatka TGaze, a dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost primene filmova kao jestivog omotača za hranu i lekove. I pirinčano brašno je ispitano kao moguća sirovina za dobijanje biorazgradivih kompozitnih filmova (Rachtanapun i Tongdeesoontorn, 2010; Dias *i sar.*, 2010, 2011). Pitak i Rakshit (2011) su objavili rezultate ispitivanja mogućnosti dobijanja kompozitnih filmova na bazi brašna banane i hitozana. Dobijeni kompozitni filmovi primenjeni su za pravljenje kesica koje

moгу da štite šparglu, „baby“ kukuruz i kineski kupus od *S. aureus*, jer predstavljaju dobru barijernu i antimikrobnu zaštitu. Hendrix *i sar.* (2011) ukazuju na mogućnosti dobijanja novih biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi obezmašćene sačme semena slačice (*Sinapis alba*) sa potencijalnom primenom u pakovanju hrane.

Amarantha (*Amaranthus* spp.) je pseudocerealiја koja brzo raste i visoko je tolerantna na različite vremenske uslove i zemljište lošeg kvaliteta, pa je široko rasprostranjena u Južnoj i Centralnoj Americi, Africi, Indiji i Aziji (Tapia-Blácido *i sar.*, 2007). Sadrži veliki procenat skroba (62%), proteina (14-17%), masti (5-9%) i dijetetskih vlakana (9-46%) i predstavlja odličnu sirovinu za proizvodnju biorazgradivih kompozitnih filmova. Rezultati dobijeni u poslednjih nekoliko godina ukazuju na veliki potencijal brašna *Amarantha* u proizvodnji kompozitnih filmova (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005a, b, 2007, 2011; Colla *i sar.*, 2006; Elizondo *i sar.*, 2009). Evaluaciја postupka dobijanja novih filmova na bazi *Amarantha* podrazumevala je razvoj i karakterizaciју biorazgradivih filmova na bazi brašna *Amarantha* (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005a), praćenje uticaja temperature sušenja i relativne vlažnosti na mehaničke osobine filmova, plasticizirane glicerolom (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005b) i praćenje uticaja koncentracije glicerola, dodatka stearinske kiseline i brzine mešanja emulzije (Colla *i sar.*, 2006). Kako je brašno *Amarantha* složen sistem, u daljim istraživanjima Tapia-Blácido *i sar.* (2007) su ispitali uticaj skroba, proteina i lipida na fizičke i termičke karakteristike dobijenih filmova. Primenom SDS-gel hromatografije, DSC i SEM praćena i objašnjena je interakciја komponenti filma i značaj njihovog umrežavanja na osobine filma. Elizondo *i sar.* (2009) saopštili su mogućnost dobijanja kompozitnog filma na bazi brašna *Amarantha* i poli(vinil alkohola), čime su poboljšane karakteristike *Amarantha* filmova.

Zbog svog hemijskog sastava i široke rasprostranjenosti, uljana tikva golica (*Cucurbita pepo* L.), odnosno pogača zaostala nakon ceđenja ulja iz semena tikve predstavlja potencijalnu sirovinu za dobijanje biorazgradivih kompozitnih filmova.

Pogača uljane tikve (eng. Pumpkin Oil Cake - PuOC) predstavlja ostatak semenki, nakon ceđenja ulja. Pogača sadrži 8 – 12% ulja, 60 - 65% proteina i oko 6 – 8% vode. Pogača, za sada, nema primenu u humanoј ishrani, već se koristi kao stoćna hrana. Kao bogat izvor proteina, pogača se daljom preradom može upotrebiti kao osnova za razvoj novih proizvoda koji imaju visoka nutritivna i farmakološka svojstva tzv. biopreparati (Sunday i Isaac, 1999, Vaštag *i sar.*, 2010, 2011). Glavni proteini semena (i pogače) uljane tikve su u vodi rastvarljivi globulini (11S - kukurbitin), albumini (2S), glutelini i prolamini, u manjoj kolićini (Marccone *i sar.*, 1997).

Proteini i peptidi biljaka koji pripadaju porodici *Cucurbitacea* imaju metaboličku aktivnost, i pokazuju ribozom inaktivirajuću, antitumornu, anti-AIDS i antifungalnu aktivnost (Ng *i sar.*, 1992; Vassilious *i sar.*, 1998; Wang i Ng., 2003). Prema najnovijim istraživanjima, dokazana je i antioksidativna aktivnost ovih proteina (Nkosi *i sar.*, 2005; Nkosi *i sar.*, 2006). Pored ovih metaboličkih aktivnosti proteina, pogača sadrži strukturne i rezervne proteine koji mogu biti nosioci strukture biorazgradivih filmova (Marcone *i sar.*, 1997).

2.7 Primena proteinskih filmova

Zadatak biorazgradivih filmova i drugih biorazgradivih proizvoda je jednostavan: zamena postojećih sintetičkih, ne-biorazgradivih proizvoda, radi smanjenja količine otpada, smanjenja cene i valorizacije nusproizvoda agroindustrije. Ipak, biorazgradivi filmovi uglavnom nemaju za cilj da eliminišu upotrebu konvencijalnih sintetičkih polimera, nego da se primenjuju u kombinaciji, u cilju poboljšanja kvaliteta i produženja održivosti. Time se smanjuje upotreba sintetičkih polimera i količina otpada nakon njihove upotrebe, a iskorišćeni materijal se može razgraditi. Nakon uklanjanja spoljnog sloja, na bazi sintetičkog polimera, biorazgradivi film nastavlja da štiti proizvod. Njihov glavni cilj je poboljšanje kvaliteta i produženje održivosti upakovanog proizvoda, smanjenjem uticaja vlage, kiseonika, migracije itd, a povećanjem zaštite hrane od mikroba i oksidacije, održavanjem integriteta upakovanog proizvoda i poboljšanjem izgleda. Međutim, primena biorazgradivih filmova mora biti i isplativa, tj. troškovi materijala i procesa proizvodnje moraju opravdati upotrebu. Procena finansijske koristi od poboljšanja kvaliteta hrane i veka trajanja je teška, ali neophodna.

Svaka uspešna zamena konvencionalnih sintetičkih filmova biorazgradivim alternativama smanjuje upotrebu neobnovljivih resursa, redukujući otpad biološkim recikliranjem (npr. kompostiranjem), a povećava upotrebu obnovljivih sirovina. Razvoj biorazgradivih filmova za pakovanje i druge aplikacije je ubrzan zbog nepotpune reciklaže konvencionalnih sintetičkih polimera i velikog utroška energije.

Različiti vidovi primene filmova na bazi biopolimera već su realizovani, dok je veliki broj dodatnih aplikacija još u fazi ispitivanja. Biopolimeri dobijeni iz agroindustrijskih izvora postaju ključna alternativa konvencionalnim materijalima, a uspešno se primenjuju kao poljoprivredna oprema, oprema za automobile, pomorska infrastruktura, a primenu su našli i u civilnom inženjerstvu (Wool *i sar.*, 2000; Kumar *i sar.*, 2002). Biorazgradiva plastika našla je primenu u različitim naprednim tehnologijama, uključujući nanotehnologiju, tehnologiju

aktivnog pakovanja, procese ojačavanja prirodnih vlakana, imobilizaciju enzima, itd. (Chen i Tan, 2006; Jerez *i sar.* 2007). Upotreba biopolimera rešava problem otpada i zagađenja pa je, zbog povećane ekološke svesti, poslednjih decenija, sve veći interes za proizvodnjom biorazgradivih materijala (Denavi *i sar.*, 2009; Jia *i sar.*, 2009). Na ovaj način, a i zbog dostupnosti i niske cene, obnovljive sirovine i agroindustrijski otpad predstavljaju odličan izvor biorazgradivih polimera, rešavajući problem odlaganja otpada, konverzijom u korisne proizvode (Denavi *i sar.*, 2009; Su *i sar.*, 2010).

Najčešće, biorazgradivi filmovi imaju ulogu ambalažnog materijala, gde predstavljaju barijeru prema vodenoj pari, kiseoniku, aromi i/ili ulju, čime se poboljšava kvalitet i produžava vek trajanja upakovanog proizvoda. Biorazgradivi filmovi predstavljaju mehaničku zaštitu upakovane hrane ili leka, čime se održava kvalitet i integritet proizvoda. Sprečavanjem razmene vlage, kiseonika, mirisa ili ulja između proizvoda i okoline, kvalitet i rok trajanja proizvoda se takođe povećava. Zaštitna funkcija biorazgradivih filmova može biti poboljšana dodatkom enzima, antioksidanasa ili antimikrobnih agenasa (Tharanathan *i sar.*, 2003; Güçbilmez *i sar.*, 2007; Bourtoom, 2009; Gómez-Estaca *i sar.*, 2009).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Svi reagensi i hemikalije korišćeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke ili višeg stepena čistoće. Želatin (tip B, iz goveđe kože), hitozan (iz ljušture krabe, srednjeg viskoziteta), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikal, su proizvodi Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Luis MO, USA). Polietilen glikol, molekulske mase 300, 400, 600 i 1000, je proizvod MERCK-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). Enzimski preparat Transglutaminaze (Activa MP) pribavljen je od Ajinomoto Food Ingredients LLC, Japan. Mikrobna TGaza poreklom je producera plesni *Streptoverticillium morbaraense*, sa deklarisanom aktivnošću od 100 U/g.

PuOC pribavljena je od firme "Pan-Union", Novi Sad, Srbija i "Agrojapra", Donji Agič, Bosna i Hercegovina. Pogača je poreklom iz industrije ulja i nuzproizvod je ceđenja ulja iz semena uljane tikve, postupkom hladnog presovanja. PuOC čuvana je u frižideru (+4 °C) i samlevena pre upotrebe.

U Tabeli 4 i 5 prikazan je hemijski i aminokiselinski sastav PuOC.

Tabela 4. Osnovni hemijski sastav mlevene pogače

Sadržaj vlage i isparljivih materija (%)	2.38
Sadržaj ulja (%)	8.66
Sadržaj ukupnog pepela (%)	8.80
Sadržaj sirove celuloze (%)	4.50
Sadržaj ugljenih hidrata (%)	12.14
Sadržaj ukupnih proteina (%)	63.52
Sadržaj rastvorljivih proteina (%)	8.32
Indeks rastvorljivosti proteina	12.70

Pogača sadrži 8 – 12% ulja, 12.14% ugljenih hidrata i 60 - 65% proteina, od čega 8.32% rastvorljivih. Aminokiselinski sastav pogače ukazuje na povećan sadržaj arginina, fenilalanina i glutaminske kiseline.

Tabela 5. Aminokiselinski sastav pogače (g/100g uzorka)

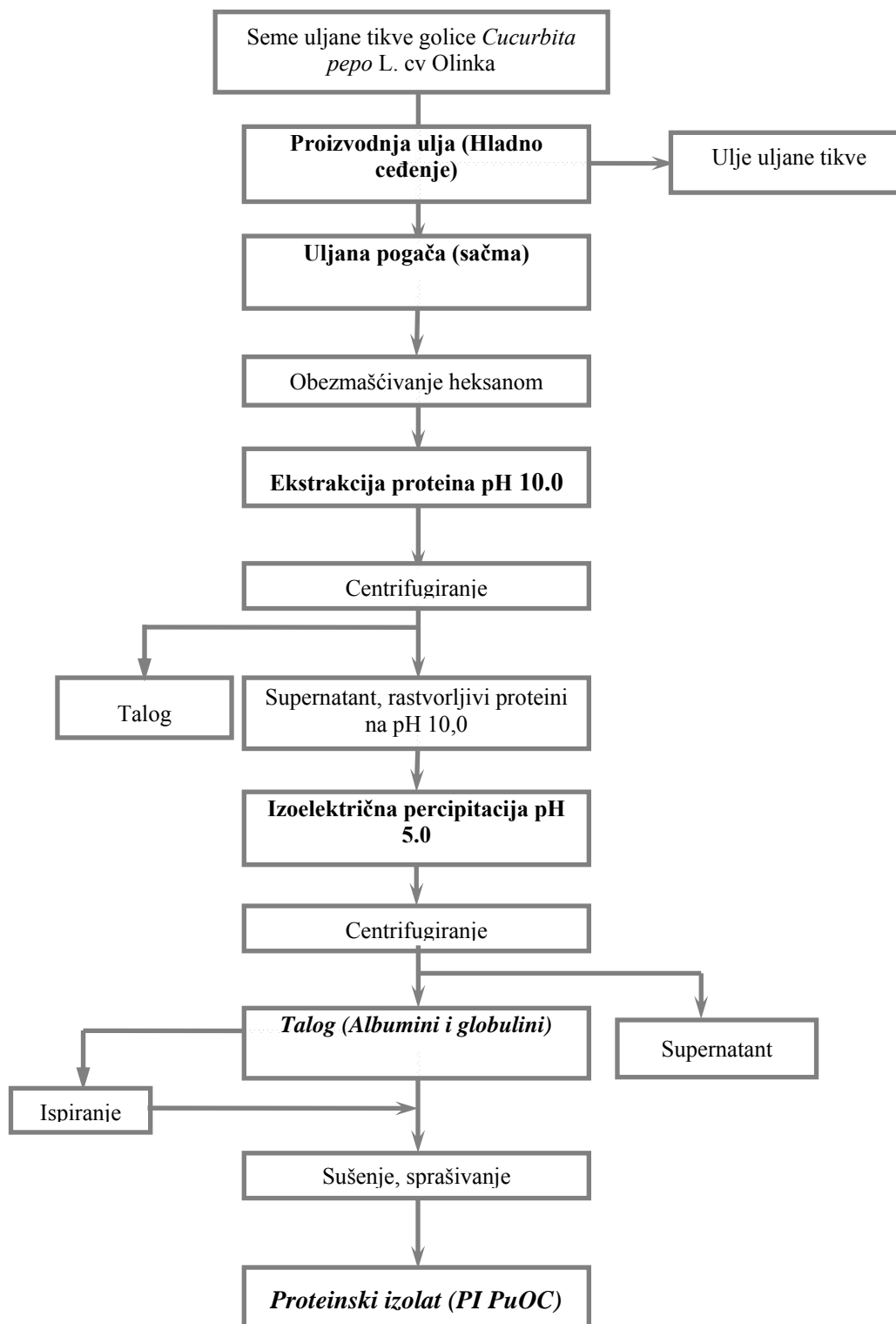
Arginin	10.13
Lizin*	2.20
Alanin	2.10
Treonin*	2.04
Glicin	2.06
Valin*	1.92
Serin	2.25
Izoleucin*	1.89
Leucin*	2.02
Metionin*	1.95
Fenilalanin*	6.52
Glutaminska kiselina	5.87

*esencijalne aminokiseline

3.2 Priprema proteinskog izolata uljane tikve

Proteinski izolat uljane tikve (PI PuOC) pripremljen je metodom opisanom prema Nkosi *i sar.* (2005) (*Slika 21*). Pogača je samlevena u aparatu za mlevenje kafe, do veličina čestica ispod 2 mm. Samlevena pogača je obezmašćena heksanom, u odnosu mase i zapremine 1:5, uz stalno mešanje na sobnoj temperaturi tokom 30 min, a zatim je heksan uklonjen filtracijom. Postupak obezmašćivanja je ponovljen dva puta. 20 g samlevene i obezmašćene pogače suspendovano je u 100 ml alkalne vode, u kojoj je pH podešen na 10.0 sa rastvorom NaOH. Suspenzija je mešana uz kontrolu pH 1 h, na sobnoj temperaturi i centrifugirana pri 10 000 obrt/min, tokom 10 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments). U sakupljenom supernatantu pH je podešen na 5.0 dodavanjem rastvora HCl. Nerastvorljivi deo dobijene suspenzije (nerastvorljivi proteini na pH 5.0) je odvojen centrifugiranjem pri 20 000 obrt/min, 20 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments). U cilju ispiranja taloga od neproteinskih komponenti, talog je resuspendovan u vodi (pH 5.0), a zatim je nerastvorljivi deo ponovo odvojen centrifugiranjem. Postupak ispiranja je ponovljen 2 puta. Nakon toga, sakupljeni talog je osušen na sobnoj temperaturi i usitnjen do praškastog oblika. PI PuOC čuvan je u frižideru (+4 °C) i stabilan je do nekoliko meseci.

Sadržaj proteina u PI PuOC, određen metodom po Kjeldahlu ($N \times 6.25$) iznosi $94.3 \pm 1\%$. Prinos PI PuOC prema opisanom postupku kreće se od 10 do 15% računato na polaznu količinu pogače.



Slika 21. Shematski prikaz pripreme PI pogače uljane tikve.

3.3 Priprema biorazgradivih filmova

Priprema kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve

Rastvor želatina (10%, w/v) pripreman je na sledeći način: želatin je hidriran 30 min, na sobnoj temperaturi, a zatim rastvoren na 50 °C (vodeno kupatilo), uz mehaničko mešanje, do potpunog rastvaranja (oko 20 min). U rastvor želatina dodat je glicerol u koncentraciji od 0.1, 0.15 ili 0.2 g/g želatina. Rastvor PuOC (10%, w/v) pripreman je rastvaranjem PuOC u destilovanoj vodi, uz konstantno podešavanje pH na 10.0, dodatkom rastvora NaOH. Glicerol, kao plasticizer, dodat je u koncentraciji 0.1, 0.15, odnosno 0.2 g/g PuOC, a dobijena smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 50 °C 20 min. Nakon termičkog tretmana, rastvor je profitriran kroz najlonski filter, a za dalju upotrebu korišćen je filtrat. Filmogeni rastvor za pripremu kompozitnog filma želatin/PuOC pripreman je mešanjem rastvora želatina i PuOC, u odnosu 6:4, 4:6, 2:8, 1.5:8.5, 1:9, i 0.5:9.5. Kao referentni, pripremljen je 100% želatinski film, iz 10% (w/v) želatinskog rastvora. Svi rastvori su izliveni u poliestarske Petri ploče i sušeni u sobnim uslovima (25 - 28 °C i ≈80-85% RH). Formirani filmovi su skinuti sa ploča i kondicionirani u eksikatoru, na 25 °C i 95% relativne vlage, najmanje 2 dana pre analiza.

Priprema kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Filmogeni rastvori (10%, w/v) primenjeni za formiranje biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi PuCO pripremani su rastvaranjem PuOC u destilovanoj vodi, uz podešavanje pH rastvora sa HCl (za pH=2.0 - 5.0) i NaOH (za pH=6.0 - 12.0). Pri ispitivanju uticaja plasticizera na mogućnost formiranja kompozitnog filma na bazi PuOC, PEG, molekulskih masa 300, 400, 600 i 1000, dodat je u koncentraciji 0.1, 0.2, 0.4 i 0.6, dok je pH filmogenog rastvora podešen na 10.0. Kod pripreme filmova sa glicerolom kao plasticizerom, njegov udeo je bio 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 i 0.4 g/g PuOC, a pH je bio podešen na pH=2.0 - 12.0. U oba slučaja, temperatura ekstrakcije rastvorljivih komponenti pogače bila je $t=50$ °C.

Pri praćenju simultanog efekta pH filmogenog rastvora i temperature ekstrakcije komponenti pogače na formiranje kompozitnog filma na bazi PuOC, skrining je urađen pri pH=2.0 - 12.0 i na temperaturi 50 i 90 °C, pri čemu je udeo glicerola bio 0.25 g/g PuOC. Pri ispitivanja karakteristika kompozitnih filmova na bazi PuOC, pH filmogenog rastvora je podešen na pH=9.0 - 12.0, a temperatura varirana u opsegu 50-90 °C.

Svi filmogeni rastvori kompozitnih filmova na bazi PuOC su, nakon razlivanja, sušeni 2 dana, pri sobnim uslovima ($T=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=85\%$), pri kojim su dobijeni filmovi i kondicionirani, minimum dva dana pre analiziranja.

Priprema biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

Filmogeni rastvori (10%, w/v) primenjeni za formiranje biorazgradivih filmova na bazi PI PuCO pripremani su rastvaranjem PI PuOC u destilovanoj vodi, uz podešavanje pH rastvora sa HCl (za $\text{pH}=2.0 - 5.0$) i NaOH (za $\text{pH}=6.0 - 12.0$). Glicerol je dodat u udelu od 0.3 do 0.6 g/g PI PuOC. Rastvor je inkubiran na temperaturi $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min, nakon čega je filtriran kroz najlonski filter, i dobijeni filtrat razliven u poliestarske Petri ploču. Nakon razlivanja, sušenje rastvora je trajalo 2 dana, pri sobnim uslovima ($t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=85\%$), dok su filmovi kondicionirani do analize minimum 2 dana, takođe, pri sobnim uslovima.

Priprema biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve, u prisustvu transglutaminaze

Rastvor PI PuOC (10% w/v), pripreman je rastvaranjem PI PuOC u destilovanoj vodi, uz podešavanje pH na 4.0 - 8.0. Udeo dodatog glicerola bio je 0.5 g/g PI PuOC, a TGaze 10, 25 i 40 U/g PI PuOC. Rastvor je inkubiran na temperaturi $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, delovanje enzima je stopirano nakon 5, 20, 40, 60 i 80 min, na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min (vodeno kupatilo), nakon čega pripremljena smeša razlivena u poliestarsku Petri ploču. Nakon razlivanja, sušenje rastvora je trajalo 2 dana, pri sobnim uslovima ($t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=85\%$), dok su filmovi kondicionirani do analize minimum 2 dana, takođe, pri sobnim uslovima.

Priprema kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan

Filmogeni rastvor PI PuOC (10%, w/w) pripreman je rastvaranjem PI PuOC u destilovanoj vodi, uz podešavanje pH na 4.0 – 7.0 i dodatak glicerola u udelu od 0.4 g/g PI PuOC. Filmogena smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min i ohlađena na sobnu temperaturu. Rastvor hitozana (1%, w/v) pripreman je rastvaranjem hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, uz mešenje, 24 h. Pripremljeni rastvori mešani su u odnosu 0:10, 2.5:7.5, 5:5 i 7.5:2.5 (PI PuOC:hitozan), a nakon mešanja pH je podešen na pH rastvora PI PuOC. Dobijena smeša zagrevana je u vodenom kupatilu na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, nakon čega je razlivena u poliestarske Petri ploče. Nakon razlivanja, sušenje rastvora je trajalo 2 dana, pri

sobnim uslovima ($t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=85\%$), dok su filmovi kondicionirani do analize minimum 2 dana, takođe, pri sobnim uslovima.

Priprema kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan, u prisustvu transglutaminaze

Filmogeni rastvor PI PuOC (10%, w/w) pripreman je rastvaranjem PI PuOC u destilovanoj vodi, uz podešavanje pH na 4.0 – 7.0 i dodatak glicerola u udelu od 0.4 g/g PI PuOC. Filmogena smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min i ohlađena na sobnu temperaturu. Rastvor hitozana (1%, w/v) pripreman je rastvaranjem hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, uz mešenje, 24 h.

Dva različita pristupa pripreme filmova su primenjena:

- (i) Filmogeni rastvori su mešani u odnosu 2.5:7.5 (PI PuOC:hitozan), a nakon mešanja pH je podešen na pH rastvora PI PuOC. Enzim TGaza je dodat u količini 25 U/g PI PuOC. Dobijena smeša zagrevana je u vodenom kupatilu na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, delovanje enzima je stopirano inkubiranjem u vodenom kupatilu na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, nakon čega je smeša filtrirana kroz najlonski filter, i dobijeni filtrat razliven u poliestarske Petri ploče.
- (ii) Rastvoru PI PuOC dodata je TGaza, u količini od 25 U/g PI PuOC, nakon čega je zagrevan u vodenom kupatilu na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min. Delovanje enzima je stopirano inkubiranjem u vodenom kupatilu na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, nakon čega je rastvor ohlađen na sobnu temperaturu i u njega je dodat rastvor hitozana. Podešen je pH smeše na pH rastvora PI PuOC, smeša je inkubirana 10 min na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom razlivena u poliestarske Petri ploče.

Nakon razlivanja, sušenje rastvora je trajalo 2 dana, pri sobnim uslovima ($t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=85\%$), dok su filmovi kondicionirani do analize minimum 2 dana, takođe, pri sobnim uslovima.

3.4 Ispitivanje fizičko-mehaničkih karakteristika biorazgradivih filmova

Određivanje debljine biorazgradivih filmova

Debljina filma merena je mikrometrom (type 30, Tesa, Switzerland), sa osetljivošću od 0.001 mm. Debljina uzorka merena je na deset pozicija, a rezultat je iskazan kao srednja vrednost merenja tri uzorka istog filma \pm standardna devijacija (SD).

Određivanje zatezne jačine i izduženja pri kidanju

Mehaničke osobine - TS i EB filmova mereni su na Instron Universal Testing Instrument Model No 4301 (Instron Engineering Corp., Canton, MA), prema ASTM standardnoj metodi D882-01 (ASTM, 2001). Uzorci filma sečeni su u pravougaone trake dužine 90 mm i širine 15 mm. Početni razmak između klem instrumenta podešen je na 50 mm, a brzina razdvajanja klem podešena je na 400 mm/min. Uzorci su pre merenja kondicionirani minimalno 2 dana, u eksikatoru na $t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH}=95\%$ (kompozitni filmovi želatin/PuOC) ili na sobnim uslovima (kompozitni filmovi na bazi PuOC i svi filmovi na bazi PI PuOC).

Vrednost TS (MPa) je računata kao odnos maksimalne sile koju film trpi, pre kidanja, i poprečnog preseka filma, na koji deluje sila. Vrednost EB je računata kao odnos dužine uzorka pre (50 mm) i posle delovana maksimalne sile, u trenutku kidanja uzorka. EB je data kao procenat izduženja (%) (ASTM D882-01, 2001). TS i EB su računate kao srednje vrednosti minimalno pet ponavljanja, sa svaku veličinu.

3.5 Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika biorazgradivih filmova

Određivanje sadržaja vlage

Uzorci filmova, dimenzija 1 x 2 cm, su izmereni na analitičkoj vagi (m_1), i sušeni na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h, nakon čega im je ponovo izmerena masa (m_2). Uzorci su, po potrebi, dodatno sušeni do konstantne mase. Sadržaj vlage (end. Water Content - WC) je određen kao procenat gubitka početne mase filma, nakon sušenja i izražen na masu vlažnog uzorka, prema jednačini (jednačina 7):

$$\text{WC (\%)} = 100 (m_1 - m_2) / m_1 \quad (7)$$

Sadržaj vlage izražen je kao srednja vrednost tri nezavisna merena, za svaki film (Rhim *i sar.*, 2002).

Određivanje sposobnosti bubrenja

Uzorcima filmova, dimenzija 1 x 2 cm, izmerena je masa (m_1) na analitičkoj vagi, a zatim su uronjeni u dejonizovanu vodu ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), u trajanju od 2 min. Vlažni uzorci su umotani

u filter papir da bi se uklonio višak vode, pa izmereni na analitičkoj vagi (m_2). Količina apsorbovane vode računata je prema jednačini (jednačina 8):

$$\text{Bubrenje (\%)} = 100 (m_2 - m_1) / m_1, \quad (8)$$

gde su m_2 i m_1 mase vlažnog i suvog uzorka (Bigi *i sar.*, 2004). Za svaki film, test bubrenja je ponovljen tri puta.

Određivanje ukupne rastvorljivosti i koncentracije rastvorljivih proteina

Uzorci filma, dimenzija 1 x 2 cm, izmereni su na analitičkoj vagi i stavljeni u kivete, u kojima je 5 ml destilovane vode. Kivete su zatvorene, blago mučkane, na sobnoj temperaturi, 24 h. Nakon toga, sadržaj je fugiran na 3000 rpm (Sorvall RC 5B Superspeed Centrifuge, Dupont, Newton, USA), 20 min. Dobijeni supernatant je odvojen i u njemu je određen sadržaj rastvorenih proteina, metodom po Lowry *i sar.* (1951), upotrebom albumina iz goveđeg seruma, kao standard za kvantifikaciju. Koncentracija rastvorljivih proteina (eng. Protein Solubility - % PS) je određena metodom po Gennadios *i sar.* (1998), a računata prema formuli (jednačina 9):

$$\%PS = \frac{\text{masa proteina u 5ml} \times 100}{\text{pocetna masa uzorka filma} \cdot \% \text{ proteina u filmu} \cdot \% \text{ suve materije u filmu}} \quad (9)$$

Preostali talog u kiveti je sušen na 90 °C, 24h, u cilju određivanja ukupne rastvorljivosti. Ukupna rastvorljivost filma (eng. Total Soluble Matter - % TSM) izražena je kao sadržaj preostale suve materije filma, nakon rastvaranja, i računata prema sledećoj jednačini (jednačina 10):

$$\%TSM = \frac{(\text{masa uzorka filma pre testiranja} - \text{masa uzorka filma posle testiranja}) \cdot 100}{\text{masa uzorka filma pre testiranja}} \quad (10)$$

Testovi za određivanje ukupne rastvorljivosti i koncentracije rastvorljivih proteina urađeni su u pet nezavisnih ponavljanja, a rezultat je dat kao srednja vrednost \pm SD.

Određivanje boje filma

Boja filmova određena je instrumentom Chroma meter (CR-400 Chroma Meter, Minolta Camera Co., Osaka, Japan). Uzorci filma stavljeni su na površinu bele standardne

ploče, a na displeju instrumenta očitane su vrednosti veličina L^* , a^* i b^* . Veličina L^* određuje stepen svetloće (0 = crno, 100 = belo), veličina a^* karakteriše zelenu i crvenu nijansu filma ($-a^*$ – zelena nijansa, $+a^*$ – crvena nijansa) a veličina b^* plavu i žutu nijansu ($-b^*$ – plava nijansa, $+b^*$ – žuta nijansa). Za svaki film, test određivanja boje je ponovljen pet puta.

3.6 Ispitivanje antioksidativnog potencijala biorazgradivih filmova

Određivanje antiradikalske aktivnosti prema DPPH•radikalima

Antiradikalska aktivnost rastvorenog dela biorazgradivog filma prema slobodnim DPPH• radikalima (DPPH• Radical Scavenging Activity) određena je spektrofotometrijskom metodom, merenjem promene koncentracije stabilnih DPPH• radikala, u prisustvu ispitivanih supstanci (rastvorljivih proteina biorazgradivog filma). Antiradikalska aktivnost rastvorljivog dela biorazgradivih filmova prema slobodnim DPPH• radikalima (AA_{DPPH}) određena je po modifikovanoj metodi Morales i Jimenez-Perez (2001).

Rastvor DPPH• radikala (74 mg/l) pripremljen je u etanolu. Alikvot rastvorljivih proteina (200 μ l) dodat je rastvoru DPPH• radikala (1 ml), tako da je početna koncentracija DPPH• radikala u testu 0.16 mmol/l. Reakciona smeša je inkubirana uz mešanje tokom 85 min, na sobnoj temperaturi. Paralelno sa svakim uzorkom, pripremljena je i slepa proba, gde je u rastvor DPPH• radikala dodat u destilovanu vodu čiji je pH isti kao pH na kome je pripreman film. Nakon inkubacije, smeše su centrifugirane (Eppendorf Mini spin plus, 14 500 rpm, 5 min) i apsorbancije očitane na $\lambda=520$ nm (T80/T80 + UV-Vis Spectro-photometer PG instruments LTD). Nula aparata je podešena sa etanolom. Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione prave standardnog rastvora DPPH• radikala očitana je koncentracija DPPH• radikala, a antiradikalska aktivnost hidrolizata - $AA(\%)$ izračunata prema jednačini 11:

$$AA(\%) = \frac{[DPPH]_{H_2O} - [DPPH]_t}{[DPPH]_{H_2O}} \times 100 \quad (11)$$

gde su $[DPPH]_{H_2O}$ - koncentracija DPPH• radikala u slepoj probi, a $[DPPH]_t$ - koncentracija DPPH• radikala u probi sa hidrolizatom. Za svaki film, test je ponovljen tri puta i rezultat je dat kao srednja vrednost \pm SD.

Određivanje antiradikalne aktivnosti prema ABTS^{•+} radikal katjonu

Antiradikalna aktivnost proteinskih hidrolizata prema ABTS^{•+} radikal katjonu određena je spektrofotometrijski, na osnovu obezbojavanja zeleno obojenog rastvora ABTS^{•+} radikal katjona u prisustvu rastvorljivih proteina iz biorazgradivih filmova, na $\lambda=734$ nm (engl. ABTS Decolorization Assay).

Antiradikalna aktivnost rastvorljivih proteina prema ABTS^{•+} radikal katjonu ($AA_{ABTS^{•+}}$) ispitana je metodom opisanom prema *Re i sar.* (1999). Osnovni rastvor ABTS^{•+} radikal katjona pripremljen je rastvaranjem ABTS-a u 0.1 mol/l fosfatnom puferu, pH 7,40, koji sadrži 5 mmol/l NaCl (PBS). ABTS je dodat u koncentraciji 7 mmol/l, a zatim je dodat kalijum-persulfat, kao inicijator produkcije ABTS^{•+} radikal katjona, u koncentraciji od 2.45 mmol/l. Rastvor je čuvan na zatamnjenom mestu tokom 12 do 24 h.

Radni rastvor ABTS^{•+} radikal katjona pripremljen je pred analizu, razblaživanjem osnovnog rastvora, sa PBS-om dok nije postignuta apsorbanca od 0.7 ± 0.02 na $\lambda=734$ nm. U 3 ml radnog rastvora ABTS^{•+} radikal katjona, dodato je po 30 μ l rastvora proteina filma (koncentracije proteina 0.5-4.0 mg/ml, određena metodom po *Lowry i sar.*, 1951). Obezbojavanje reakcione smeše praćeno je merenjem apsorpcije na $\lambda=734$ nm (T80/T80 + UV-Vis Spectrophotometer, PG instruments LTD) tokom 10 min. Paralelno sa svakom probom, praćeno je i obezbojavanje u slepoj probi, koja je pripremljena dodavanjem vode odgovarajućeg pH u radni rastvor ABTS^{•+} radikal katjona, umesto rastvorenog dela filma. Na osnovu apsorbanci u probi i slepoj probi nakon 10 min reakcije, antiradikalna aktivnost rastvorenog dela filma – ABTS (%) izračunata je prema sledećoj jednačini (jednačina 12):

$$ABTS(\%) = \frac{[ABTS]_{H_2O} - [ABTS]_t}{[ABTS]_{H_2O}} \times 100 \quad (12)$$

gde su $[ABTS]_{H_2O}$ – apsorbanca u slepoj probi, a $[ABTS]_t$ - apsorbanca u probi sa rastvorljivim proteinima iz filma ($t=10$ min). Kod svih uzoraka vrednost ABTS (%) ispitana je u funkciju različitih početnih koncentracija rastvorljivih proteina i izražena na mg proteina u rastvorljivom delu filma ili kao efektivnih koncentracija, EC50, odnosno potrebne koncentracije proteina iz rastvorenog dela filma za inhibiciju 50% aktivnosti ABTS. Za svaki film, test je ponovljen tri puta i rezultat je dat kao srednja vrednost \pm SD.

3.7 Ispitivanje barijernih svojstava biorazgradivih filmova

Određivanje propustljivosti gasova

Određivanje propustljivosti gasova (CO_2 , N_2 , O_2) izvedeno je prema proceduri Lyssy. Ova procedura predstavlja izostatičku gas-hromatografsku metodu (DIN 53380), upotrebom Lyssy GPM-200 aparata, gasnog hromatografa, proizvođača Gasukuro Kogyo GC-320 i HP 3396A integratora. Standardni Gow-Mac serije 5 52 gasni hromatograf, sa detektorom termičke provodljivosti, osnovni je instrument za kvantitativnu analizu. Gasni hromatograf, sa dvojnim sistemom kolona, sadrži kolonu Porapack QS (3 m) i kolonu sa molekulskim sitima (4.5 m), povezanih serijski, a odnos razdvajanja protoka gasova kroz kolone se može regulisati restrikcionim ventilom inkorporiranim ispred Porapack kolone, što omogućava razdvajanje svih poznatih gasova, posebno kiseonika i azota iz vazduha. Ispitivanja su vršena na 23°C i pri razlici pritisaka od 1 bar. Uzorci filma su fiksirani na nosač i stavljeni u komoru za ispitivanje. Propustljivost gasova određena je pri izostatskim uslovima, u komori, podeljenoj na dva dela uzorkom filma. Sa jedne strane filma, u komori, je čist helijum, a sa druge, smeša gasova kiseonik, azot, ugljen dioksid (1:1:1). Pritisak, sa obe strane filma je isti (0.2 bara). Tokom analize dolazi do postepenog zasićenja helijuma smešom gasova, u zavisnosti od propustljivosti filma. Koncentracija gasova u komori sa helijumom, detektovana je i određena gasnim hromatografom i integratorom. Površina pika na određenom retencionom vremenu, na dobijenom hromatogramu, predstavlja količinu propuštenog gasa iz smeše. Propustljivost vazduha računata je na osnovu sadržaja pojedinih gasova u vazduhu. Dobijeni rezultati izraženi su kao $\text{ml/m}^2/24\text{h}$ pri razlici pritisaka od 1 bar.

3.8 Ispitivanje strukturnih karakteristika biorazgradivih filmova

Određivanje strukture filmova FTIR spektrofotometrijom

FTIR analiza uzoraka filmova izvedena je u opsegu talasnih brojeva od 4000 do 600 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} , na IR spektrofotometru, Nicolet iS10, Thermo Scientific (Massachusetts, USA), na dodatku za atenuaciju totalne refleksije (ATR). Svaki uzorak skeniran je 32 puta, dok je slepa proba snimana pre analize svakog uzorka. IR spektrofotometrom se upravlja preko računara, opremljenog softverom Omnic.

Određivanje strukture filmova elektron skenirajućom mikroskopijom

SEM izvedena je na elektronskom mikroskopu JSM-6460LV (SEM, JEOL Ltd. Tokyo, Japan) na 20 kV. Uzorci filma fiksirani su na alumunijumskim nosačima, celofanskim trakama i prevučeni tankim slojem zlata, raspršenim po površini uzorka.

Određivanje strukture filmova diferencijalnom skening kalorimetrijom

Za ispitivanje toplotnih svojstava biorazgradivih filmova na bazi PuOC korišćena je DSC na uređaju Q20, TA Instruments. Protok gasa (azota) tokom ispitivanja je bio 50 cm³/min. Za ispitivanje karakterističnih prelaza kod biorazgradivih filmova vršeno je ispitivanje toplotnih svojstava u intervalu temperatura od 40 °C do 250 °C. Brzina zagrevanja je iznosila 10 °C/min. Masa ispitivanih uzoraka je bila oko 3 mg. Izvršena je standardna kalibracija konstante ćelije pomoću indijuma. Osetljivost instrumenta je 10 mV/cm. Biorazgradivi filmovi ne pokazuju oštre fazne prelaze, već se promena dešava u određenom temperaturnom intervalu.

3.9 Statistička obrada podataka

Za obradu eksperimentalnih podataka korišćeni su kompjuterski softverski programi Microsoft Excel 7, Origin 8 i STATISTICA 8 (StatSoft, 8). Svi rezultati u radu su prikazani kao srednja vrednost tri ili više nezavisnih merenja \pm SD, kao što naznačeno u svakoj metodi. Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti \pm SD testirana je primenom Studentovog *t*-testa, na nivou značajnosti od 5% ($p < 0.05$) korišćenjem STATISTICA 8 (StatSoft, 8).

Metoda odzivnih površina (eng. Response Surface Methodology – RSM) je primenjena za određivanje simultanog efekta pH i temperature na zateznu jačinu i izduženje pri kidanju biorazgradivih filmova na bazi PuOC. Faktorski plan 3² (eng. full factorial design) je primenjen, a minimalna i maksimalna vrednost nezavisnih promenljivih, odabrane su na osnovu rezultata skrining testa. Eksperimentalni dizajn i vrednosti zavisno promenljivih dati su u Tabeli 6.

Tabela 6. Faktorski plan sa eksperimentalnim vrednostima TS i EB biorazgradivih filmova na bazi PuOC

Br. probe	Kodirane vrednosti nezavisno promenljivih		pH	t (°C)	TS (MPa)	EB (%)
1	-1	-1	10	70	13.8	13.31
2	0	-1	11	70	15.08	14.32
3	1	-1	12	70	29.58	18.86
4	-1	0	10	80	20.43	7.90
5	0	0	11	80	35.49	6.89
6	0	0	11	80	35.91	7.02
7	1	0	12	80	52.57	30.61
8	-1	1	10	90	20.73	4.32
9	0	1	11	90	47.19	20.42
10	1	1	12	90	68.08	32.62

Značaj linearnog, kvadratnog i interaktivnog člana svake nezavisno promenljive veličine dobijene kvadratne jednačine drugog reda je utvrđen. Utvrđena je regresiona analiza dobijenih rezultata. Dobijena jednačina drugog reda (Jednačina 13) je fitovana, za svaku ispitanu zavisno promenljivu:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1^2 + b_4 X_2^2 + b_5 X_1 X_2, \quad (13)$$

Gde Y predstavlja zavisno promenljivu varijablu (TS i EB), b_0 nezavisni član jednačine, b_1 regresioni koeficijenti uz linearni član promenljive X_1 , b_2 regresioni koeficijenti uz linearni član promenljive X_2 , b_3 regresioni koeficijenti uz kvadratni član X_1^2 , b_4 regresioni koeficijenti uz kvadratni član X_2^2 , i b_5 regresioni koeficijenti uz interaktivne članove dve nezavisno promenljive, X_1 i X_2 .

a X_1 i X_2 su kodirani oblici nezavisno promenljivih varijabli pH i t, redom.

Za kodiranje nezavisno promenljivih veličina (parametara procesa) korišćena je opšta jednačina (14):

$$X = \frac{x - [x_{\max} - x_{\min}] / 2}{[x_{\max} + x_{\min}] / 2} \quad (14)$$

gde su: X - kodirana vrednost promenljive (u opsegu od -1 do 1), x – realna vrednost odabrane promenljive, a x_{max} i x_{min} realne maksimalne, odnosno minimalne vrednosti promenljivih, u odabranom opsegu za ispitivanje.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanje površina odziva je urađeno u okviru softverskog paketa STATISTICA 8 (StatSoft, 8).

4. Rezultati i diskusija

Planirana istraživanja u sklopu ove teze obuhvataju nekoliko zadataka: (i) Procenu mogućnosti primene PuOC i PI PuOC, dobijenog iz pogače, za dobijanje biorazgradivih filmova; (ii) Definisane uslova produkcije (temperatura, pH itd.) i sastava filmova (količina PuOC, količina i vrsta plasticizera); (iii) Ocenu fizičko-hemijskih osobina (TS, EB, rastvorljivost, antioksidantna aktivnost u vidu hvatanja DPPH[•] i ABTS^{•+} radikal katjona); strukturnih - SEM, FTIR i DSC metodama i barijernih svojstava dobijenih filmova - propustljivost gasova (gasnom hromatografijom); (iv) Inkorporaciju biološki aktivnih komponenti (hitozan) i enzimsku modifikaciju proteina (TGazom) u cilju proširenja opsega uslova dobijanja i poboljšanja kvaliteta filmova.

Rezultati dobijeni tokom ovih istraživanja su podeljeni u sledeće celine:

- Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma želatin/PuOC
- Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma na bazi PuOC
- Dobijanje i karakterizacija biorazgradivog filma na bazi PI PuOC i njegova modifikacija produkcijom kompozitnog filma PI PuOC/hitozan i umrežavanjem TGazom

4.1 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova na bazi proteina

4.1.1 Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma želatin/pogača uljane tikve

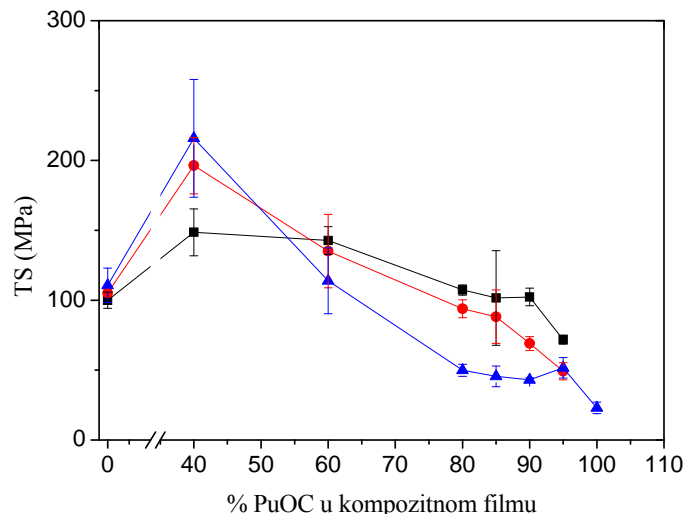
U ovoj fazi rada ispitana je mogućnost dobijanja biorazgradivog kompozitnog filma želatin/PuOC. U cilju dobijanja novog biorazgradivog filma, i poboljšanja karakteristika želatinskog filma, želatin, poznati filmogeni polimer, je postepeno zamenjivan sa PuOC. Nužno, urađena je karakterizacija dobijenih filmova, ispitivanje fizičko-hemijskih i barijernih osobina formiranih kompozitnih filmova. Ispitan je uticaj odnosa želatina i PuOC (10:0; 6:4; 4:6; 2:8; 1.5:8.5; 1:9 i 0.5:9.5), i koncentracija plasticizera - glicerola (0.1; 0.15; 0.2 g glicerola/g biopolimera) na osobine dobijenih filmova.

Fizičko - mehaničke osobine kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve

Dobijeni kompozitni filmovi su mutni, blago obojeni žuto-zelenom bojom, čvrsti ali dovoljno fleksibilni da se sa njima može lako rukovati, za razliku od želatinskog filma koji je providan, čvrst i manje fleksibilan. Debljina filmova je: $143 \pm 30 \mu\text{m}$, za filmove sa 0.1 g glicerola/g biopolimera, $140 \pm 26 \mu\text{m}$ za filmove sa 0.15 g glicerola/g biopolimera, i $127 \pm 5 \mu\text{m}$ za filmove sa 0.2 g glicerola/g biopolimera. Dobijeni filmovi imaju znatno veće

vrednosti debljine u poređenju sa filmovima želatin/SPI ($\approx 48 \mu\text{m}$) (Denavi *i sar.*, 2009). Povećane vrednosti debljine mogu biti posledica upotrebe želatina različitog tipa, upotrebe cele PuOC, za razliku od SPI, kao i razlike u uslovima pripreme filma, odnosno uslovima ekstrakcije filmogenih molekula.

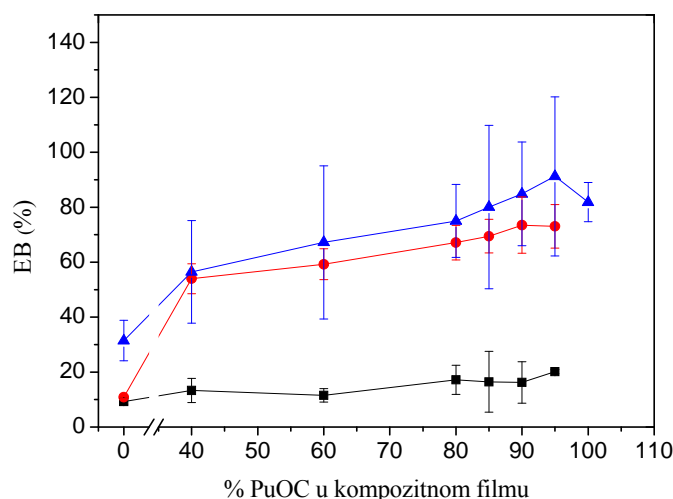
Uticaj količine PuOC u kompozitnom filmu i koncentracije glicerola na mehaničke osobine filmova želatin/PuOC prikazan je na *Slici 22*. Rezultati pokazuju da procenat PuOC u filmu i količina dodatog glicerola utiču na TS i EB. Pri udelu PuOC u filmu od 40%, TS raste sa 100 MPa, koliko iznosi za film od 100% želatina, na 200 MPa. Daljim povećanjem udela PuOC u filmu, dolazi do sukcesivnog smanjenja TS, do količine dodate pogače od 80%. Nakon toga nema značajnog smanjenja TS ($p > 0.05$). Kompozitni film želatin/PuOC ima veće vrednosti TS (pod datim eksperimentalnim uslovima), u poređenju sa biorazgradivim filmovima na bazi proteina sočiva, soje, proteina surutke i graška (Kunte *i sar.*, 1997; Perez-Gago *i sar.*, 1999; Choi i Han, 2001; Bamdad *i sar.*, 2006). U svojim istraživanjima, Bamdad *i sar.* (2006) su poredili TS nekoliko proteinskih biorazgradivih filmova. Vrednosti TS filmova na bazi sočiva, soje, surutke i graška se kreću u opsegu od 4 do 9 MPa, dok su TS filmova želatin/ PuOC 50 - 200 MPa.



Slika 22. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na TS kompozitnog filma; -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

Dodatak plasticizera biorazgradivim filmovima ima zadatak da redukuje intermolekularne sile i poveća mobilnost biopolimernih lanaca. Prisustvo plasticizera je neophodno radi prevazilaženja krutosti filma, povećanja fleksibilnosti i prevencije od pucanja tokom primene i transporta (Barreto *i sar.*, 2003). Promena u količini dodatog glicerola, kao

plasticizera, uticala je na TS dobijenih filmova. Tako filmovi sa 0.1 g glicerola/g biopolimera imaju najmanju, a filmovi sa 0.2 g glicerola/g biopolimera najveću vrednost TS, pri istoj količini PuOC u filmu. Trend promene TS sa promenom količine PuOC ostao je isti, bez obzira na koncentraciju glicerola. Suprotno, EB kompozitnih filmova želatin/PuOC povećavalo se sa povećanjem količine PuOC u filmu, ali najmanji porast je uočen pri koncentraciji glicerola od 0.1 g/g biopolimera (*Slika 23*). Filmovi sa najmanjom dodatkom količinom glicerola su bili kruti i rukovanje njima je bilo otežano. Sa porastom koncentracije glicerola u filmu, filmovi su postali homogeniji i jednostavniji za manipulisanje. U poređenju sa 100% želatinskim filmom (EB do 35%), dobijenim pod istim eksperimentalnim uslovima, kompozitni filmovi imaju znatno veće vrednosti EB (do 95%), kada je količina dodatog glicerola 0.15 i 0.2 g/g biopolimera. Sa porastom udela PuOC u kompozitnom filmu, EB filmova sa 0.1 g glicerola/g biopolimera se povećao sa 9.26%, koliko je EB želatinskog filma, na 20.12%, kod filma sa 95% PuOC.



Slika 23. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na EB kompozitnog filma; -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

U poređenju sa proteinskim filmovima sočiva, soje, surutke i graška (Kunte *i sar.*, 1997; Perez-Gago *i sar.*, 1999; Choi i Han, 2001; Bamdad *i sar.*, 2006), kompozitni filmovi na bazi želatina i PuOC, sa 0.15 i 0.2 g glicerola/g biopolimera, imaju slične vrednosti EB. Samo kompozitni filmovi želatin/PuOC sa 0.1 g glicerola/g biopolimera pokazuju manje EB, što može biti posledica nedovoljne količine plasticizera.

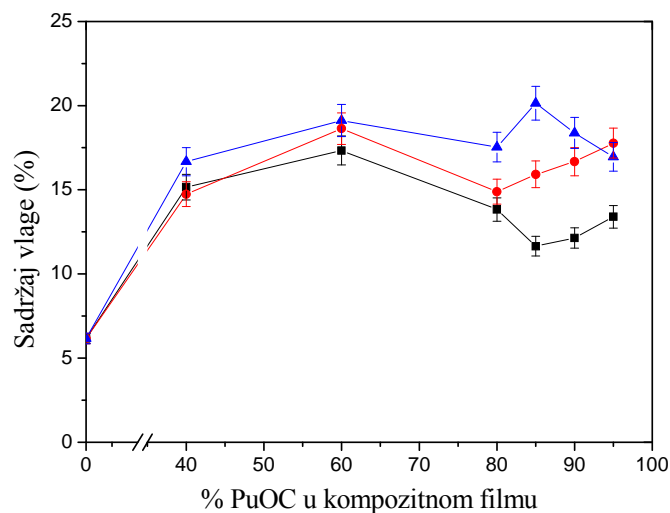
Suprotno rezultatima dobijenim za kompozitne filmove želatin/PuOC, sa porastom količine SPI, u kompozitnom filmu želatin/SPI, došlo je do smanjenja vrednosti i TS i EB

(Cao *i sar.*, 2007). Ovu pojavu autori objašnjavaju boljom protein/protein interakcijom u želatinskom filmu, koja je definisana vodoničnim vezama ili elektrostatičkom interakcijom i/ili hidrofobnom prirodom molekula. Vlknasta tercijarna struktura molekula želatina formira trostruki heliks, umreženu kvarternatnu strukturu, koja omogućava veću TS ali i veće izduženje do trenutka kidanja, dok je SPI kompleksna mešavina molekula proteina različitih karakteristika, čije umrežavanje ne obezbeđuje mehaničke osobine, kao kod želatinskog filma. Iako veći deo PuOC čine globularni proteini slični onima u SPI (Cho i Rhee, 2004), rezultati ukazuju na različito ponašanje kompozitnih filmova želatin/SPI i želatin/PuOC. Razlike verovatno potiču iz činjenice da nije korišćen PI PuOC nego cela pogača, pa je prisustvo drugih molekula iz pogače uticalo na poboljšanje karakteristika kompozitnih filmova, povećanjem udela PuOC. Poređenjem mehaničkih osobina kompozitnog filma želatin/PuOC sa osobinama konvencionalnih polimernih filmova, TS biorazgradivog želatin/PuOC filma (do 200 MPa) je znatno veća od vrednosti TS sintetičkih poliolefinskih filmova (3 - 10 MPa) (Briston, 1988). Kompozitni film želatin/PuOC ima veće vrednosti EB od celofana (EB=20%), kada je količina glicerola u kompozitnom filmu 0.15 i 0.2 g/g biopolimera. Ipak, procenat EB za filmove sa PuOC je značajno manji od vrednosti EB komercijalnih sintetičkih polimernih filmova, LDPE (EB=500%) i HDPE (EB≈300%) (Pol *i sar.*, 2002). Uzimajući u obzir ove rezultate, kompozitni filmovi na bazi PuOC imaju mehaničke karakteristike prihvatljive za potencijalnu primenu kao ambalažni materijal.

Sadržaj vlage kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve

Slika 24. pokazuje uticaj količine PuOC u kompozitnom filmu želatin/PuOC i koncentracije glicerola na sadržaj vlage dobijenog filma. U poređenju sa 100% želatinskim filmom, pripremanim i kondicioniranim pod istim eksperimentalnim uslovima, kompozitni filmovi imaju manji sadržaj vlage, pri sve tri primenjene koncentracije glicerola. Koncentracija glicerola je uticala na sadržaj vlage kompozitnih filmova i to tako da sa porastom g glicerola/g biopolimera, sadržaj vlage raste. Ovo se može objasniti činjenicom da sa povećanjem količine plasticizera u filmu, film absorbuje veću količinu vode, zbog hidrofilnosti molekula plasticizera (Cho i Rhee, 2002). Isti fenomen - porast količine vlage sa porastom koncentracije glicerola uočen je i kod kompozitnih filmova želatin/SPI (Cao *i sar.*, 2007). U svojim istraživanjima, Cao *i sar.* (2007) su pratili uticaj količine dodatog glicerola na osobine kompozitnog filma želatin/SPI, i zaključili da je optimalna koncentracija glicerola, 0.1 - 0.2 g/g biopolimera. Pri sve tri ispitane koncentracije glicerola filmovi imali sadržaj

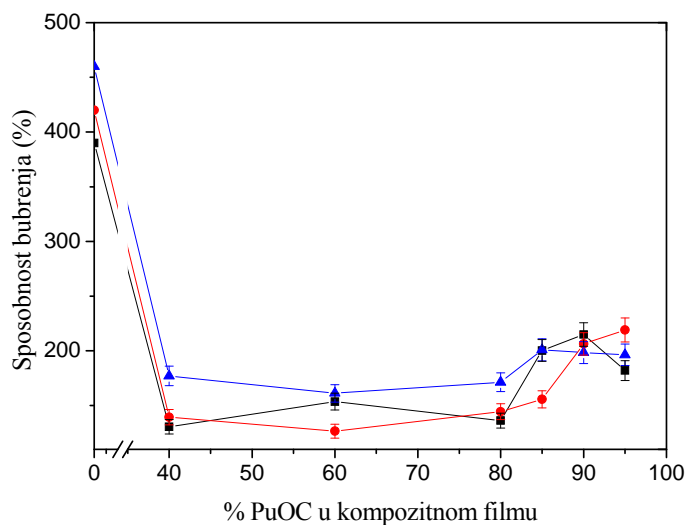
vlage od 10 do 20%, ali su filmovi sa 0.1 g glicerola/g PuOC imali najmanji, a filmovi sa 0.2 g glicerola/g PuOC najveći procenat vlage. Vrednosti sadržaja vlage kompozitnih filmova želatin/PuOC su reda veličine vrednosti kompozitnih filmova želatin/SPI (Cao *i sar.*, 2007).



Slika 24. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na sadržaj vlage kompozitnog filma; ■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, ●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, ▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

Sposobnost bubrenja kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve

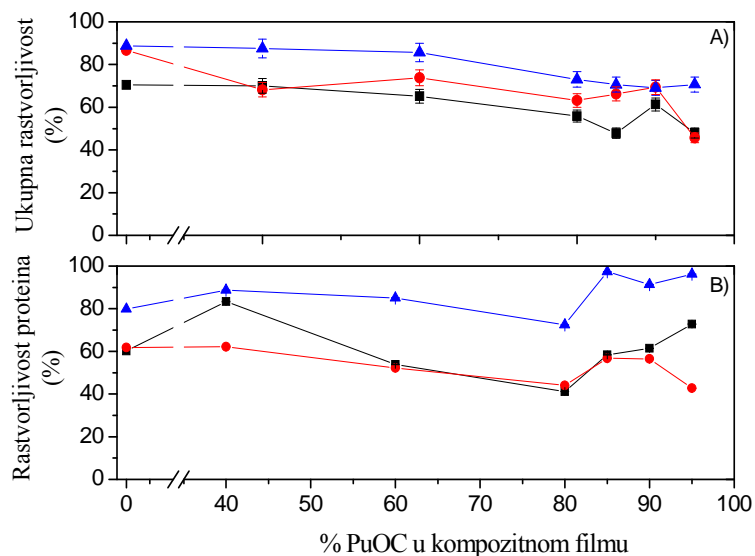
Uticaj udela PuOC u kompozitnom filmu želatin/PuOC i udela glicerola na sposobnost bubrenja filma prikazana na *Slici 25*. Sa porastom količine PuOC u filmu, stepen bubrenja filma raste, a kada je udeo PuOC u filmu veći od 85%, filmovi imaju sposobnost bubrenja veću i od želatinskog filma, dobijenog pod istim eksperimentalnim uslovima. Premda, želatin ima bolju sposobnost bubrenja od SPI i kompozitnih filmova želatin/SPI (Cao *i sar.*, 2007), još jednom treba istaći da je u ovoj fazi istraživanja primenjivana cela pogača, a ne PI PuOC. Samim tim, moguće je zaključiti da novi kompozitni filmovi imaju bolju sposobnost bubrenja od želatinskog filma, verovatno zbog prisustva i drugih molekula PuOC. Koncentracija glicerola u filmu nije značajno uticala ($p > 0.05$) na sposobnost bubrenja kompozitnih filmova.



Slika 25. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na sposobnost bubrenja kompozitnog filma; -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

Ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve i koncentracija rastvorljivih proteina

Ukupna rastvorljivost kompozitnog filma želatin/PuOC i koncentracija rastvorljivih proteina prikazana je na *Slici 26*. Rastvorljivost filma raste sa porastom koncentracije glicerola, ali opada sa porastom udela PuOC u filmu. U poređenju sa drugim biorazgradivim filmovima (na bazi proteina sočiva, soje, surutke i graška), čija je rastvorljivost 30 - 40%, film želatin/PuOC ima značajno veću rastvorljivost (Kunte *i sar.*, 1997; Perez-Gago *i sar.*, 1999; Cho i Han, 2001; Bamdad *i sar.*, 2007). Rastvorljivost kompozitnih filmova želatin/PuOC se kreće od 45.70% do 88.83%, u zavisnosti od količine dodatog glicerola i udela PuOC u filmu. Bolja rastvorljivost se može prepisati slabijim intramolekularnim silama u kompozitnom filmu želatin/PuOC, zbog prisustva neproteinskih komponenti. Relativno velika rastvorljivost u vodi, može potencijalno omogućiti filmu primenu za dobijanje posudica razgradivih u toploj vodi, slične onima na bazi etra celuloze, koje su već komercijalno dostupne (Kunte *i sar.*, 1997).



Slika 26. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na ukupnu rastvorljivost (A) i koncentraciju rastvorljivih proteina (B) kompozitnog filma; -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

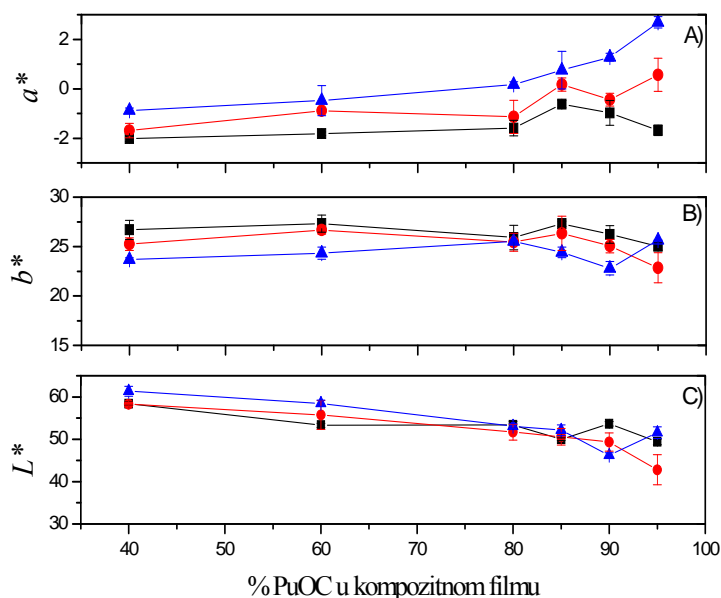
Slično ukupnoj rastvorljivost kompozitnog filma, sa porastom koncentracije glicerola raste i koncentracija rastvorljivih proteina. Pri povećavanju udela PuOC u filmu do 80% dolazi do blagog smanjenja koncentracije rastvorljivih proteina. Kada je procenat PuOC u filmu iznad 80%, dolazi i do značajnog povećanja koncentracije rastvorljivih proteina, tako da je rastvorljivost proteina filma sa 95% PuOC veća nego kod želatinskog filma, sa istom koncentracijom glicerola.

Boja kompozitnih filmova želatin/pogača uljane tikve

Dobijeni kompozitni filmovi su glatki i prozirni, blago žuto-zelene boje. Vrednost veličine L^* , koja karakteriše svetloću filma (0=crno, 100=belo), se kreće od 40 do 60, a vrednost a^* ($-a^*$ – zelena nijansa, $+a^*$ – crvena nijansa) od -2 do 2, i b^* ($-b^*$ – plava nijansa, $+b^*$ – žuta nijansa) od 22 do 27. U zavisnosti od količine PuOC i glicerola u filmu (Slika 27), vrednost a^* raste. Film sa 40% PuOC ima najintenzivniju nijansu zelene boje ($-a^*$). Sa porastom udela PuOC u filmu, povećava se udeo crvene boje u boji filma ($+a^*$). Pojava zelene i crvene boje u kompozitnom filmu želatin/PuOC, može se objasniti ekstrakcijom pigmenta iz pogače. Pri promeni količine PuOC, isti trend promene veličine a^* je uočen, bez obzira na količinu glicerola. Takođe, pri istoj količini PuOC u filmu, sa porastom koncentracije plasticizera došlo je do porasta vrednosti veličine a^* . Suprotno tome, vrednost

veliĉine b^* se smanjila sa porastom koncentracije glicerola, dok sa promenom koliĉine PuOC nije došlo do znaĉajne promene b^* vrednosti. Sa *Slike 27.* se moŹe videti da vrednost veliĉine L^* opada sa porastom udela PuOC u filmu. Filmovi sa veĉim procentom PuOC postaju tamniji. Koliĉina dodatog glicerola nije znaĉajno uticala ($p>0.05$) na vrednost veliĉine L^* .

U poređenju sa biorazgradivim filmovima na bazi proteina soĉiva (Bamdad *i sar.*, 2006) i graška (Jangchud i Chinnann, 1999), filmovi Źelatin/PuOC imaju veĉe vrednosti veliĉine L^* (svetliji su). Suprotno tome, vrednost L^* za kompozitni film Źelatin/PuOC je manja, u poređenju sa filmovima na bazi SPI (Rhim *i sar.*, 1998). Kompozitni filmovi Źelatin/PuOC imaju vrednosti veliĉine a^* (od -2 do +2), sliĉno filmovima na bazi proteina soĉiva, graška i SPI (6.98, 0.98 i -2.11) (Rhim *i sar.*, 1998; Jangchud i Chinnann, 1999; Bamdad *i sar.*, 2006).

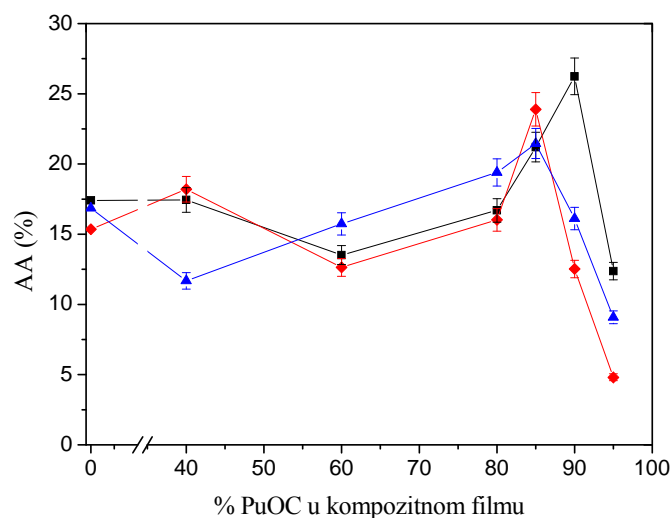


Slika 27. Uticaj koliĉine PuOC i udela glicerola na boju kompozitnog filma; a^* -veliĉina (A), b^* -veliĉina (B), L^* -veliĉina (C); -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

Antioksidantna aktivnost kompozitnih filmova Źelatin/pogaĉa uljane tikve

Neki proteini i peptidi poseduju antioksidantne osobine, pa i biorazgradivi filmovi na bazi proteina mogu imati antioksidantni potencijal (Giménez *i sar.*, 2009; Wang *i sar.*, 2009). Kako antioksidantna aktivnost potiče od peptida i proteina malih molekulskih masa, koji su uglavnom rastvorljivi, u ovoj fazi odreĉena je antioksidantna aktivnost rastvorenog dela kompozitnih filmova na bazi PuOC.

Slika 28. pokazuje antioksidantnu aktivnost (hvatanje DPPH[•] slobodnih radikala) kompozitnih filmova želatin/PuOC, pri tri različite koncentracije glicerola. Kako se sa Slike 28. može videti, količina dodatog glicerola ne utiče značajno na antioksidantnu aktivnost filmova, ali količina PuOC u filmu ima značajan uticaj ($p \leq 0.05$). Sa porastom količine PuOC u filmu, raste i antioksidantna aktivnost filma. Maksimalnu aktivnost imaju filmovi sa 85 - 90% PuOC. U poređenju sa želatinskim filmom, dobijenim pri istim eksperimentalnim uslovima, čija je antioksidantna aktivnost 17%, kompozitni filmovi sa 85-90% PuOC, imaju DPPH[•] aktivnost do 25%.



Slika 28. Uticaj količine PuOC i udela glicerola na antioksidantnu aktivnost (hvatanje DPPH[•] slobodnih radikala) kompozitnog filma; -■- 0.1 g glicerola/g biopolimera, -●- 0.15 g glicerola/g biopolimera, -▲- 0.2 g glicerola/g biopolimera

U ovoj fazi ispitivanja dobijeni su kompozitni filmovi na bazi želatina i PuOC. U poređenju sa karakteristikama želatinskih filmova, dobijenih pod istim eksperimentalnim uslovima, novi kompozitni filmovi imaju poboljšane osobine. Rezultati pokazuju da dobijeni kompozitni filmovi na bazi želatina i PuOC imaju slične ili bolje karakteristike u poređenju sa biorazgradivim filmovima na bazi proteina sočiva, graška i soje.

4.1.2 Dobijanje i karakterizacija kompozitnog filma na bazi pogače uljane tikve golice

Istraživanja prikazana u prethodnom poglavlju pokazala su mogućnost dobijanja kompozitnog filma na bazi želatina, poznatog filmogenog polimera i PuOC – potencijalne sirovine za produkciju biorazgradivih filmova. U cilju dobijanja novog biorazgradivog filma,

ekonomski i ekološki isplativog, sa dobrim fizičko-mehaničkim, hemijskim i barijernim karakteristikama, pripremani su filmovi na bazi PuOC.

Ova faza rada fokusirana je na ispitivanje uticaja procesnih parametara (vrsta i količina plasticizera, pH i temperatura) na mogućnost formiranja novih kompozitnih filmova na bazi PuOC i na osobine dobijenih filmova.

4.1.2.1 Izbor plasticizera – uticaj vrste i koncentracije plasticizera na dobijanje biorazgradivog filma na bazi pogače uljane tikve

U ovom delu istraživanja sagledan je uticaj različitih vrsta plasticizera i njihove koncentracije na mogućnost dobijanja biorazgradivih filmova na bazi PuOC i ispitane su osobine dobijenih filmova. Najčešće primenjivani plasticizeri za dobijanje biodegradabilnih filmova su polioli (polipropilen glikol (Jagannath *i sar.*, 2006), glicerol (Myllärinen *i sar.*, 2002), sorbitol (Cerqueira *i sar.*, 2009), PEG (Bourtoom *i sar.*, 2006), oligosaharidi – saharoza (Veiga-Santos *i sar.*, 2007) i voda. U cilju dobijanja novog biodegradabilnog filma na bazi PuOC, ispitana je mogućnost primene polietilen glikola, molekulske masa 300, 400, 600 i 1000, koncentracije 0.1, 0.2, 0.4 i 0.6 i glicerola, koncentracije 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 i 0.4.

Uticaj PEG-a na formiranje i osobine biorazgradivog filma na bazi pogače uljane tikve

Ispitivanje dobijanja biorazgradivih filmova na bazi PuOC uz prisustvo PEG-a, različitih molekulske masa i koncentracija pokazalo je nemogućnost formiranja homogenih i fleksibilnih filmova. Naime, filmovi sa 0.1 g PEG, svih ispitanih molekulske masa bili su kruti i raspadali su se pri odvajanju sa Petri ploče. Pri povećanju koncentracije PEG-a na 0.2, 0.4 i 0.6 g/g PuOC, filmovi su i dalje bili kruti, pri čemu je dodatno došlo do izdvajanja PEG-a na površini filma, usled nekompatibilnosti plasticizera i ekstrahovanih molekula u rastvoru. Tabela 7. pokazuje rezultate dobijene pri pokušaju pravljenja biorazgradivih filmova na bazi PuOC, u prisustvu PEG-a, kao plasticizera.

Tabela 7. Uticaj udela i molekulske mase PEG-a na dobijanje biorazgradivih filmova na bazi PuOC

Molekulska masa PEG-a	Udeo PEG-a (g/g PuOC)			
	0.1	0.2	0.4	0.6
300	krt	krt i nehomogen	krt i nehomogen	krt i nehomogen
400	krt	krt i nehomogen	krt i nehomogen	krt i nehomogen
600	krt	krt i nehomogen	krt i nehomogen	krt i nehomogen
1000	krt	krt i nehomogen	krt i nehomogen	krt i nehomogen

Kako PEG nije pogodan plasticizer za dobijanje filmova od PuOC, a glicerol se pokazao kao efikasan pri dobijanju kompozitnih filmova želatin/PuOC, ispitana je mogućnost dobijanja filmova na bazi PuOC uz prisustvo glicerola, kao plasticizera.

Uticaj glicerola na formiranje i osobine biorazgradivog filma na bazi pogače uljane tikve

Dobijanje biorazgradivih filmova od PuOC praćeno je pri različitim pH i različitim koncentracijama glicerola. Tabela 8. pokazuje dobijene rezultate mogućnosti formiranja PuOC kompozitnih filmova. Filmovi se nisu formirali pri pH=2.0 - 5.0, bez obzira na količinu dodatog glicerola. Pri pH=2.0 - 5.0 rastvor PuOC je ostao tečan, dok je pri pH=6.0 i 7.0 došlo do umrežavanja ali su filmovi ostali vlažni, a pri tom ispucali, pri svim ispitanim koncentracijama glicerola.

Tabela 8. Uticaj udela glicerola i pH na formiranje kompozitnog filma na bazi PuOC

pH	Udeo glicerola (g/g PuOC)			
	0.15	0.2	0.25	0.3
2.0	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno
3.0	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno
4.0	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno
5.0	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno	ostalo tečno
6.0	vlažan a raspada se	vlažan a raspada se	vlažan a raspada se	vlažan
7.0	vlažan a raspada se	vlažan a raspada se	vlažan a raspada se	vlažan
8.0	krt	dobro formiran film	lepljiv, nakon odvaja se slepljuje	lepljiv i vlažan
9.0	krt	dobro formiran film	dobro formiran film	lepljiv
10.0	krt	dobro formiran film	dobro formiran film	lepljiv
11.0	krt	dobro formiran film	dobro formiran film	lepljiv
12.0	krt	dobro formiran film	dobro formiran film	lepljiv

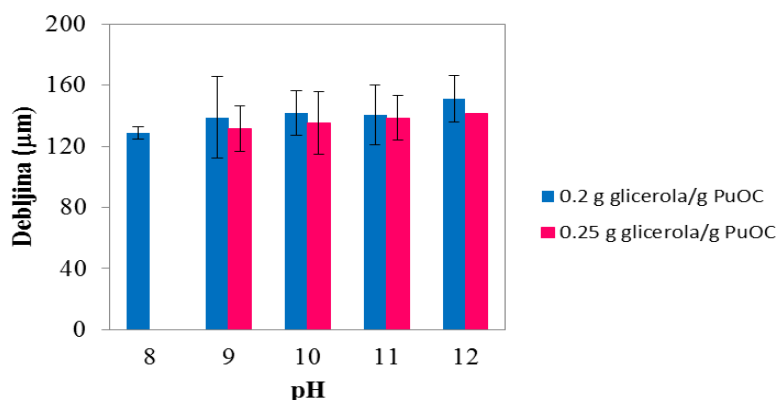
Fizičko - mehaničke osobine kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Rezultati prikazani u Tabeli 8. pokazuju da se filmovi mogu dobiti pri koncentraciji glicerola od 0.2 i 0.25 g/g PuOC - u opsegu pH=8.0 - 12.0 za 0.2 g glicerola/g PuOC i pH=9.0 - 12.0 za 0.25 g glicerola/g PuOC. Dobijeni kompozitni filmovi su mutni, obojeni žuto-zelenom bojom (intenzivnije nego kompozitnih filmovi želatin/PuOC) (*Slika 29*), fleksibilni i izdržljivi za rukovanje.



Slika 29. Kompozitni film na bazi PuOC, 0.2 g glicerola/g PuOC

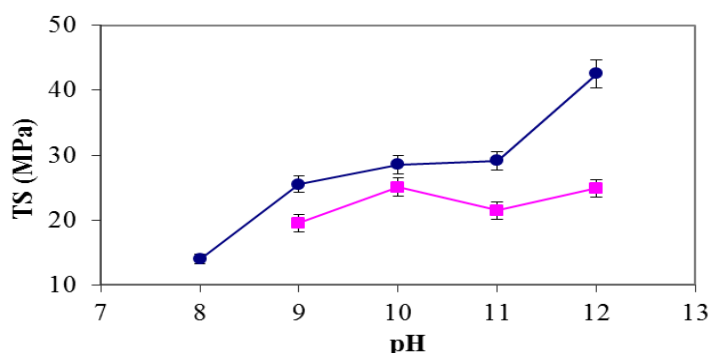
Debljina filmova prikazana je na *Slici 30*. i može se zapaziti da sa porastom pH raste i debljina. Porast debljine sa porastom pH može se objasniti boljom ekstrakcijom komponenti pogače pri višim vrednostima pH, time većim brojem molekula koji učestvuju u formiranju matriksa filma. Dobijeni filmovi imaju debljinu $\approx 140 \pm 15 \mu\text{m}$, u zavisnosti od količine dodatog glicerola i pH filma.



Slika 30. Uticaj pH i udela glicerola na debljinu kompozitnog filma

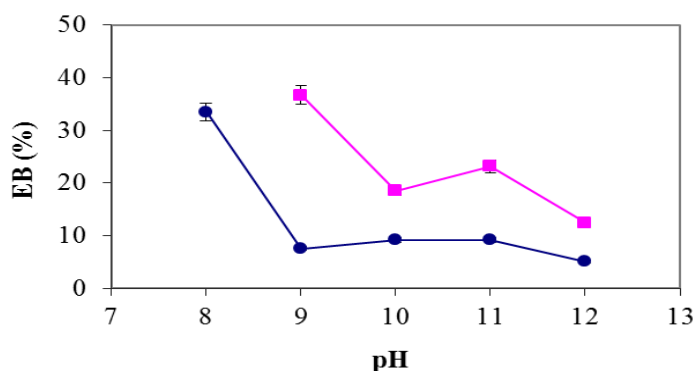
Ispitane mehaničke osobine kompozitnih filmova na bazi PuOC prikazane su na *Slici 31*. i *32*. Slično rezultatima dobijenim za kompozitne filmove želatin/PuOC, sa porastom

količine glicerola, vrednost TS raste, dok EB opada. TS je u funkciji pH, i sa porastom vrednosti pH raste i TS (Slika 31). U poređenju sa vrednostima TS za kompozitne filmove želatin/PuOC, sa 0.2 g glicerola/g PuOC i sa >80% PuOC, filmovi na bazi PuOC imaju 2 - 5 manje vrednosti TS. Sa druge strane, kompozitni film na bazi PuOC ima veće vrednosti TS u poređenju sa filmovima na bazi brašna *Amarantha* (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005b). Kada je udeo dodatog glicerola 0.25 g/g pogače, tj brašna, a pH pripreme filma pH=9.0 - 11.0 filmovi na bazi PuOC imaju zateznu jačinu 20 - 25 MPa, dok filmovi na bazi brašna *Amarantha* imaju TS 0.6-1.6 MPa.



Slika 31. Uticaj pH i udela glicerola na TS kompozitnog filma; -●- 0.2 g glicerola/g PuOC, -■- 0.25 g glicerola/g PuOC

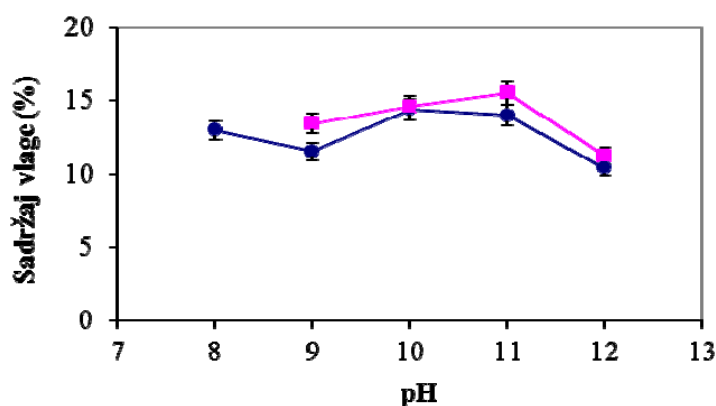
EB opada sa porastom pH (Slika 32), i kreće se u intervalu od 5 do 38%. U poređenju sa vrednostima EB za filmove želatin/PuOC, manje je za 2 - 5 puta. Prema literaturnim podacima, kompozitni filmovi na bazi brašna *Amarantha*, pripremani na pH=10.5 i 11.5, sa 0.25 g glicerola/g brašna, imaju vrednosti EB=60.4 - 107.4% (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005), što je i do 5 puta veće izduženje, u poređenju sa vrednostima EB kompozitnih filmova na bazi PuOC.



Slika 32. Uticaj pH i udela glicerola na EB kompozitnog filma; -●- 0.2 g glicerola/g PuOC, -■- 0.25 g glicerola/g PuOC

Sadržaj vlage kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Svi filmovi dobijeni na bazi PuOC imaju sadržaj vlage oko $13 \pm 2\%$, bez značajnog uticaja količine glicerola ($p > 0.05$) (Slika 33). Ipak, filmovi sa 0.25 g glicerola/g PuOC imaju nešto veći sadržaj vlage, što se može objasniti hidrofilnošću molekula glicerola i većom absorpcijom vlage (Cho i Rhee, 2002). U poređenju sa sadržajem vlage kompozitnih filmova na bazi brašna *Amarantha*, pripremanih na pH=10.7 i sa 22.5 g glicerola/g biopolimera, koji imaju sadržaj vlage od 7.97% (Tapia-Blácido *i sar.*, 2007), filmovi na bazi PuOC imaju veći sadržaj vlage, što je najverovatnije posledica razlike u sastavu i hidrofilnosti ekstrahovanih biopolimera.



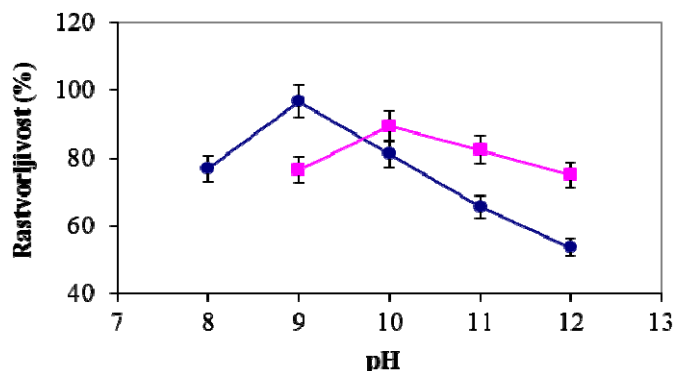
Slika 33. Uticaj pH i udela glicerola na sadržaj vlage kompozitnog filma; -●- 0.2 g glicerola/g PuOC, -■- 0.25 g glicerola/g PuOC

Bubrenje, ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve i koncentracija rastvorljivih proteina

Biorazgradivi filmovi na bazi PuOC imaju sposobnost bubrenja ali, za razliku od kompozitnih filmova želatin/PuOC, dolazi do njihovog raspadanja i rastvaranja prilikom manipulacije tokom testa.

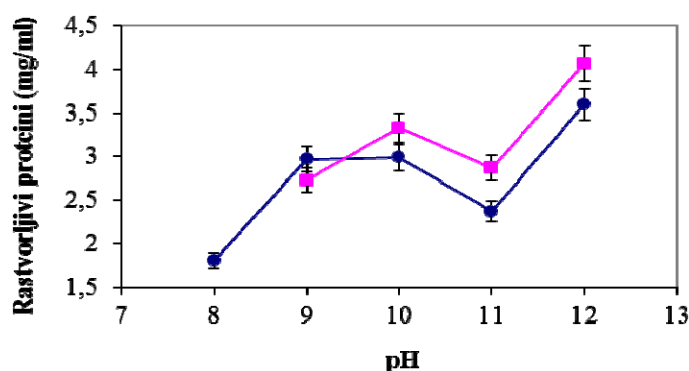
Rastvorljivost kompozitnih filmova od PuOC ispitana je rastvaranjem filmova u destilovanoj vodi i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 34. Filmovi sa 0.25 g glicerola/g PuOC pokazuju bolju rastvorljivost od filmova sa 0.2 g glicerola/g PuOC, pri svim ispitanim vrednostima pH, sem pri pH=9.0. Bolja rastvorljivost filmova sa većom količinom plasticizera je očekivana, uzimajući u obzir činjenicu da su molekuli plasticizera hidrofilni, da vezuju molekule vode, na taj način čineći slabim inter- i intramolekularne veze u matriksu, time promovišući rastvorljivost filma. Ista zapažanja mogu se uočiti i kod kompozitnih

filмова na bazi brašna *Amarantha* (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005b), gde sa porastom količine glicerola sa 0.25 na 0.3 g/g biopolimera, rastvorljivost raste sa $47 \pm 5\%$ na $55 \pm 3\%$.



Slika 34. Uticaj pH i udela glicerola na rastvorljivost kompozitnog filma; -●- 0.2 g glicerola/g PuOC, -■- 0.25 g glicerola/g PuOC

Koncentracija rastvorljivih proteina određena je spektrofotometrijski, iz vodenog rastvora filma. Zavisnost koncentracije rastvorljivih proteina od pH pokazuje obrnut trend od zavisnosti ukupne rastvorljivosti filma od pH (Slika 35). Sa porastom pH raste i koncentracija rastvorljivih proteina, sem pri pH=11.0, kad dolazi do smanjenja. Uočena razlika zavisnosti ukupne rastvorljivosti i koncentracije rastvorljivih proteina od pH, može se objasniti činjenicom da se tokom rastvaranja filma, u vodi rastvaraju i neproteinske komponente. Sa porastom vrednosti pH smanjuje se rastvorljivost neproteinskih komponenti pa se smanjuje i ukupna rastvorljivost. Suprotno, sa porastom pH, raste rastvorljivost proteina pa ukupna rastvorljivost i rastvorljivost proteinske frakcije ne pokazuju isti trend.



Slika 35. Uticaj pH i udela glicerola na koncentraciju rastvorljivih proteina kompozitnog filma; -●- 0.2 g glicerola/g PuOC, -■- 0.25 g glicerola/g PuOC

Uticaj količine dodatog plasticizera na koncentraciju rastvorljivih proteina prikazana je na Slici 35. Primećuje se porast rastvorljivosti proteina sa porastom koncentracije glicerola.

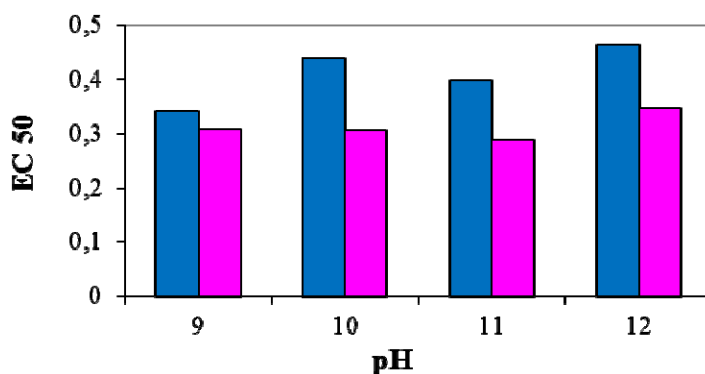
Povećanje količine plasticizera u filmu utiče na smanjenje broja veza koje se formiraju između molekula proteina, olakšavajući njihovo rastvaranje u vodenom okruženju (Lieberman i Gilbert, 1973; Gennadios, 2002; Cao *i sar.*, 2009).

Antioksidantna aktivnost kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Kao što je prikazano, kompozitni filmovi želatin/PuOC poseduju antioksidantni potencijal, a takođe je poznato da su proteini PuOC nosioci inhibitorne aktivnosti na ACE, imunološke regulatorne aktivnosti i antioksidantne aktivnosti (Vaštag *i sar.*, 2010, 2011), pa je ispitana antioksidantna aktivnost kompozitnih filmova na bazi PuOC.

Zbog nemogućnosti primene DPPH[•] testa u ekstremno baznim uslovima (pH=11.0 i 12.0), antioksidantna aktivnost je ispitana hvatanjem ABTS^{•+} radikal katjona. Antioksidantna aktivnost ukazuje na sposobnost supstance da se ponaša kao elektron donor ili donor vodonikovog atoma u slobodno radikalnoj reakciji (Prior *i sar.*, 2005). Hvatanje slobodnih radikala određeno je testom obezbojavanja rastvora ABTS^{•+} radikal katjona a rezultati su izraženi kao EC50. Parametar EC50 ima široku primenu u izražavanju antioksidantne aktivnosti (Myers, 2004; Pruneda *i sar.*, 2008).

Slika 36. pokazuje da svi dobijeni filmovi pokazuju antioksidantnu aktivnost – sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikal katjona. Primećuje se da se sa povećanjem pH povećava EC50, tj. smanjuje sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikal katjona pri koncentraciji plasticizera od 0.2 g glicerola/g PuOC, dok pH nema značajan uticaj ($p > 0.05$) na antioksidantnu aktivnost, pri količini glicerola od 0.25 g/g PuOC. Najveću antioksidantnu aktivnost (EC50=0.287) ima filma pripreman na pH=11.0 i sa 0.25 g glicerola/g PuOC.



Slika 36. Uticaj pH i udela glicerola na antioksidantnu aktivnost kompozitnog filma; ■ 0.2 g glicerola/g PuOC, ■ 0.25 g glicerola/g PuOC

4.1.2.2 Ispitivanje uticaja procesnih parametara (temperatura i pH) na dobijanje i karakteristike biorazgradivog filma na bazi pogače uljane tikve

Na dobijanje biorazgradivih filmova, pored količine filmogenog polimera i plasticizera, utiču i procesni parametri, odnosno uslovi neophodni za umrežavanje i dobijanje željenih karakteristika filma. U prethodnom poglavlju ispitan je uticaj vrste i količine plasticizera na formiranje i osobine formiranih filmova. Takođe je praćen i uticaj pH filmogenog rastvora, kao bitan faktor sredine, koji utiče na rastvaranje i ekstrakciju komponenti PuOC, koje će kasnije formirati film. Rezultati su pokazali značajan uticaj količine glicerola i pH rastvora, na mogućnost formiranja filma ali i osobine nastalih filmova. Temperatura ekstrahovanja filmogenih komponenti pogače, takođe, predstavlja važan faktor za dobijanje filmova i njihove karakteristike. U cilju poboljšanja karakteristika biorazgradivih filmova na bazi PuOC, kao i proširenja opsega uslova njihovog dobijanja, u ovoj fazi istraživanja praćen je simultani uticaj pH i temperature pripreme filma.

Skrining mogućnosti formiranja filmova pri različitim pH urađen je variranjem pH vrednosti od 2.0 do 12.0, dok je temperatura bila podešena na 50 odnosno 90 °C, pri čemu je koncentracije glicerola bila 0.25 g/g PuOC, izabrana na osnovu rezultata iz prethodne faze.

Rezultati prikazani u Tabeli 9. pokazuju da PuOC nema filmogena svojstva u opsegu pH=2.0 - 9.0, pri obe ispitane temperature. Kako je očekivano, filmovi se nisu formirali na pH=4.0 - 6.0, jer je IET PuOC proteina pH=5.0. Filmovi se nisu formirali pri pH=2.0 i 3.0, što se nije očekivalo s obzirom na brojne podatke o formiranju biorazgradivih filmova u kiseloj sredini (Mauri i Añón, 2006; Jia *i sar.*, 2009). Takođe, filmovi nisu formirani ni pri pH=8.0, iako postoje podaci o biorazgradivim filmovima na bazi proteina pri tom pH (Mauri i Añón, 2006). Kako je u ovoj fazi ispitivanja, za dobijanje biorazgradivih filmova, korišćena cela PuOC, a ne samo PI PuOC, pored proteina iz pogače su ekstrahovani i drugi molekuli, čija prisustvo je verovatno onemogućilo zadovoljavajuće umrežavanje proteina međusobno, ali i sa drugim molekulima, a samim time i mogućnost formiranja filma.

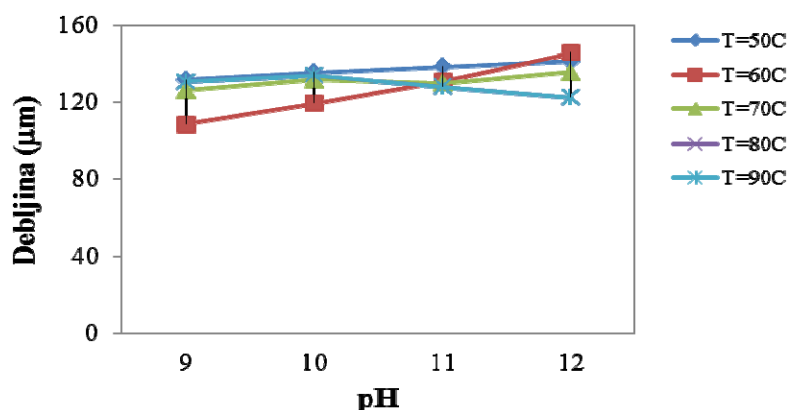
Tabela 9. Uticaj temperature i pH na formiranje kompozitnog filma na bazi PuOC

pH	Temperatura	
	50 °C	90 °C
2.0	Voda isparila, ostala lepljiva masa	Voda isparila, ostala lepljiva masa
3.0	Voda isparila, ostala lepljiva masa	Voda isparila, ostala lepljiva masa
7.0	Voda isparila, ostala lepljiva masa	Voda isparila, ostala lepljiva masa
8.0	Voda isparila, ostala lepljiva masa	Vlažan i mekan, raspada se pri vađenju
9.0	Formiran film	Formiran film
10.0	Formiran film	Formiran film
11.0	Formiran film	Formiran film
12.0	Formiran film	Formiran film

Formiranje filmova u opsegu pH=9.0 - 12.0, pri temperaturama 50 i 90 °C, odredilo je dalji opseg pH pri kome je praćen uticaj temperature na osobine biorazgradivih filmova na bazi PuOC. Simultani uticaj pH i temperature praćen je pri pH=9.0 - 12.0 i T=50 - 90 °C.

Fizičko – mehaničke osobine kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Dobijeni filmovi na bazi PuOC imaju ujednačenu debljinu koja iznosi $130 \pm 20 \mu\text{m}$. Sa *Slike 37.* se može videti blagi porast debljine filmova sa porastom pH, dok temperatura ekstrakovanja nije pokazala značajan uticaj ($p > 0.05$). Veće vrednosti debljine filmova sa porastom pH se mogu objasniti boljom ekstrakcijom molekula iz PuOC, pri ekstremnijim pH, što je zapaženo povećanjem gustine filmogenih rastvora, povećanjem pH.

**Slika 37.** Uticaj pH i temperature na debljinu kompozitnog filma na bazi PuOC

Optimizacija mehaničkih karakteristika kompozitnih filmova na bazi PuOC; primena RSM

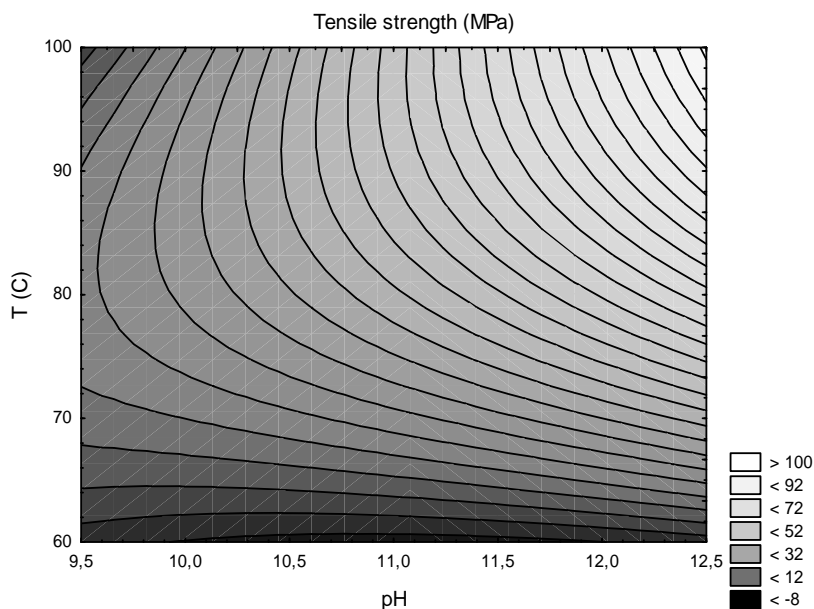
Simultani uticaj pH i temperature na mehaničke osobine (TS i EB) kompozitnih filmova na bazi PuOC obrađen je i analiziran statističkom metodom RSM. Na taj način dobijena je matematička zavisnost mehaničkih osobina od pH i temperature, a takođe su dobijeni optimalni uslovi za dobijanje filma sa najboljim osobinama.

Jednačine zavisnosti između TS i EB i nezavisno promenljivih pH i t prikazane su u Tabeli 10. Analiza regresionih koeficijenata modela i varijansi nezavisnih promenljivih (pH i T) kao linearna, kvadratna i interaktivna komponenta svake promenljive, data je u Tabeli 6.

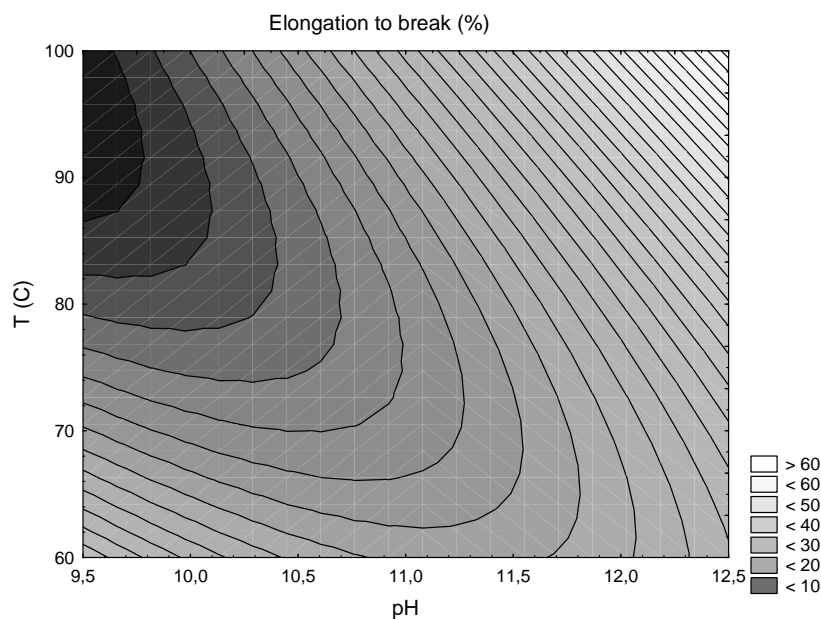
Tabela 10. Derivativna jednačina dobijena upotrebom RSM za predviđanje zavisnosti TS i EB, kompozitnih filmova na bazi PuOC, od pH i t; Y_1 je TS, Y_2 je EB, X_1 je pH, X_2 je t

Zavisna varijabla	Jednačina	Br. Jednačine
TS	$Y_1 = 35.0889 + 15.8783X_1 + 12.9233X_2 + 1.6117X_1^2 + 7.8925X_1X_2 - 3.7533X_2^2$	1
EB	$Y_2 = 12.4267 + 9.4267X_1 + 1.8117X_2 + 4.06X_1^2 + 5.6875X_1X_2 + 2.175X_2^2$	2

Konturni dijagrami zavisnosti TS i EB od pH i t prikazani su na *Slici 38* i *39*.

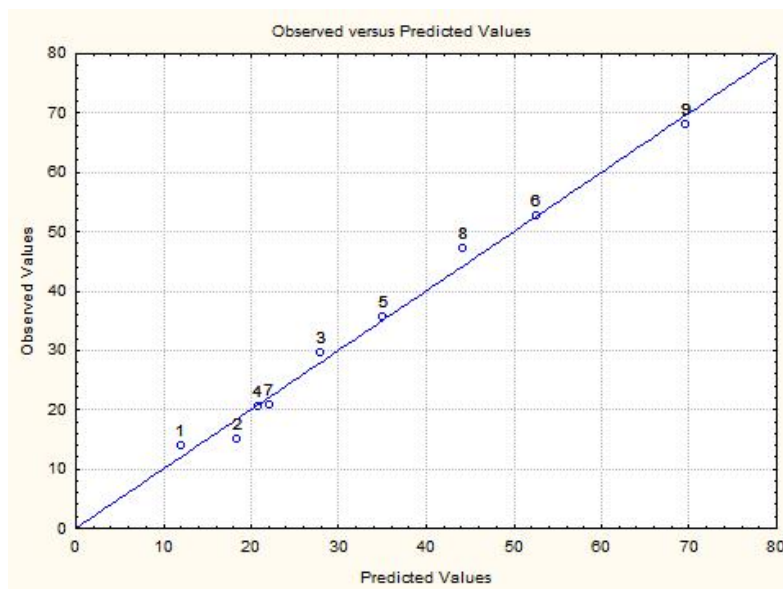


Slika 38. Konturni dijagram zavisnosti TS kompozitnih filmova na bazi PuOC od pH i temperature



Slika 39. Konturni dijagram zavisnosti EB kompozitnih filmova na bazi PuOC od pH i temperature

Na TS značajno utiču ($p < 0.05$) i pH i temperatura. Na *Slici 40.* prikazana je zavisnost predviđenih i dobijenih vrednosti TS kompozitnih filmova na bazi PuOC. Sa *Slike 40.* se može uočiti da dobijeni rezultati odgovaraju predviđenim vrednosti.



Slika 40. Zavisnost predviđenih i dobijenih vrednosti TS kompozitnih filmova na bazi PuOC – Pareto chart

Fitovanje jednačine drugog reda (Tabela 10, jednačina 1), pokazuje da pH i temperaturna komponenta prvog reda, kao interaktivna komponenta imaju značajan efekat na TS PuOC filmova (Tabela 11).

Tabela 11. Analiza varijansi nezavisnih varijabli (pH i t) kao linearna, kvadratna i interaktivna komponenta svake promenljive i njihov uticaj na mehaničke osobine kompozitnih filmova na bazi PuOC

Parametar	TS	EB
b ₀	35.09***	12.43*
b ₁	15.88***	9.43**
b ₂	12.92***	1.81
b ₃	1.61	4.06
b ₄	-3.75	2.17
b ₅	7.89**	5.69
F	217.35	18.88
p	0.00048	0.01757
R ²	98.940	89.530

*Significant at $\alpha=0.1$, **Significant at $\alpha=0.05$, ***Significant at $\alpha=0.01$

Porast temperature značajno povećava TS. Suprotno ovim rezultatima, porast temperature u opsegu 70 - 90 °C nema značajan uticaj na TS filmova na bazi kikirikija (Liu *i sar.*, 2004). Treba istaći da su Liu *i sar.* (2004) radili samo pri pH=9.0. Dalje, poređenje TS filmova na bazi PuOC sa drugim proteinskim biodegradabilnim filmovima, dobijenim na pH=10.0 i 11.0, i pri temperaturi od 70 °C, pokazuje da TS filmova na bazi proteina sočiva i soje imaju TS 4.24 MPa i 8.5 MPa, redom, dok je TS PuOC filmova od 13.8 do 15.0 MPa (Kunte *i sar.*, 1997; Bamdad *i sar.*, 2006).

U svojim istraživanjima, Bourtoom *i sar.* (2006) su uočili da TS filmova od surimi proteina, rastvorljivih u vodi, raste sa porastom pH proteinskog rastvora. Rezultati ukazuju da alkalni pH filmogenog rastvora indukuje formiranje rezistentnijeg filma. U alkalnoj sredini, daleko od IET, denaturacija proteina promoviše razmotavanje i solubilizaciju proteina. Ipak, u slučaju filmova na bazi surimi proteina, kada je pH>10.0, dolazi do smanjenja vrednosti TS (Bourtoom *i sar.*, 2006), što kod filmova na bazi PuOC nije slučaj. Najveću zateznu jačinu ima PuOC film pripreman pri pH=12.0 i t=90 °C. Porast pH pre temperaturnog tretmana dovodi do povećanja denaturacije proteina (Bourtoom *i sar.*, 2006). Takođe, i temperaturni tretman utiče na povećanje vrednosti TS. Porast temperature filmogenog rastvora surimi proteina, sa 60 na 80 °C, dovelo je do povećanja TS sa 1.70 na \approx 3.0 MPa

Pri ekstremnim vrednostima pH i temperature, dolazi do denaturacije i razmotavanja molekula proteina, do izlaganja sulfhidrilnih i hidrofobnih grupa, koje se dalje međusobno

povezuju, tokom formiranja filma, obrazujući nove veze. U poređenju sa biorazgradivim filmovima na bazi brašna *Amarantha* (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005b), koji su pripremani pod sličnim uslovima, PuOC filmovi imaju značajno veće vrednosti TS. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da PuOC sadrži oko 60% proteina, dok u brašnu *Amarantha* ima svega 14 - 17% proteina, sposobnih da formiraju matriks filma i daju mu čvrstoću.

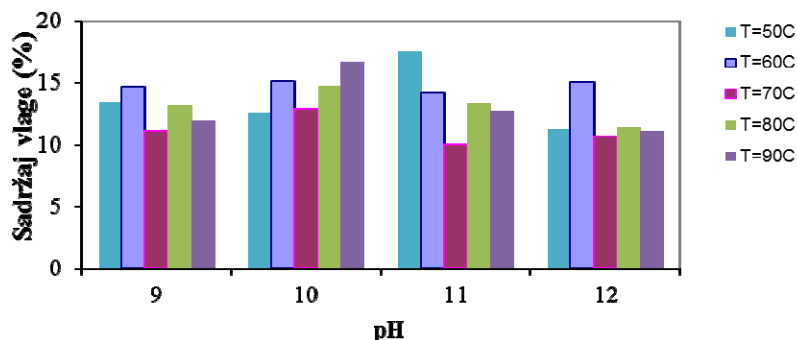
Druga važna mehanička karakteristika biorazgradivih filmova je EB. Kao što je rečeno, EB PuOC filmova raste sa porastom pH, sem pri $t=50$ °C. Najuočljiviji uticaj pH je primećen kada je temperaturni tretman bio na $t=90$ °C. Ipak, statistička analiza pokazuje da temperatura nema značajan uticaj ($p>0.05$) na EB PuOC filmova (Tabela 11).

Filmovi sa najvećom vrednosti EB dobijeni su kada je pH filmogenog rastvora bio 12.0, a temperaturni tretman na $T=90$ °C. U poređenju sa filmovima na bazi proteina sočiva, soje i graška, PuOC filmovi imaju niže vrednosti EB, na $T=70$ °C (Kunte *i sar.*, 1997; Rhim *i sar.*, 1998; Bamdad *i sar.*, 2006). Filmovi na bazi proteina kikirikija, pripremani na temperature 60 - 90 °C, imaju EB u opsegu 98 - 135% (Liu *i sar.*, 2004), dok je EB filmova na bazi PuOC od 4 do 33%. U poređenju sa filmovima na bazi brašna *Amarantha*, pripremanih pri $pH=10.0 - 11.84$ i $T=76.6 - 90$ °C koji imaju vrednosti $EB>100\%$ (Tapia-Blácido *i sar.*, 2005b), filmovi na bazi PuOC imaju manje vrednosti ($EB_{max}=65\%$). Veće EB filmova na bazi brašna *Amarantha* se mogu objasniti manjim sadržajem proteina i većim sadržajem skroba u brašnu *Amarantha*, što ovim filmovima omogućava veću fleksibilnost.

Poredeći mehaničke osobine kompozitnih filmova na bazi PuOC sa konvencionalnim polimernim filmovima, TS PuOC filmova je veća (13.80 - 68.08 MPa) od TS poliolefinskih filmova (3 - 10 MPa) (Briston, 1988). PuOC kompozitni filmovi imaju slične vrednosti EB kao celofan (oko 20%). Ipak, procenat EB kod PuOC filmova je znatno manji od EB većine komercijalnih sintetičkih polimernih filmova, kao npr. LDPE (oko 500%) ili polietilen visoke gustine (eng. High Density Polyethylene – HDPE) (oko 300%) (Pol *i sar.*, 2002).

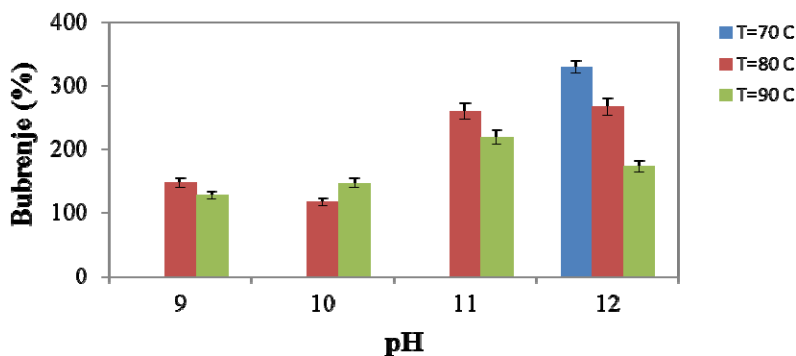
Sadržaj vlage i sposobnost bubrenja kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Rezultati prikazani na *Slici 41*. ukazuju da pH filmogenog rastvora i temperatura rastvaranja nisu značajno uticale ($p>0.05$) na sadržaj vlage kompozitnih filmova na bazi PuOC. Rezultati nisu dalje obrađeni metodom odzivnih površina, a sa *Slike 41*. se vidi da je vlaga filmova $13 \pm 3\%$ kod svih dobijenih uzoraka.



Slika 41. Uticaj pH i temperature na sadržaj vlage kompozitnog filma na bazi PuOC

Sposobnost bubrenja PuOC kompozitnih filmova ispitana je kod svih dobijenih filmova i samo se filmovi pripremani pri temperaturnom tretmanu na $t=80$ i 90 °C nisu raspali i rastvorili tokom procesa vađenja iz vode (Slika 42).

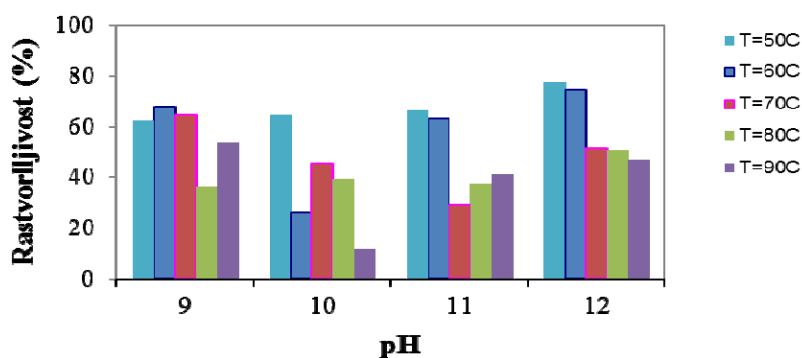


Slika 42. Uticaj pH i temperature na sposobnost bubrenja kompozitnog filma na bazi PuOC

Stepen bubrenja filmova pripremanih na $\text{pH}=9.0$ i 10.0 iznosi $140 \pm 10\%$, pri temperaturnom tretmanu na $t=80$ i 90 °C. Sa porastom pH na 11.0 i 12.0 , sposobnost bubrenja raste. Ipak, pri konstantom pH (11.0 ili 12.0), sa porastom temperature dolazi do smanjenja procenta bubrenja kompozitnog filma. Smanjenje sposobnosti bubrenja sa povećanjem temperature pripreme filma može biti posledica oslobađanja većeg broja reaktivnih grupa, uspostavljanja većeg broja novih veza u procesu sušenja filma, a samim tim i povećanja gustine matriksa koji tako ima manju sposobnost bubrenja.

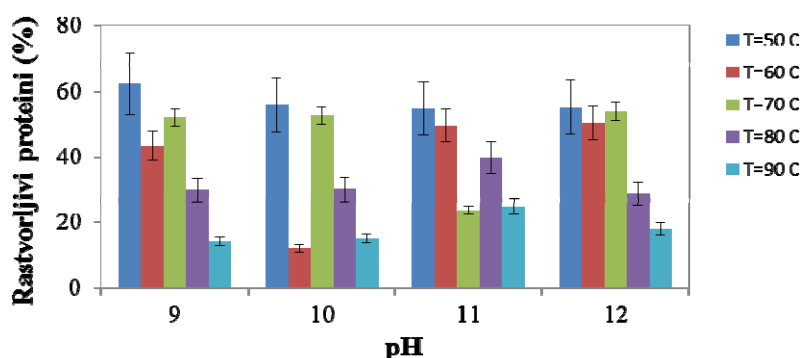
Ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve i koncentracija rastvorljivih proteina

Određena je ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova na bazi PuOC, pripremanih pri pH=9.0 - 12.0 i pri temperaturama od 50 do 90 °C i rezultati pokazuju da procesni parametri (pH i T) utiču na rastvaranje filmova u vodi (*Slika 43*).



Slika 43. Uticaj pH i temperature na ukupnu rastvorljivost kompozitnog filma na bazi PuOC

Filmovi denaturisani tokom temperaturnog tretmana, pri $t=80$ i 90 °C, zadržali su svoj integritet tokom tretmana potapanja u vodu, i pokazali su najmanju rastvorljivost, bez značajnog uticaja pH. Rezultati potvrđuju da je proteinska polimerna mreža visoko stabilna i da su samo molekuli malih masa rastvorljivi. Slično zapažanje u svom radu dali su i Bourtoom *i sar.* (2006). Poredeći ukupnu rastvorljivost i rastvorljivost proteina filma, sličan trend je uočen. Na rastvorljivost proteina, pH nema značajan uticaj ($p>0.05$), dok temperatura denaturacije značajno utiče, i to tako da sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja količine rastvorljivih proteina (*Slika 44*).



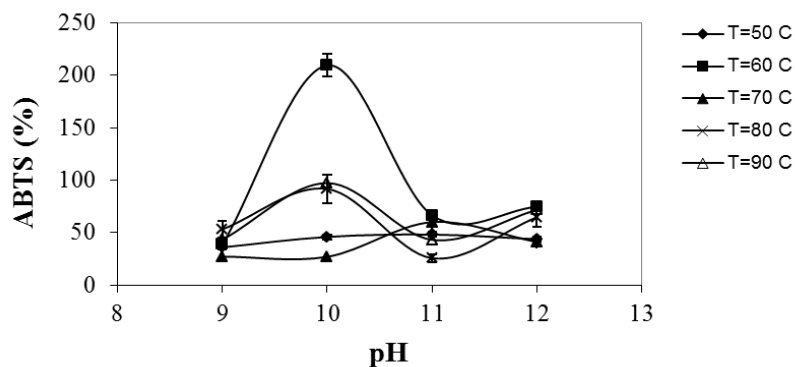
Slika 44. Uticaj pH i temperature na količinu rastvorljivih proteina kompozitnog filma na bazi PuOC

Literaturni navodi (Bourtoom *i sar.*, 2006) ukazuju da povećanje temperature sa 60 na 70 °C rezultira smanjenjem ukupne rastvorljivosti i količine rastvorljivih proteina filmova na bazi rastvorljivih surimi proteina. Roy *i sar.* (1999) daju podatke o smanjenju ukupne rastvorljivosti i rastvorljivosti proteina glutenskog filma, sa porastom temperature tokom pripreme filma. Filmovi na bazi PuOC, pripremani na $t=50$ i 60 °C, imaju slabije intramolekularne veze i u vodenim uslovima, oni su rastvorljiviji od filmova pripremanih na višim temperaturama ($t=80$ i 90 °C).

Antioksidantna aktivnost kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Rezultati ispitivanja antioksidantne aktivnosti kompozitnih filmova na bazi PuOC, pokazali su da ispitani filmovi poseduju sposobnost hvatanja radikal katjona i da koncentracija glicerola ima značajan uticaj na antioksidantnu aktivnost, a da pH nije značajno uticala na EC50 kompozitnih filmova na bazi PuOC. U cilju simultanog praćenja uticaja pH i temperature, ispitana je aktivnost filmova dobijenih pri različitim uslovima dobijanja (temperatura i pH).

Rezultati pokazuju da promena pH nije značajno uticala na promenu antioksidantnog potencijala filmova. Pri svim ispitanim pH, filmovi su imali približno iste vrednosti ABTS (%), izuzev pri $\text{pH}=10.0$, gde je do izražaja došao uticaj termičkog tretmana filmogenog rastvora. *Slika 45.* pokazuje da maksimalnu antioksidantnu aktivnost, određenu testom obezbojavanja rastvora ABTS^+ + radikal katjona, ima film pripreman na $\text{pH}=10.0$ i pri $t=60$ °C. Sa povećanjem temperature, dolazi do smanjenja sposobnosti hvatanja ABTS^+ + radikal katjona. To se može objasniti činjenicom da su proteini izloženi temperaturi od 80 i 90 °C, u većoj meri denaturisani, pa u fazi formiranja filma, obrazuju gušću mrežu. Samim tim manji broj slobodnih aminokiselina i peptida može biti rastvoreno, i učestvovati u antioksidantnom potencijalu rastvorljivog dela filma.



Slika 45. Uticaj pH i temperature na antioksidantnu aktivnost kompozitnog filma na bazi PuOC

Prikazani rezultati jasno ukazuju na potrebu praćenja paralelnog uticaja više faktora na osobine biorazgradivih filmova.

Barijerna svojstva kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

Važna karakteristika filmova, biorazgradivih kao i sintetičkih, radi procene potencijalne primene, su njihova barijerna svojstva prema gasovima. Propustljivost gasova nekoliko odabranih filmova određena je metodom po Lissy, a rezultati su prikazani u Tabeli 12.

Tabela 12. Propustljivost gasova kompozitnih filmova na bazi PuOC

pH	t (°C)	Propustljivost gasova (ml/m ² /24h 1 bar)			
		CO ₂	O ₂	N ₂	Vazduh
9.0	50	*	*	*	*
12.0	50	*	*	*	*
12.0	70	146.96	27.10	16.68	21.28
12.0	80	10.28	16.35	18.17	17.82
12.0	90	42.20	12.10	11.70	11.80

*rezultati van opsega merenja instrumenta

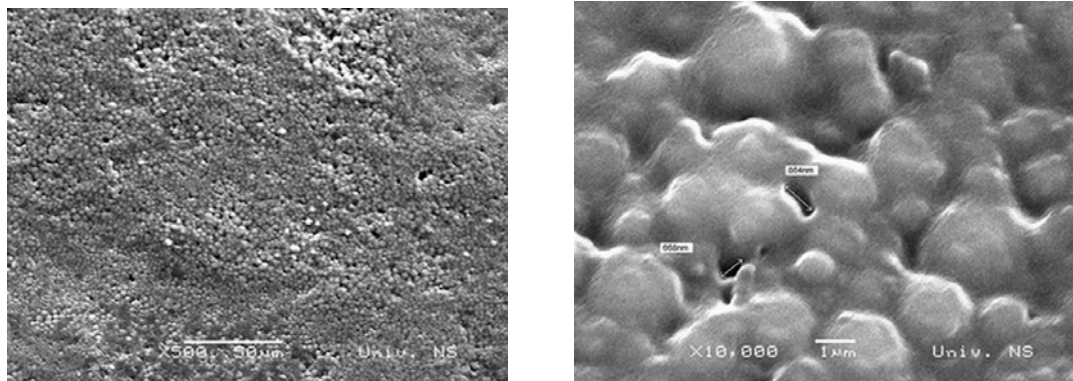
Zagrevanje rastvora proteina na t=70, 80 i 90 °C, dovelo je do smanjenja propustljivosti gasova. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost formiranja novih veza nakon denaturacije tokom temperaturnog tretmana, što ima za posledicu veću gustinu matriksa filma, a samim tim i manju mogućnost migracije gasova kroz film, kao i povećanje zatezne jačine (prikazano ranije). Sa druge strane, filmovi pripremani pri t=50 °C, na pH=9.0 i 12.0, pokazali su loša barijerna svojstva, tj. veliku propustljivost gasova (rezultati nisu očitani jer su van opsega instrumenta). Zapažanja ukazuju na neophodnost temperaturnog tretmana u cilju formiranja filmova, ali i poboljšanja njihovih karakteristika.

Strukturalna svojstva kompozitnih filmova na bazi pogače uljane tikve

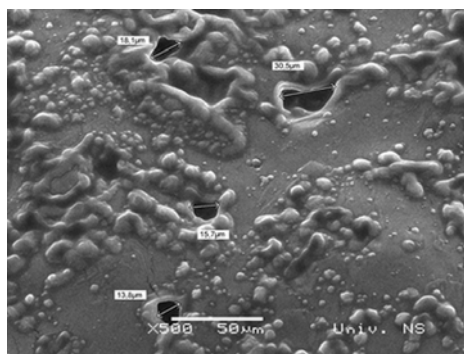
Radi boljeg razumevanja osobina dobijenih filmova, urađena je mikrostrukturalna analiza filmova, snimanjem površine filmova SEM tehnikom. Snimana je površina filmova pripremanih na t=50 i 90 °C (pH=12.0), filmovi sa, uslovno, najboljim i najlošijim karakteristikama. *Slika 46.* pokazuje da film pripreman na t=90 °C (*Slika 46a*) ima veoma kompaktnu strukturu, sa nekoliko nanopora, za razliku od filma dobijenog na t=50 °C (*Slika*

46b) na čijoj su površini uočene mikropore (pri uvećanju mikroskopa od 500x), što ukazuje na veliku propustljivost gasova.

a)



b)

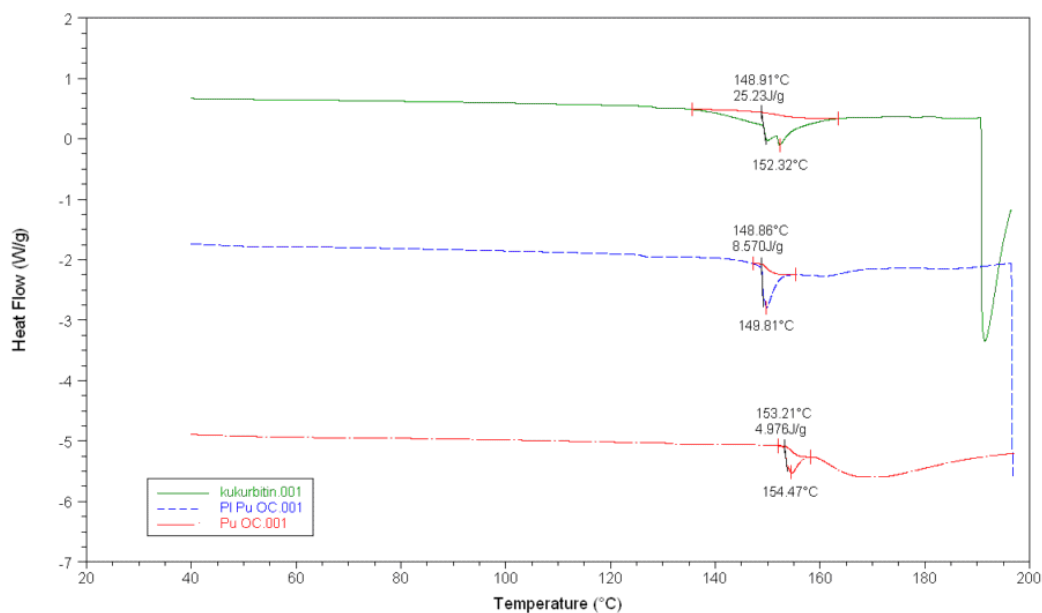


Slika 46. (a) SEM površinska morfologija PuOC kompozitnog filma; pH=12.0, t=90 °C (uvećanje 500x i 10 000x); (b) SEM površinska morfologija PuOC kompozitnog filma; pH=12.0, t=50 °C (uvećanje 500x)

Dodatna karakterizacija strukture filmova praćena je DSC tehnikom. Praćen je uticaj temperature na denaturaciju proteina i formiranje intermolekularnih novih veza u PuOC kompozitnom filmu.

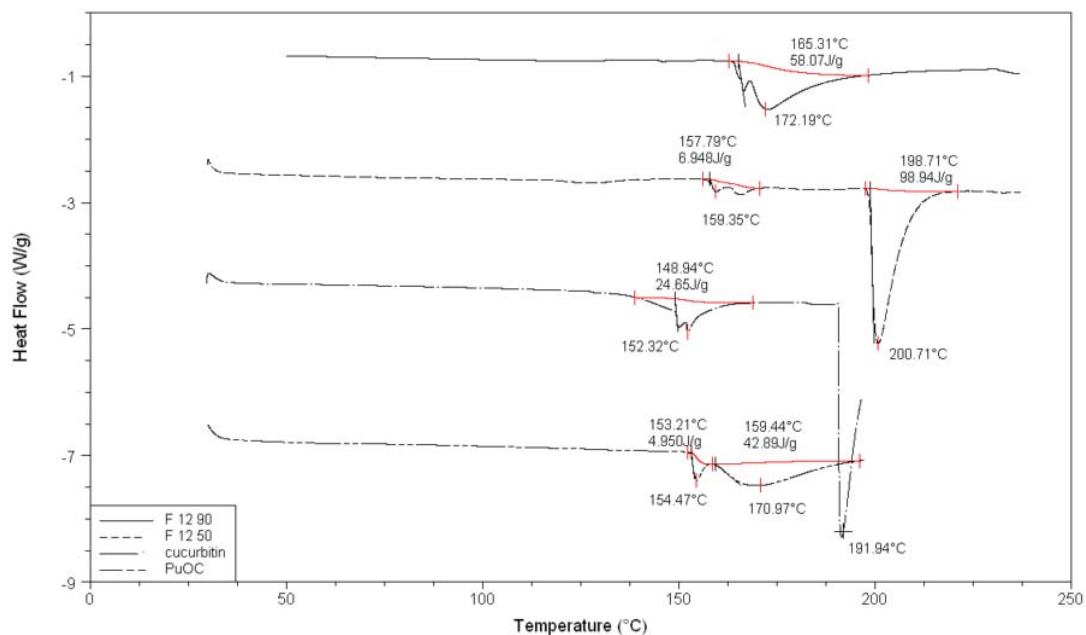
Slika 47. pokazuje DSC termogram kukurbitina (globulin semena uljane tikve golice), PI PuOC i PuOC. Inicijalna Td kukurbitina, PI PuOC i PuOC je 148.91 ± 3 °C, dok je maksimalna Td 150 ± 4 °C. Iznad temperature od 190 °C dolazi do potpune denaturacije kukurbitina, proteinskog izolata i PuOC, dok je temperatura potpune denaturacije PuOC iznad 200 °C. Može se zaključiti da, kako je kukurbitin glavna komponenta PI PuOC, osobine PI PuOCu velikoj meri zavise od osobina kukurbitina, a da, kako PuOC pored kukurbitina sadrži i druge komponente (2S albumine, gluteline i neproteinske komponente), termogram PuOC ima pomerene pikove u odnosu na kukurbitin. Prisustvo neproteinskih komponenti u PuOC,

kasnije u biorazgradivom filmu, utiču na osobine pogače i dobijenih filmova, pa se filmovi definišu kao kompozitni a ne proteinski.



Slika 47. Uporedni DSC termogram kukurbitina, proteinskog izolata i pogače uljane tikve golice

Slika 48. prikazuje DSC tremogram biorazgradivih filmova pripremanih na pH=12.0, pri temperaturi 50 i 90 °C i termograme kukurbitina i PuOC. Poređenjem Td i maksimalne Td filmova, kukurbitina i PuOC može se zaključiti da je temperaturni tretman imao uticaj na vrednost temperature denaturacije i na količinu energije neophodne za denaturaciju molekula proteina. Najnižu vrednost maksimalne Td imaju kukurbitin i PuOC, 152.32 i 154.47 °C, dok je kod filma pripremanog na 50 °C max. Td=159.35 °C, a kod filma zagrevanog na 90 °C, max. Td=172.19 °C. Pomeranje ka većim vrednostima Td kod filmova sa pripremom na višoj temperaturi, može se objasniti povećanim stepenom denaturacije koja nastaje tokom zagrevanja i boljim umrežavanjem tokom hlađenja. Time je povećana gustina proteinske mreže, pa je neophodna viša temperatura i veća količina energije da bi došlo do degradacije strukture filma. Potpuna denaturacije kukurbitina izvršena je na 191.94 °C, dok su komponente filma pripremanog na 50 °C potpuno denaturisane na 200.71 °C. Termogram filma pripremanog na 90 °C pokazuje da nakon 172.19 °C nema dalje denaturacije, što znači da su sve komponente denaturisane tokom pripreme, izuzev molekula koji su učestvovali u formiranju matriksa filma.



Slika 48. Uporedni DSC termogram biorazgadivih filmova pripremanih na pH=12.0 i t=90 °C, na pH=12.0 i t=50 °C, kukurbitina i PuOC

Literaturni podaci (Marcone *i sar.*, 1998) pokazuju da je Td kukurbitina 90.4 °C ali treba istaći da je ispitan rastvor globulina u odgovarajućem puferu. Suprotno, rezultati prikazani na *Slikama 47. i 48.* predstavljaju Td uzoraka, sadržaja vlage $12 \pm 2\%$. Uočeni fenomen pomeranja Td ka većim vrednostima posledica je uticaja sadržaja vlage na termičke osobine ispitanih uzoraka. Sa porastom sadržaja vlage i dodatkom plasticizera tipa poliola, temperatura denaturacije se smanjuje. Zhang *i sar.* (2001) su proučavali efekat sadržaja vlage na termičke osobine SPI ekstrudiranih filmova i zaključili da sadržaj vlage ima ključnu ulogu u determinaciji termičkih karakteristika filma. U svojim istraživanjima Kokoszka *i sar.* (2010) ispitali su termičke osobine filmova na bazi SPI, sadržaja vlage 16 i 18 g/g s.m. i sa udelom dodatog glicerola od 40 do 70% (w/w). Vrednosti maksimalne temperature degradacije ispitanih filmova su od 64.9 ± 0.8 do 71.8 ± 2.4 °C. Suprotno tome, Denavi *i sar.* (2009) pratili su Td filmova na bazi SPI i uočili dva pika na 110 i 130 °C. Endotermni pik na 110°C odgovara denaturaciji β -konglicinina (7S frakcija SPI), a pik na 130 °C odgovara Td temperaturi denaturacije glicinina (11S frakciji). Pomerene vrednosti Td za filmove na bazi SPI, ispitane u radu Denavi *i sar.* (2009), verovatno su posledica nižeg sadržaja vlage filmova, kao i manje količine dodatog plasticizera (1.5%, w/v).

Sa porastom sadržaja vlage, Tg proteinskih filmova se pomera ka znatno nižim vrednostima, utičući na ponašanje vode kao plasticizera, inkorporirane u proteinsku mrežu

(Zhang *i sar.*, 2001). Kokoszka *i sar.* (2010) nisu zabeležili Tg filmova na bazi SPI, u ispitivanom opsegu temperatura (25 - 110 °C). Rezultati Su *i sar.* (2007; 2010) pokazuju da je Tg osušenog SPI ≈ 60 °C, a da 25% udela glicerola u SPI filmu spušta Tg ispod -50 °C, a trend opadanja se nastavlja sa povećanjem sadržaja vlage. Tg glicerola je u opsegu -50 do -80 °C, u zavisnosti od sadržaja vode (Claudy *i sar.*, 1997). Kako su termičke karakteristike filmova na bazi PuOC ispitivane u opsegu temperatura od 30 do 250 °C, Tg nije zabeležena, a očekivane vrednosti su Tg < 0 °C.

U ovoj fazi ispitivanja ocenjena je mogućnost dobijanja novih kompozitnih filmova na bazi PuOC. Praćen je uticaj različitih vrsta plastifikatora i njihovih koncentracija, i glicerol se pokazao kao uspešan plastifikator primenjiv za dobijanje PuOC filmova sa dobrim osobinama. Praćen je uticaj pH i količine glicerola, kao i pH i temperature zagrevanja filmogenog rastvora PuOC. Udeo glicerola od 0.25 g/g PuOC pokazao se kao najoptimalniji i primenjen je u fazi praćenja uticaja pH i temperature. Pogača uljane tikve golicice ima filmogena svojstva samo u alkalnoj sredini, a sa porastom temperature pripreme filma, većina ispitanih osobina se poboljšala. Osobine dobijenih filmova poređene su sa drugim biorazgradivim filmovima, i može se zaključiti da novi PuOC film ima osobine slične filmovima na bazi proteina soje, graška, sočiva i surutke, kao i kompozitnog filma dobijenog od brašna *Amarantha*.

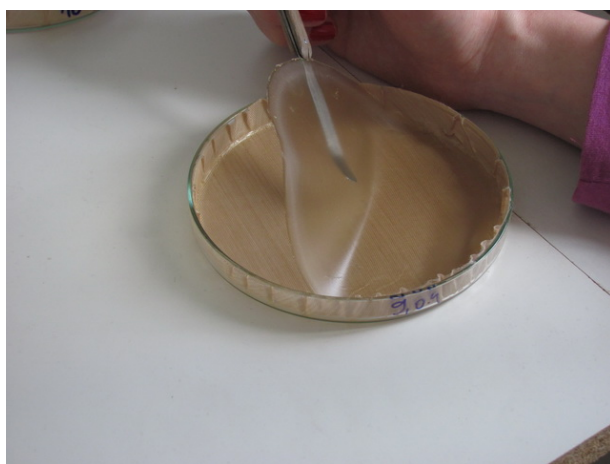
4.2 Dobijanje i karakterizacija biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata uljane tikve

Istraživanja prikazana u prethodnim poglavljima pokazala su mogućnost primene PuOC za dobijanje novih biorazgradivih kompozitnih filmova. Kako je PuOC kompleksan sistem (sa 60% proteina), tokom pripreme filmova, pod uticajem pH i temperature, pored proteina ekstrahuju se i druge komponente (rastvorna vlakna, pigmenti, rastvorljivi ugljeni hidrati, lipidi itd.). Radi razumevanja uticaja proteina, kao glavne komponente filma na formiranje i osobine dobijenog filma, u ovoj fazi istraživanja, pripremani su filmovi na bazi PI PuOC.

Osim standardnih istraživanja fizičko-hemijskih, mehaničkih i barijernih osobina, izučavana je struktura filmova pogodnom metodom: FTIR, jer su filmovi pravljani na bazi jednog makromolekula pa se može sagledati proces umrežavanja, tokom formiranja filma, na osnovu osobina filmogenog makromolekula.

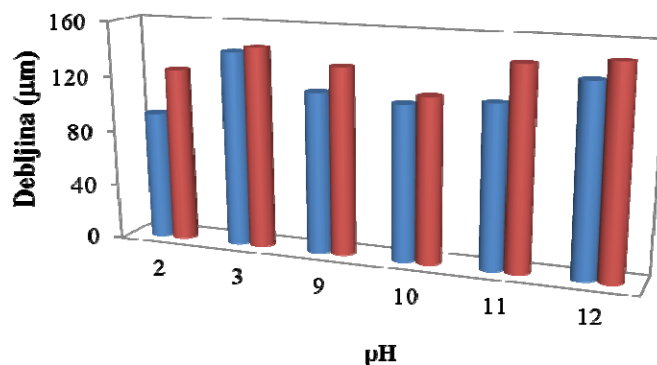
Fizičko - mehaničke osobine biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

U cilju praćenja uticaja procesnih parametara na formiranje i osobine filmova, pH je podešen na pH=2.0 - 12.0, a udeo glicerola je bio 0.3 - 0.6 g/g PI PuOC. Rezultati pokazuju da PI PuOC ima sposobnost formiranja biorazgradivih filmova u širokom opsegu pH, izuzev pri pH=4.0-8.0, pri udelu glicerola od 0.4 i 0.5 g/g PI PuOC. Kada je udeo glicerola bio 0.3 g/g PI PuOC, dobijeni filmovi su bili kruti i sa njima je bilo nemoguće rukovati. Suprotno, filmovi sa 0.6 g glicerola/g PI PuOC su lepljivi. Filmovi formirani sa 0.4 i 0.5 g glicerola/g PI PuOC su transparentni, čvrsti ali dovoljno fleksibilni za jednostavno rukovanje (*Slika 49*).



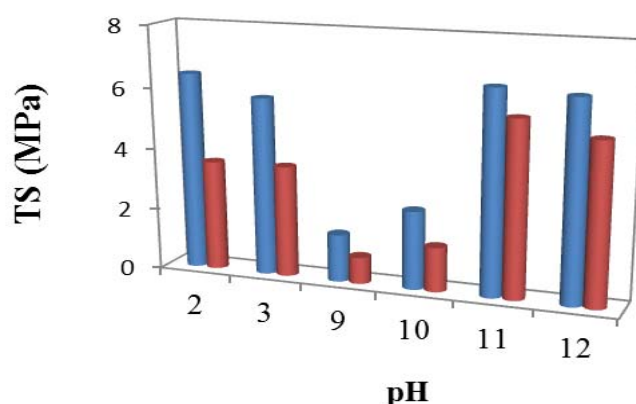
Slika 49. Biorazgradivi film na bazi PI PuOC; pH=9.0, 0.4 g glicerola/g PI PuOC

Dobijeni filmovi na bazi PI PuOC imaju ujednačenu debljinu koja iznosi $115 \pm 25 \mu\text{m}$, u zavisnosti od pH i količine dodatog glicerola (*Slika 50*). Filmovi sa manjom količinom glicerola imaju i manju debljinu, s obzirom na veću gustinu mreže i manju količinu vezane vode.



Slika 50. Uticaj pH na debljinu biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

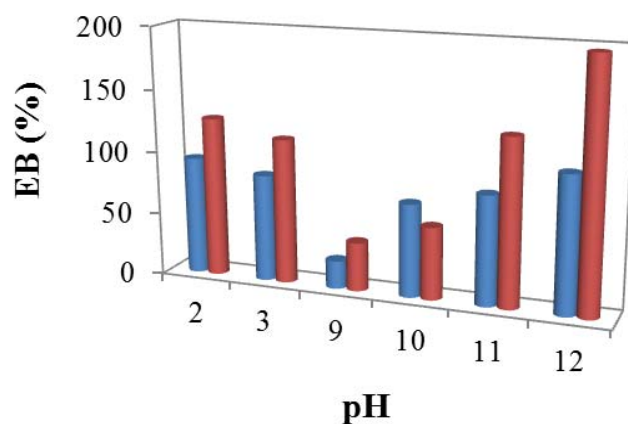
Na *Slici 51.* prikazana je zavisnost TS od pH filmogenog rastvora i količine dodatog glicerola. ilmovi pripremani na pH=2.0, 3.0, 11.0 i 12.0, sa 0.4 g glicerola/g PI PuOC imaju veću vrednost TS (\approx F6 MPa), u poređenju sa filmovima pripremanim na pH=9.0 i 10.0. Porastom udela glicerola na 0.5 g/g PI PuOC, TS se smanjuje ispod 4 MPa, kod filmova pripremanih u kiseljoj sredini, i ispod 6 MPa, za filmove na pH=11.0 i 12.0. Filmovi pripremani na pH=9.0 i 10.0 imaju 2-2.5 puta manje vrednosti TS, pri oba udela glicerola, u poređenju sa ostalim dobijenim filmovima. Filmovi pripremanim u kiseljoj i ekstremno alkalnoj sredini formiraju intra- i intermolekularo umrežavanje proteina, povećavajući time vrednosti TS.



Slika 51. Uticaj pH na TS biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

Količina dodatog glicerola ima veći uticaj na TS filmova pripremanih u kiseljoj nego u alkalnoj sredini. Filmovi sa 0.4 g glicerola/g PI imaju veće vrednosti TS, u poređenju sa filmovima kod kojih je dodato 0.5 g glicerola/g PI, pri svim ispitanim pH. Porast koncentracije glicerola utiče na smanjenje TS, jer se molekuli glicerola inkorporiraju među proteinske lance, smanjujući intermolekularne sile, samim tim i jačinu matriksa filma.

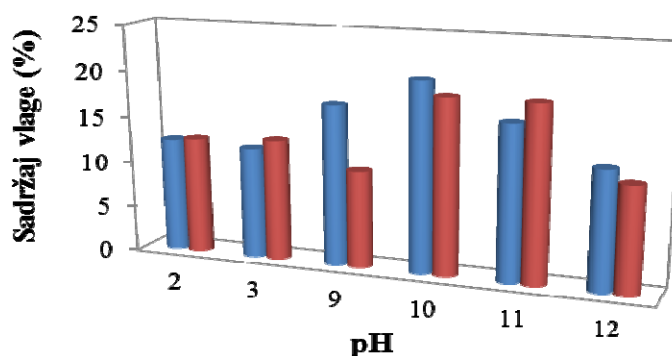
Slika 52. pokazuje uticaj pH na EB PI PuOC filmova, pri upotrebi glicerola kao plasticizera, u udelu od 0.4 i 0.5 g/g PI PuOC. Rezultati jasno ukazuju da filmovi imaju veće vrednosti EB kada je dodato 0.5 g glicerola/g PI PuOC. Najnižu vrednost EB (22.22%) ima film pripreman na pH=9.0 i sa 0.4 g glicerola/g PI PuOC, a film sa najvećom vrednošću EB (196.61%) je dobijen na pH=12.0 i sa 0.5 g glicerola/g PI PuOC. Glicerol, kao plasticizer, povećava fleksibilnost filma redukujući vodonične veze između proteinskih lanaca, i povećavajući tako njihovu pokretljivost (Liu *i sar.*, 2004).



Slika 52. Uticaj pH na EB biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

Sadržaj vlage biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

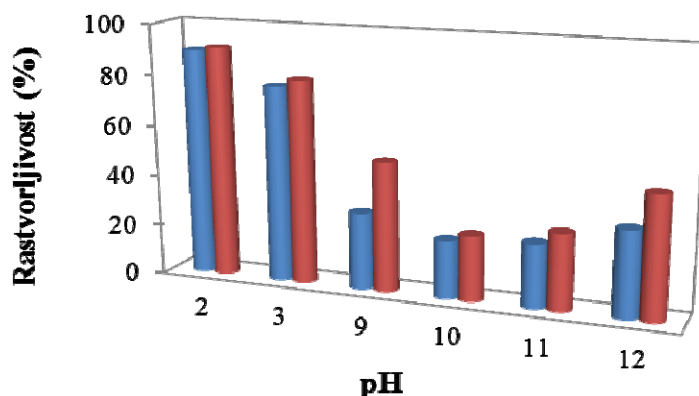
Na *Slici 53.* prikazan je uticaj pH i udela glicerola na sadržaj vlage biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC. Primećuje se da se, kao što je i očekivano, filmovi pripremani u ekstremno kiseloj i baznoj sredini najmanje rastvaraju. Dobijeni rezultati rastvorljivosti filmova su u korelaciji sa rezultatima TS istih filmova. Smanjenje rastvorljivost ovih filmova i povećanje TS mogu se pripisati gustoj mreži proteina, formiranoj pri datim uslovima, čime se povećava TS, a smanjuje mogućnost inkorporacije molekula vode, time i sadržaj vlage.



Slika 53. Uticaj pH na sadržaj vlage biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

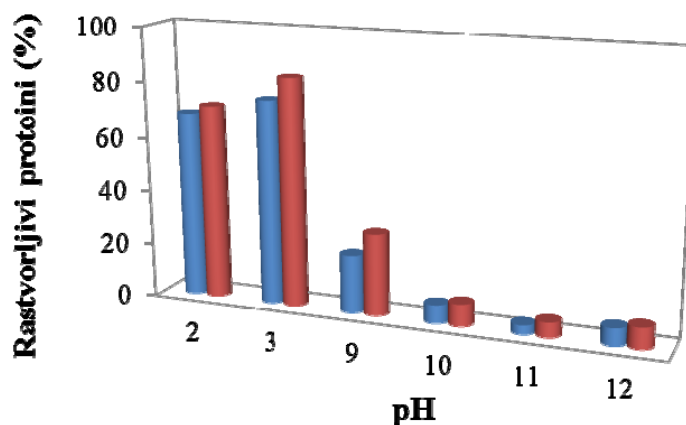
Ukupna rastvorljivost i koncentracija rastvorljivih proteina biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

Proces potapanja filma u vodu rezultirao je njegovim delimičnim rastvaranjem. Najveću rastvorljivost imaju filmovi pripremani u kiseloj sredini (procenat rastvorljivost 79 - 90%) i sa udelom glicerola od 0.5 g/g PI PuOC (*Slika 54*). Najmanju rastvorljivost imaju filmovi pripremani sa 0.4 g glicerola/g PI, pri pH=10.0 i 11.0.



Slika 54. Uticaj pH na rastvorljivost biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

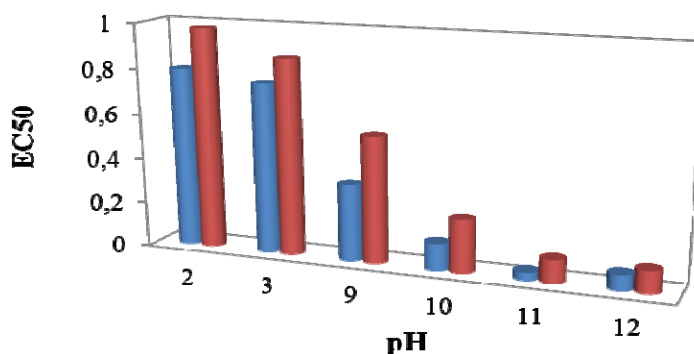
Rastvoreni deo biorazgradivog filma ispitivan je određivanjem količine rastvorenih proteina. Koncentracija rastvorljivih proteina određena je spektrofotometrijski. Na *Slici 55* prikazan je uticaj pH i udela glicerola na koncentraciju rastvorljivih proteina filma na bazi PI PuOC. Može se primetiti da rastvorljivi proteini prate trend ukupne rastvorljivosti, što nije bio slučaj kod filmova na bazi PuOC. Rastvaranjem PI filmova, u rastvoru se nalaze samo molekuli peptida i proteina, pa je uočena korelacija očekivana. Uticaj udela glicerola na količinu rastvorljivih proteina, takođe, je pokazao istu zavisnosti kao kod ukupne rastvorljivosti. Sa povećanjem udela glicerola, povećao se i procenat rastvorljivih proteina. Najveću koncentraciju rastvorljivih proteina (83.5%) ima film dobijen na pH=3.0 sa 0.5 g glicerola/g PI PuOC, a najmanju (3.3%) filma na pH=11.0, pri udelu glicerola od 0.4 g/g PI PuOC.



Slika 55. Uticaj pH na koncentraciju rastvorljivih proteina biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

Antioksidantna aktivnost biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

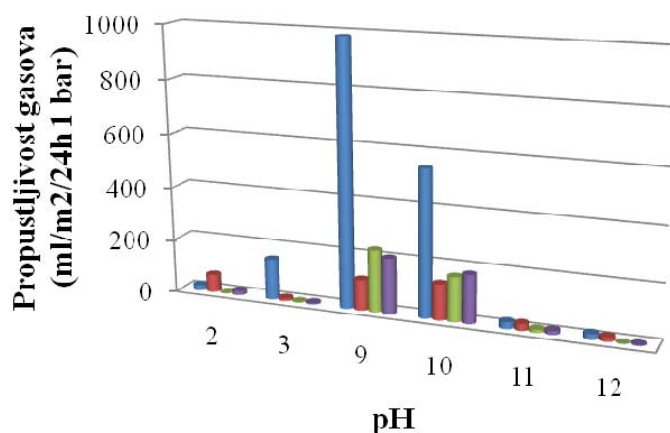
Uticaj pH i udela glicerola na antioksidantnu aktivnost biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC prikazan je na *Slici 56*. Od svih ispitanih filmova, dobru antioksidantnu aktivnost (najmanji EC50 broj) pokazuju filmovi pripremani na pH=10.0 - 12.0, dok su ostali filmovi imali i do 30x manju aktivnost. Udeo dodatog glicerola nije pokazao značajan uticaj ($p > 0.05$) na antioksidantnu aktivnost PI PuOC filmova. Najveću aktivnost imaju filmovi pripremani na pH=11.0, EC50=0.034 i 0.030, kada je udeo glicerola 0.4 g/g PI PuOC, odnosno 0.5 g/g PI PuOC.



Slika 56. Uticaj pH na antioksidantnu aktivnost (hvatanje ABTS^{•+} radikala katjona) biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ 0.4 g glicerola/g PI PuOC, ■ 0.5 g glicerola/g PI PuOC

Barijerna svojstva biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

Na osnovu ispitanih osobina biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC, filmovi pripremani sa 0.4 g glicerola/g PI PuOC imaju veće vrednosti TS, a manje za EB i rastvorljivost, u odnosu na filmove sa 0.5 g glicerola/g PI PuOC, pa su oni izabrani za određivanje barijernih svojstava. Dobijeni rezultati za propustljivost gasova (CO_2 , N_2 i O_2) prikazani su na *Slici 57*. Sa *Slike 57*. se može videti da filmovi pripremani na pH=2.0, 3.0, 11.0 i 12.0 predstavljaju odličnu barijeru za gasove, dok filmovi pripremani na pH=9.0 i 10.0 propuštaju određenu količinu CO_2 (985.87 i 546.30 $\text{ml/m}^2/24\text{h}$ 1 bar, redom). Filmovi dobijeni na pH=2.0, 3.0, 11.0 i 12.0 imaju propustljivost manju od 150 $\text{ml/m}^2/24\text{h}$ 1 bar, za sve testirane gasove, dok filmovi na pH=9.0 i 10.0 pokazuju propustljivost između 100 i 200 $\text{ml/m}^2/24\text{h}$ 1 bar, za O_2 , N_2 , i vazduh. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ostalim karakteristikama filmova, tj. filmovi sa dobrim mehaničkim osobinama (veća TS) pokazuju manju propustljivost gasova. Formiranje većeg broja intermolekularnih veza u kiseloj i ekstremno alkalnoj sredini verovatno je rezultovalo jačom (gušćom) polimernom mrežom filma. Gušća proteinska mreža redukuje difuziju gasova kroz matriks filma. Sa druge strane, slabiji i porozniji filmovi, formirani na pH=9.0 i 10.0, imaju veću propustljivost gasova.



Slika 57. Uticaj pH na barijerna svojstva (propustljivost gasova) biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC; ■ CO_2 , ■ O_2 , ■ N_2 , ■ vazduh

U poređenju sa propustljivošću sintetičkih polimernih filmova, biorazgradivi filmovi na bazi PI PuOC predstavljaju znatno bolju barijeru za gasove. Rezultati poređenja dati su u Tabeli 13.

Tabela 13. Propustljivost gasova (ml/m²/24h 1 bar) PI PuOC filma i nekih sintetičkih filmova

Vrsta filma	Propustljivost (ml/m ² /24h 1 bar)			
	CO ₂	O ₂	N ₂	Vazduh
PI PuOC	20.88	15.85	0	3.32
PE (90 μm)	7350.40	2431.20	573.00	949.40
BOPP (40 μm)	2997.90	1130.80	257.50	442.80
PVDC/BOPP 20 μm/PE 20 μm	87.00	25.30	11.70	14.06

PI PuOC, 0.4g glycerol/g PI PuOC, pH=12.0

PE – polietilen; BOPP – biaksijalno orijentisani polipropilen; PVDC – poliviniliden hlorid (Lazić *i sar.*, 2010)

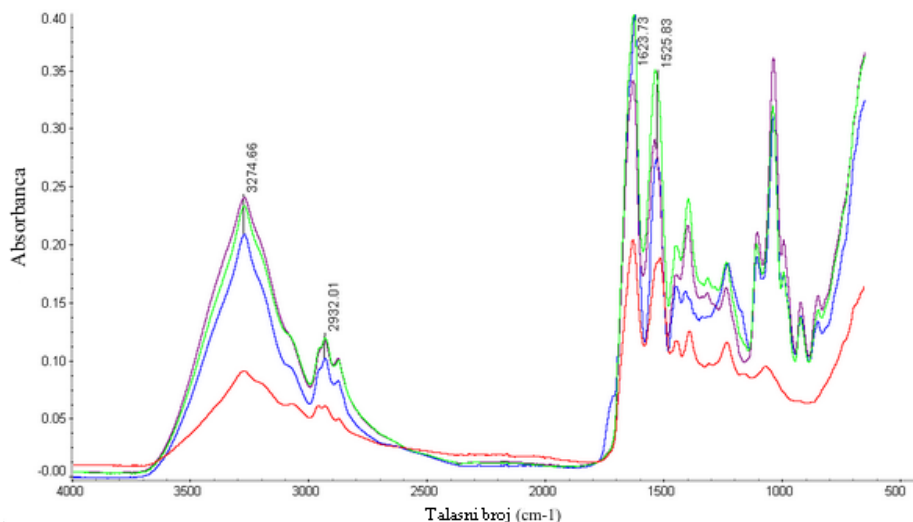
Filmovi na bazi PE i BOPP imaju propustljivost O₂ 2431.20 i 1130.80 ml/m²/24h 1 bar, redom (Lazić *i sar.*, 2010), dok je propustljivost PuOC PI filmova 15.85 ml/m²/24h 1 bar. Poredeći propustljivost vazduha, PuOC PI filmovi imaju 3.32 ml/m²/24h 1 bar, dok propustljivost filmova na bazi PE i BOPP iznosi 949.40 i 442.80 ml/m²/24h 1 bar, redom (Lazić *i sar.*, 2010). Iako je lamimirani film PVDC/BOPP 20 μm/PE 20 μm film pokazao bolja barijerna svojstva i dalje PI PuOC film ima manju propustljivost za sve ispitane gasove.

Strukturna analiza biorazgradivih filmova na bazi proteinskog izolata uljane tikve

U cilju boljeg razumevanja strukture filmova, urađena je FTIR analiza dobijenih biorazgradivih filmova i samog PI PuOC. *Slika 58.* prikazuje FTIR spektre PI PuOC i biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC, pripremanih na različitim pH. Svi filmovi i sam proteinski izolat pokazuju pikove karakteristične za veze prisutne u molekulima proteina: u regiji 3000-3700 cm⁻¹ pikovi povezani sa vibracijama istezanja O-H i N-H veza (Soares *i sar.*, 2009), kao i pikove u regiji 2800-3000 cm⁻¹ koje potiču od adsorpcije istezanja C-H veze (Secundo i Guerrieri, 2005). Adsorpcione trake prisutne na 1629 i 1525 cm⁻¹ predstavljaju trake iz Amid I i Amid II grupe (Robertson *i sar.*, 2006). Na *Slici 58.* se vide i trake koje potiču od α-heliksa (1295-1330 cm⁻¹), β-namotaja (1270-1295 cm⁻¹), nasumičnih namotaja (1250-1270 cm⁻¹) i β-sloja (1220-1250 cm⁻¹), koje predstavljaju Amid III (Song *i sar.*, 2009).

Prikazani interferogram jasno ukazuje na razlike u strukturi PI PuOC i formiranih filmova. Iste veze imaju jači intenzitet adsorpcije u filmu nego u izolatu, što je verovatno posledica većeg broja istih veza prisutnih u filmu, formiranom na određenom pH, nego u izolatu. Sa *Slike 58.* se može uočiti neznatna razlika u veličini pika na određenom talasnom

broju, između filmova pripremanih na pH=2.0, 9.0 i 11.0, iako se osobine ovih filmova značajno razlikuju.



Slika 58. FTIR spektar PI PuOC i filmova na bazi proteinskog izolata PuOC; — PI PuOC, — film pripreman na pH=2.0, — film pripreman na pH=9.0, — film pripreman na pH=11.0

Poređenje biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata uljane tikve sa drugim biorazgradivim filmovima na bazi biljnih proteina

Tabela 14. pokazuje karakteristike biorazgradivih filmova na bazi različitih biljnih proteina. U Tabeli 14. su date maksimalne i minimalne vrednosti svih ispitanih osobina PI PuOC filmova. Vrednosti TS za PI PuOC film su reda veličine TS filmova na bazi proteina sočiva, kikirikija, graška, soje, boba i semena *Jatropha*. Najmanja dobijena vrednost TS za PI PuOC film (0.86 MPa, pH=9.0) je slična vrednostima TS filmova na bazi proteina graška i semena *Jatropha* (0.69 i 0.50 MPa, redom), dok je najveća vrednost zatezne jačine filma na bazi PI PuOC (TS=6.56 MPa, pH=12.0) bolja od TS svih upoređenih filmova.

Tabela 15. Mehaničke karakteristike (TS and EB), rastvorljivosti sadržaj vlage nekih proteinskih filmova

Karakteristike	PI PuOC ^a	Proteini sočiva ^b	Proteini graška ^c	Proteini soje ^d	Proteini kikirikija ^e	Proteini boba ^f	Proteini semena <i>Jatropha</i> ^g
TS (MPa)	0.9±0.4 6.6±0.8	4.2±1.3	0.7±0.1	4.6±0.2	1.3±0.2	4.1±0.3	0.5-0.7
EB (%)	22.2±4.8 196.6±5.7	58.2±12.9	92.0±21.5	14.8±1.7	98.0±32.2	70.0-75.0	70.0-75.0
Rastvorljivost (%)	89.5±2.0 22.7±1	38.7±3.2	43.5±4.0	24.3±0.1	-	46.9	-
Sadržaj vlage (%)	20.5±1.2 10.45±0.1	23.1±1.6	-	14.2±0.2	-	-	-

^a najniže i najviše vrednosti u ispitanoj pH opsegu; ^b pH=11.0, 0.5 g glicerola/g PC sočiva (Bamdad *i sar.*, 2006); ^c pH=9.0, 0.4 g glicerola/g PC graška (Choi i Han, 2001); ^d pH=10.0, 0.4 g glicerola/g SPI (Soliman *i sar.*, 2007); ^e pH=9.0, 0.9 g glicerola/g PI kikirikija (Liu *i sar.*, 2004); ^f pH=12.0, 0.4 g glicerola/g PI boba (Saremnezhad *i sar.*, 2011), ^g pH=9.0, 0.4 i 0.5 glicerola/g proteina semena *Jatropha* (Lestari *i sar.*, 2011)

Film na bazi PI PuOC sa najvećom vrednošću EB (196.61%) ima najveće EB u poređenju sa drugim proteinskim filmovima. Najniža vrednost EB (22.2%, pH=9.0) za PI PuOC film niža je od EB filmova na bazi proteina sočiva, graška, kikirikija i proteina semena *Jatropha*. Jedino film na bazi proteina soje ima nižu vrednost EB (14.8%).

Rastvorljivost biorazgradivog filma na bazi PI PuOC je reda veličine kao i kod ostalih filmova na bazi biljnih proteina (20 - 50%) (Tabela 14). Jedino PI PuOC film pripreman u kiselj sredini pokazuje veću rastvorljivost (>79%). Sadržaj vlage PI PuOC je takođe reda veličine sadržaja vlage drugih filmova na bazi biljnih proteina (Tabela 14).

U ovoj fazi ispitana je mogućnost dobijanja biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC. Takođe je praćen uticaj pH i udela glicerola na dobijanje i karakteristike dobijenih filmova. PI PuOC se pokazao kao filmogen u širokom opsegu pH, izuzev na pH=4.0 - 8.0, pri udelu

glicerola od 0.4 - 0.5 g/g PI PuOC. Ispitani parametri (pH i udeo glicerola) značajno ($p < 0.05$) su uticali na mehaničke karakteristike filma (TS i EB) i na rastvorljivost. Koncentracija glicerola nema značajan uticaj ($p > 0.05$) na sadržaj vlage i antioksidantnu aktivnost. Filmovi sa 0.4 g glicerola/g PI pokazuju odlična barijerna svojstva (propustljivost gasova) u poređenju sa komercijalnim sintetičkim filmovima.

4.2.1 Modifikacija uslova dobijanja i karakteristika biorazgradivog filma na bazi proteinskog izolata uljane tikve

U cilju unapređenja barijernih i mehaničkih osobina proteinskih filmova, kao i proširenja mogućnosti primene, modifikacija proteinske strukture i/ili interakcijom molekula proteina sa drugim filmogenim molekulima je sastavni deo procesa dobijanja biorazgradivih filmova. Enzimsko *umrežavanje TGazom* je posebno interesantno i uspešno. Drugi vid modifikacije karakteristika filmova podrazumeva *produkciju složenih ili kompozitnih filmova*, uvođenjem polisaharida ili hidrofobnih materijala (lipida ili voskova).

PI PuOC pokazuje filmogena svojstva u opsegu $pH = 2.0, 3.0$ i $9.0 - 12.0$. Kako je za potencijalnu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji potrebno da pH bude blizak neutralnim vrednostima, tj. što sličniji pH hrane, a kako sam PI PuOC ne formira filmove u tom opsegu ($pH = 4.0 - 8.0$), u ovoj fazi rada izvedena je modifikacija uslova dobijanja filma na sledeći način: (i) enzimski (TGazom); (ii) pravljenjem kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, sa i u prisustvu TGaze, u cilju pomeranja pH formiranja filmova.

4.2.1.1 Umrežavanje enzimom transglutaminaza

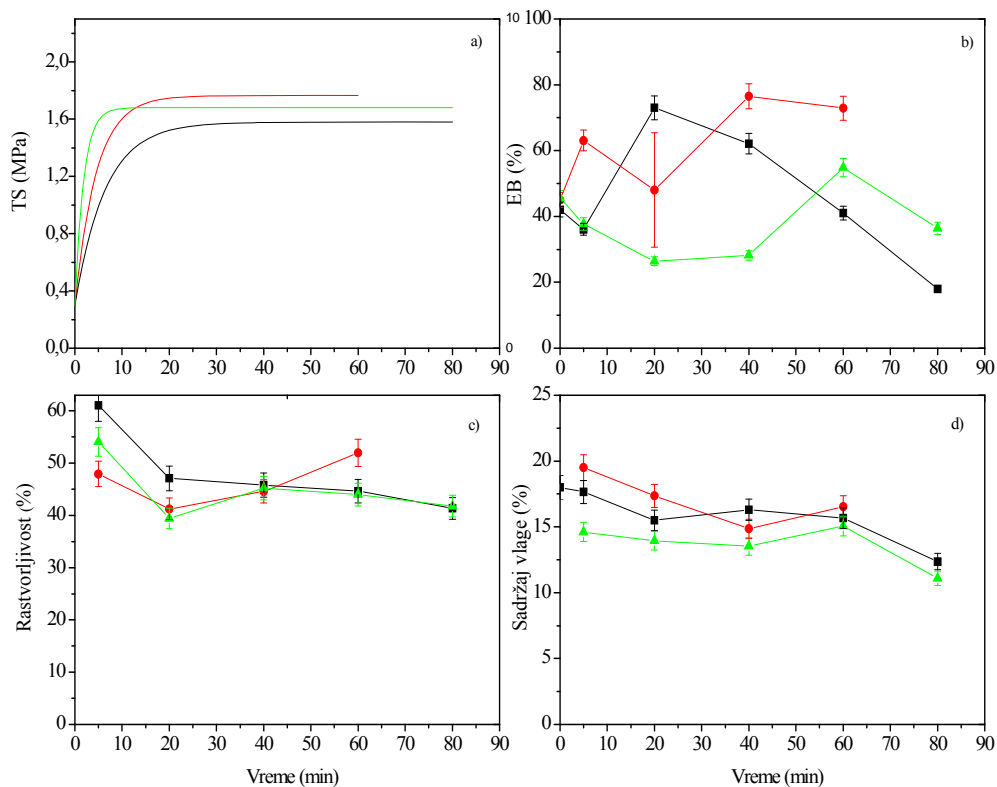
Na osnovu literaturnih podataka, poznato je da molekuli proteina, denaturisani temperaturnim tretmanom, postaju fleksibilniji a reaktivni centri dostupniji TGazi (Lim *i sar.*, 1999). Sve to je posledica dejstva visoke temperature koja indukuje denaturaciju strukture molekula proteina, čineći dostupnijim unutrašnje SH grupe, čime se povećava broj intermolekularnih disulfidnih veza, a takođe i glutaminski i lizinski bočni nizovi, neophodni za intermolekularno povezivanje u prisustvu TGaze (Su *i sar.*, 2007).

Literaturni podaci (Popović *i sar.*, 2011) ukazuju na mogućnost povećanja stepena polimerizacije kukurbitina (glavne komponente PI PuOC) delovanjem TGaze. Umrežavanjem sa TGazom, kukurbitin je pokazao povećanu rastvorljivost u blizini IET ($pH = 5 - 8$) i sposobnost geliranja.

U prisustvu TGaze, pri ispitivanju mogućnosti dobijanja filmova na pH=4.0 - 8.0, PI PuOC pokazuje filmogena svojstva samo na pH=8.0. Dobijeni filmovi imaju blago žutu boju i nisu transparentni. Srednja vrednost debljine svih filmova je $180 \pm 25 \mu\text{m}$, što je znatno veće od debljine filmova dobijenih bez umrežavanja TGazom. U cilju optimizacije uslova delovanja enzima, praćen je uticaj vremena delovanja i količine enzima na karakteristike filmova.

Na *Slici 59a.* prikazana je fitovana zavisnost TS filma na bazi PI PuOC od vremena delovanja i količine TGaze. Reakcija predstavlja kvadratnu hiperbolu enzimske reakcije i vidi se da u prvih 20 min reakcije, TS ima eksponencijalnu zavisnost od vremena delovanja enzima, a sa daljim povećanjem vremena brzina reakcije dostiže maksimalnu vrednost i reakcija poprima oblik enzimske reakcije nultog reda. Rezultati pokazuju da je TS karakteristika filma kojom se može pratiti tok enzimske reakcije. Optimalna količina dodatog enzima je 25 U/g PI PuOC, a najveće TS (2.09 - 2.12 MPa) se postiže kada je vreme reakcije 20, odnosno 40 min. Dalje povećanje količine enzima ne dovodi do povećanja TS, zbog ograničenog broja reaktivnih glutaminskih grupa dostupnih TGazi.

Slika 59b. pokazuje zavisnost EB od vremena delovanja i količine TGaze. Pri količini enzima od 25 i 40 U/g PI PuOC, promena EB takođe prati tok enzimske reakcije ali statistička analiza rezultata pokazuje da ne postoji značajna zavisnost ($p > 0.05$) vremena delovanja enzima na EB. Pri količini enzima od 10 U/g PI PuOC najpre dolazi do smanjenja EB, ali sa povećanjem vremena delovanja enzima na 60 min, EB se povećava do vrednosti od 54.81%. Najveće EB (76.52%) ima film dobijen delovanjem 25 U/g PI PuOC TGaze, kada je vreme delovanja enzima 40 min.



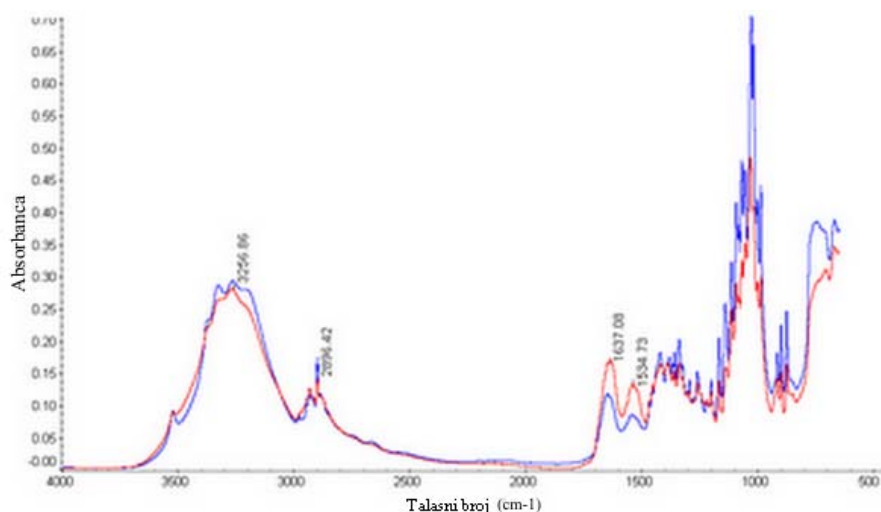
Slika 59. Mehaničke osobine – TS (a) i EB (b), rastvorljivost (c) i sadržaj vlage (d) biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC dobijeni uz prisustvo TG; -▲- 10 U/g PI PuOC, -●- 25 U/g PI PuOC, -■- 40 U/g PI PuOC

Na rastvorljivost PI PuOC biorazgradivih filmova, dobijenih delovanjem TGaze, količina enzima ima značajan uticaj ($p < 0.05$) samo prvih 20 min reakcije (Slika 59c). Sa daljim povećanjem vremena delovanja enzima, rastvorljivost se smanjuje, pri sve tri ispitane koncentracije TGaze, i vreme reakcije nije značajno uticalo ($p > 0.05$) na EB. Uzrok tome može se prepisati izreagovanim aktivnim grupama, u prvih 20 min reakcije, pa dalji tok reakcije nema uticaja na rastvorljivost.

Sadržaj vlage PI PuOC biorazgradivih filmova dobijenih delovanjem različitih količina TGaze, u različitim vremenskim intervalima prikazan je na Slici 59d. Rezultati pokazuju da je sadržaj vlage najveći kod filmova sa 25 U/g PI PuOC, a da sa daljim povećanjem količine enzima dolazi do smanjenja sadržaja vlage. Sa povećanjem vremena delovanja TGaze, takođe, dolazi do smanjenja sadržaja vlage PI PuOC filmova. Tokom produženog delovanja enzima, gušća proteinska mreža je formiranja (veće vrednosti TS), pa je preostali prostor dostupan molekulima vode smanjen, samim tim i sadržaj vlage u filmovima je manji. Najveći

sadržaj vlage (19.59%) ima film pripreman sa 25 U/g PI, kada je vreme delovanja enzima bilo 5 min.

FTIR spektar filmova na bazi PI PuOC, dobijenih delovanjem TGaze prikazan je na *Slici 60*. Interferogrami pokazuju različitu jačinu adsorpcije na talasnom broju 1637 i 1534 cm^{-1} . Film pripreman delovanjem TGaze u periodu od 20 min, jače adsorbuje na pomenutim talasnim brojevima, što može biti posledica razrušavanja određenog broja C=O i C-N veza. Pik na 1000 cm^{-1} je povećan kada je vreme delovanja TGaze 60 min, u odnosu na 20 min, što se može prepisati delovanju enzima, i uspostavljanju novih veza C-O. Poznato je da vibracije C-O veze daju pik u oblasti 950-1200 cm^{-1} (Secundo i Guerrieri, 2005; Choudhari i Kariduraganavar, 2009).



Slika 60. FTIR spektar filmova na bazi proteinskog izolata PuOC, dobijenih u prisustvu 25 U/g PI TGaze; — delovanje enzima 20 min, — delovanje enzima 60 min

Poređenjem mehaničkih osobina (TS i EB) PI PuOC filmova, dobijenih delovanjem TGaze, sa osobinama različitih proteinskih filmova dobijenih delovanjem TGaze, novi filmovi na bazi PI PuOC imaju mehaničke osobine slične filmovima na bazi SPI, PI kikirikija (eng. peanut protein isolate - PPI), WG, itd. (Tang i Jiang, 2007). Filmogeni rastvori SPI, PPI i WG su pripremani na pH=8.0, zagrevani na 70 ili 80 °C i 8 U/g PI PuOC transglutaminaze je dodato, ali enzim nije inaktiviran. TS PI PuOC filmova pripremanih sa 10 U/g PI PuOC je 2.12 MPa, dok je zatezna jačina SPI, PPI i WG filmova 3.6, 1.4 i 1.4 MPa, redom. EB PI PuOC filma sa 10 U/g PI PuOC je 54.81%, dok je EB 105.0, 15.4 i 20.8% za filmove na bazi SPI, PPI i WG (Tang i Jiang, 2007). Kako PI PuOC film pripreman sa 25 U/g PI PuOC ima EB i do 76.52%, može se reći da novi filmovi na bazi PI PuOC imaju mehaničke osobine slične postojećim filmovima na bazi biljnih proteina, a tretiranih enzimom TGaza.

4.2.1.2 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan

Modifikacija biorazgradivih filmova, u cilju poboljšanja njihovih karakteristika i proširenja opsega uslova dobijanja, moguća je i produkcijom kompozitnih filmova protein/polisaharid. Hitozan, poznati filmogeni polisaharid, koji pravi filmove u kiseloj sredini, primenjen je radi pomeranja pH dobijanja filmova na bazi PI PuOC iz alkalne u neutralnu i blago kiselu sredinu, omogućavajući mu potencijalnu primenu omotača u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Kompozitni filmovi PI PuOC/hitozan pripremani su na pH=4.0 - 7.0, dok je odnos PI PuOC i hitozana bio 0:10, 2.5:7.5, 5:5 i 7.5:2.5. Na osnovu uticaja udela glicerola na karakteristike filmova na bazi PI PuOC, odabran je udeo glicerola od 0.4 g/g PI PuOC.

Rezultati prikazani u Tabeli 15. pokazuju da se filmovi mogu formirati, pri svi ispitanim pH, kada je udeo PI PuOC u filmu 25%. Sa povećanjem procenta PI PuOC u kompozitnom filmu na 50 i 75%, film se formirao samo na pH=4.0, ali u slučaju 75% PI PuOC, sa filmom je bilo otežano rukovanje jer se slepljivao. Filmovi na bazi hitozana dobijeni su pri pH=4.0 - 6.0, a u slučaju neutralnog pH, očekivano, film nije formiran jer je došli do precipitacije i geliranja, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Nadarajah, 2005).

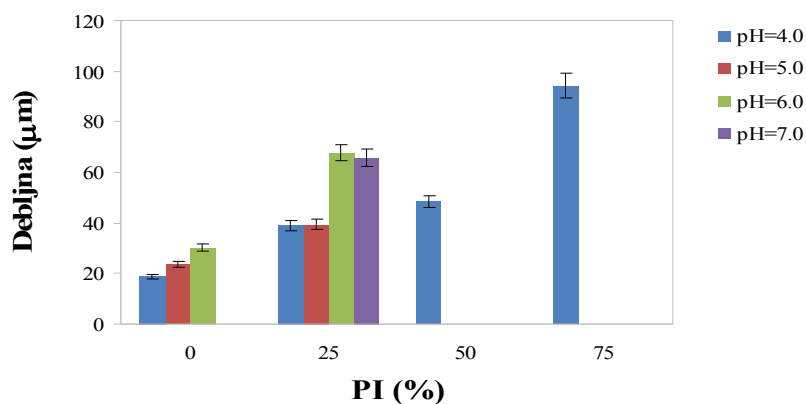
Tabela 15. Uticaj odnosa PI PuOC:hitozan i pH na formiranje kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

pH	Odnos PI PuOC:hitozan			
	0:100	25:75	50:50	75:25
4.0	dobro formiran film	dobro formiran film	dobro formiran film	ne mogućnost rukovanja
5.0	dobro formiran film	dobro formiran film	vlažan	vlažan
6.0	dobro formiran film	dobro formiran film	vlažan	vlažan
7.0	dobro formiran film	dobro formiran film	lepljiv	nije se formirao

Fizičko - mehaničke osobine kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan

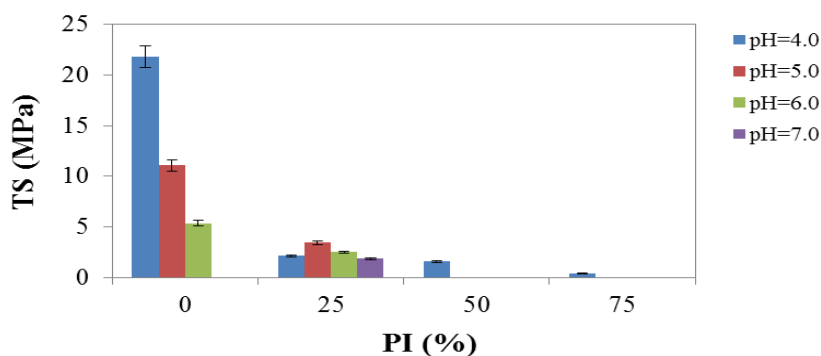
Uticaj udela PI PuOC i pH na debljinu kompozitnog filma PI PuOC/hitozan prikazan je na *Slici 61*. Rezultati pokazuju da sa porastom udela PI PuOC, raste debljina kompozitnog filma. Filmovi na bazi hitozana imaju znatno niže vrednosti debljine (<30 μm), u poređenju sa filmovima na bazi PI PuOC i nešto niže u odnosu na kompozitne filmove PI PuOC/hitozan. Sa porastom pH, debljina filmova se povećava, što se može objasniti pojavom da sa porastom

pH dolazi do slabijeg rastvaranja i do geliranja hitozana i u takvom stanju prelaska u film, a pri pH udaljenijim od IET proteina tikve goliće, sami proteini se u većoj meri rastvaraju. Najveću debljinu ($94.29 \mu\text{m}$) ima film pripreman na $\text{pH}=4.0$, koji sadrži 75% PI PuOC.



Slika 61. Uticaj pH i udela PI PuOC na debljinu kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

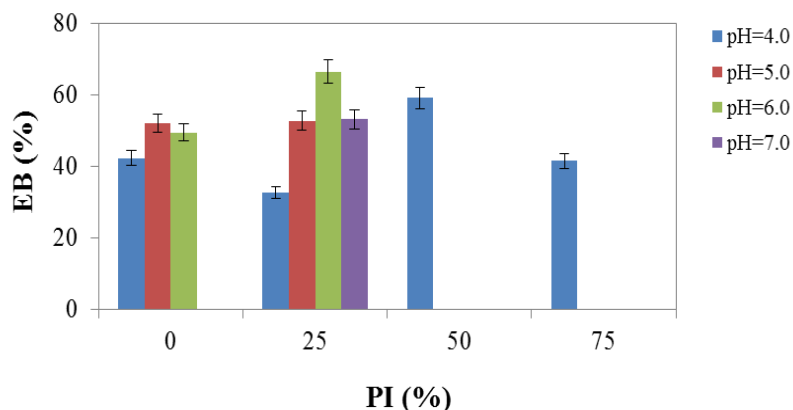
Slika 62. pokazuje uticaj sastava kompozitnog filma PI PuOC/hitozan i pH na TS dobijenih filmova. Sa porastom udela PI PuOC u filmu, dolazi do smanjenja TS, u poređenju sa vrednostima TS hitozanskog filma. Ipak, u poređenju sa TS filmova na bazi PI PuOC ($\text{TS}=1.54$ i 2.54 MPa), pripremanim na $\text{pH}=9.0$ i 10.0 , koji su pripremani pod najsličnijim uslovima sredine, novi kompozitni filmovi sa 25% PI PuOC imaju veće vrednosti TS ($\text{TS}=1.89 - 3.46 \text{ MPa}$). Literaturni podaci pokazuju da kompozitni film PI PuOC/hitozan sa najvećom vrednošću TS (3.46 MPa) ima manju TS od filmova na bazi kinoa protein/hitozan (8.3 MPa) (Abugoch *i sar.*, 2011), Gliadin/hitozan (8.46 MPa) (Li *i sar.*, 2010), i film na bazi WP/hitozan (45 MPa) (Ferreira *i sar.*, 2009).



Slika 62. Uticaj pH i udela PI PuOC na TS kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

Na *Slici 63.* prikazan je uticaj pH i udela PI PuOC na EB kompozitnog filma PI PuOC/hitozan. Dobijeni kompozitni filmovi imaju veće EB ($50 \pm 20\%$) od hitozanskog filma ($45 \pm 2\%$), a najveću vrednost EB ima filma sa 25% PI PuOC, pripreman na $\text{pH}=6.0$. Poredeći

sve kompozitne filmove dobijene na pH=4.0, najveću vrednost EB ima filma sa jednakim udelom PI PuOC i hitozana.

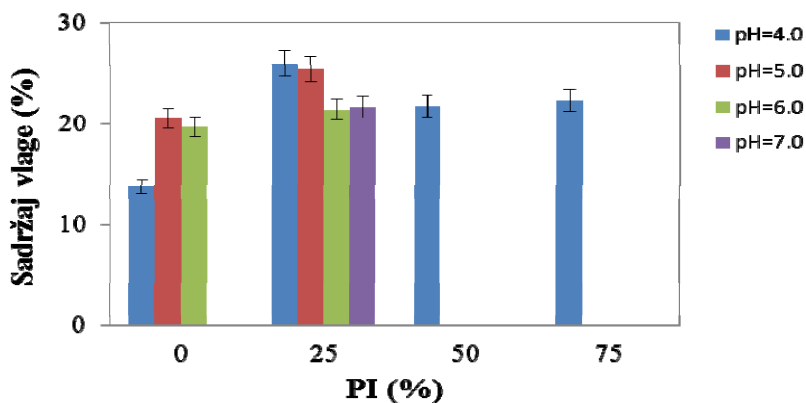


Slika 63. Uticaj pH i udela PI PuOC na EB kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

Kompozitni filmovi PI PuOC/Hitozan imaju niže vrednosti EB u poređenju sa drugim filmovima protein/hitozan. Rezultati Abugoch *i sar.* (2011) pokazuju da filmovi na bazi kinoa protein/hitozan imaju EB reda veličine 73 do 273 %, u zavisnosti od odnosa protein/hitozan. Filmovi na bazi gliandina i hitozana (Li *i sar.*, 2010) imaju EB=91 - 177%, dok kompozitni filmovi na bazi WPI/hitozan (Ferreira *i sar.*, 2009) imaju vrednosti EB od 5 do 35%, što je niže ali najbližije vrednostima EB kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan.

Sadržaj vlage kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan

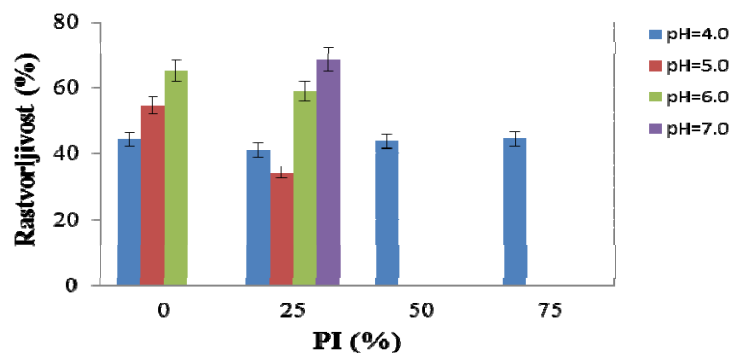
Slika 64. pokazuje srednje vrednosti sadržaja vlage kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan. Svi dobijeni kompozitni filmovi imaju sadržaj vlage između 21 i 26%, s tim da količina vlage u filmu opada sa porastom pH. Suprotno tome, kod filmova na bazi 100% hitozana, sadržaj vlage raste sa porastom pH, i dalje ovi filmovi imaju niži sadržaj vlage (14 - 21%), u poređenju sa kompozitnim.



Slika 64. Uticaj pH i udela PI PuOC na sadržaj vlage kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

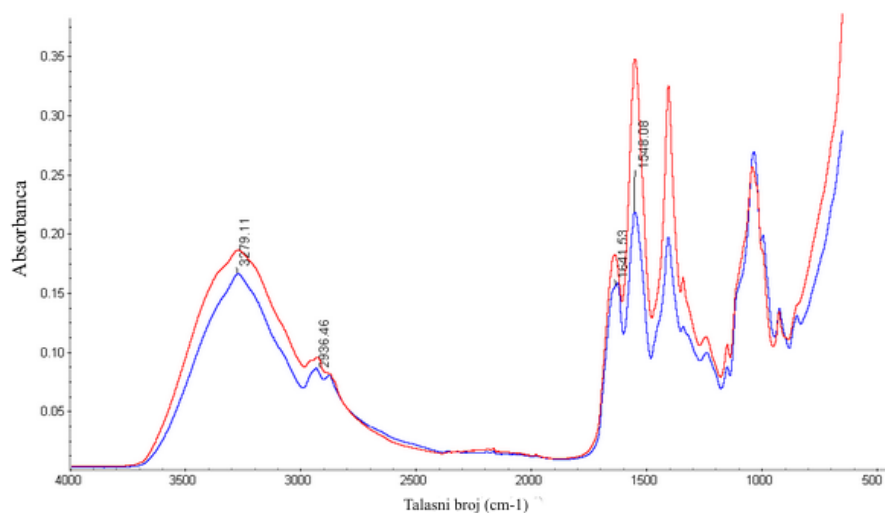
Ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova proteinski izolat uljane/hitozan

Ukupna rastvorljivost kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan prikazana je na *Slici 65*. Rezultati pokazuju da udeo PI PuOC nema značajnog uticaja ($p > 0.05$) na rastvorljivost filmova, a da pri konstantnom udelu proteinskog izolata u filmu, rastvorljivost raste sa porastom pH. Najveću rastvorljivost ima film sa 25% PI PuOC, pripreman na pH=7.0, što može biti posledica slabije formiranog matriksa filma, jer se hitozan i PI slabije rastvaraju pri neutralnim pH.



Slika 65. Uticaj pH i udela PI PuOC na ukupnu rastvorljivost kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

Strukturna analiza kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan



Slika 66. FTIR spektar kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan; — film pripreman na pH=4.0, — film pripreman na pH=6.0

Slika 66. prikazuje FTIR spektre kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, pripremanih na pH=4.0 i 6.0. Karakteristični pikovi na 3279.11 cm^{-1} (potiču od istezanja -OH i -NH veze), 2936.46 cm^{-1} (potiče od istezanja -CH veze), 1548.08 cm^{-1} (potiče od istezanja -NH veze, karakteristika regije Amid II), ukazuju na jaču adsorpciju veza filma dobijenog na pH=4.0. Pojačana adsorpcija može biti posledica većeg broja formiranih veza u filmu, pripremanom na pH koji pogoduje boljem rastvaranju hitozana. Naime, hitozan se rastvara u kiseloj sredini, dok u neutralnoj precipituje i gelira (Nadarajah, 2005). To ima za posledicu manji broj formiranih veza u filmu, pri neutralnim pH, manji stepen adsorpcije IR zraka, kao i veće EB i veću rastvorljivost filmova dobijenih na pH=6.0 (rezultati prikazani ranije). Kao dokaz umreženosti je i pojava nove adsorpcione trake na 1647 cm^{-1} , koja potiču od vibracije istezanja C-N veze (formirane amidne veze) (Su *i sar.*, 2010), a koja ima veću površinu kod filma dobijenog na pH=4.0.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom poglavlju, može se zaključiti da PI PuOC u prisustvu hitozana formira biorazgradive filmove na pH bliskom IET, ali da je neophodan udeo hitozana od 75%. Takođe, treba istaći da dobijeni filmovi imaju lošije karakteristike od drugih kompozitnih filmova na bazi proteina i hitozana, i lošije karakteristike od filmova na bazi PI PuOC pripremanih u ekstremno kiselim i bazinim uslovima. Ipak, dobijeni filmovi imaju pH sličan pH hrane, pa je njihova potencijalna primena moguća, uz dodatnu optimizaciju uslova dobijanja radi poboljšanja karakteristika.

4.2.1.3 Dobijanje i karakterizacija kompozitnih filmova proteinski izolat uljane tikve/hitozan sa transglutaminazom

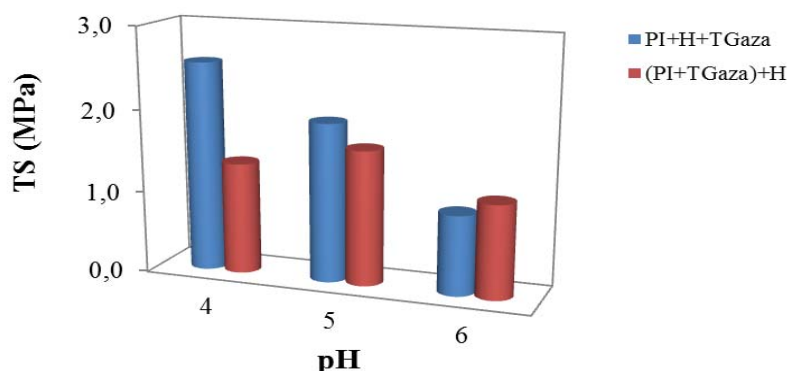
U cilju daljeg poboljšanja karakteristika biorazgradivog filma na bazi PI PuOC, dobijanje kompozitnog filma PI PuOC/hitozan izvedeno je u prisustvu TGaze, radi boljeg umrežavanja matriksa filma, a time i poboljšanja njegovih karakteristika. Cross-linking proteina i polisaharida izveden je na pH=4.0 - 7.0, a na osnovu prethodnih rezultata, filmogeni rastvori su mešani u odnosu 1:3 (PI PuOC:hitozan), odnosno, konačna filmogena smeša sadrži 25% rastvora PI PuOC. Na osnovu rezultata istraživanja dobijanja biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC sa TGazom, enzim je dodat u količini 25 U/g PI.

Dva različita pristupa enzimske reakcije umrežavanja proteina i polisaharida, tokom dobijanja filma, su primenjena: (i) PI+hitozan+TGaza – rastvori polimera su pomešani, pa je smeši dodat enzim; (ii) (PI+TGaze)+hitozan – prvo je urađeno umrežavanje proteina, a zatim je dodat hitozan.

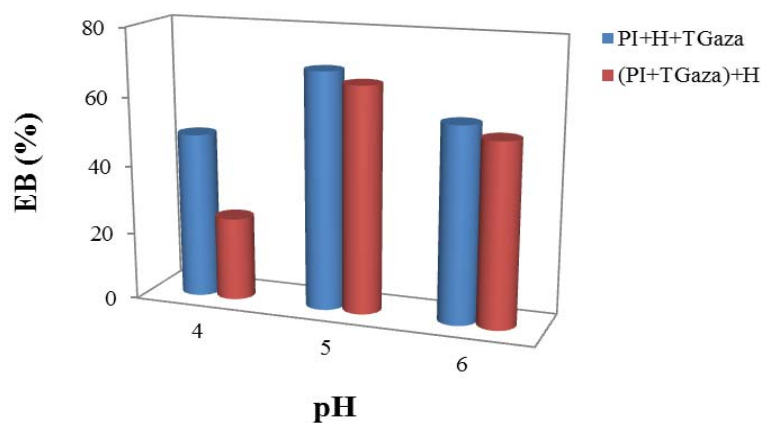
Pod datim eksperimentalnim uslovima PI PuOC i hitozan su obrazovali kompozitne filmove koji sadrže 25% PI PuOC na pH=4.0 - 6.0. Na pH=7.0, filmogeni rastvor je ostao u tečnom stanju. Srednja vrednost debljine filma je porasla sa $50 \pm 10 \mu\text{m}$ (kompozitni film PI PuOC/hitozan bez TGaze) na $95 \pm 25 \mu\text{m}$, nakon umrežavanja u prisustvu TGaze.

Slike 67 i 68. pokazuje uticaj pH i postupka umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na mehaničke osobine kompozitnog filma PI PuOC/hitozan. Film pripreman na pH=4.0, dodavanjem TGaze smeši polimernih rastvora, ima najveću TS (2.56 MPa) u poređenju sa ostalim dobijenim filmovima. U istraživanjima Di Pierro *i sar.* (2006) umrežavanje hitozana i ovalbunima je izvedeno pri pH=4.6, jer TGaza pokazuje najveću aktivnost na pH=4.0 - 5.0. Najveća TS kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, pripremanih na pH=4.0, može biti posledica boljeg rastvaranja hitozana, u odnosu na pH=5.0 i 6.0, što dalje vodi ka intenzivnijem formiranju nekovalentnih intermolekularnih interakcija između molekula proteina i polisaharidnih lanaca. Povećana aktivnost TGaze na pH=4.0 promovise intermolekularno povezivanje glutaminskih i lizinskih grupa molekula proteina. Suprotno, najveću vrednost EB (69.26%) ima filma pripreman na pH=5.0, kada je TGaza dodata smeši filmogenih rastvora.

Značajna razlika ($p < 0.05$) uticaja načina pripreme filma na TS i EB zapaža se kod filma pripremanog na pH=4.0. Kod filmova pripremanih na pH=5.0 i 6.0, način pripreme nema značajan uticaj ($p > 0.05$) na ispitane mehaničke osobine kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan.

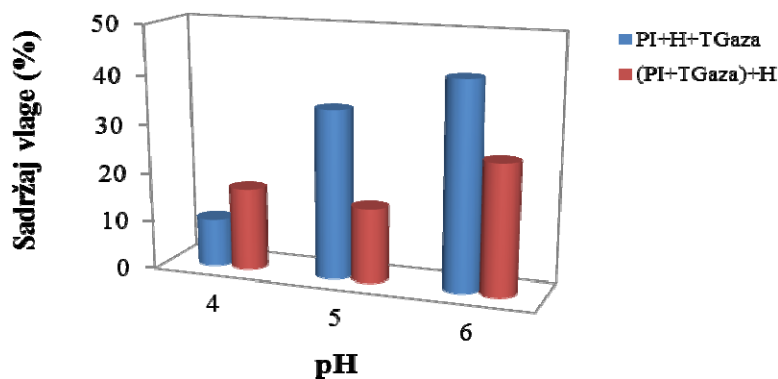


Slika 67. Uticaj pH i načina umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na TS kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan



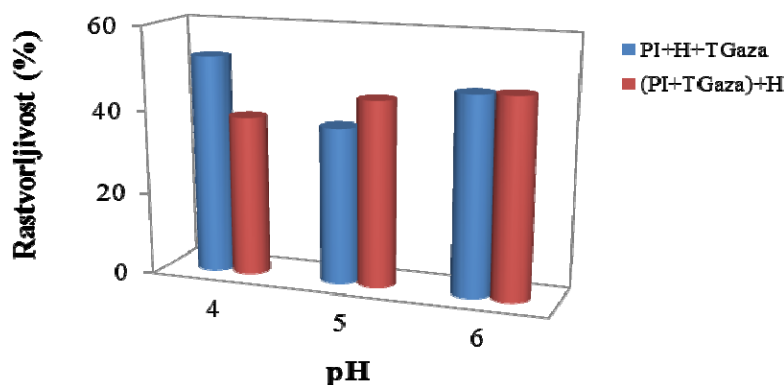
Slika 68. Uticaj pH i načina umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na EB kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

Slika 69. pokazuje uticaj pH i postupka umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na sadržaj vlage kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan. Porastom pH filmogenih rastvora došlo je do povećanja sadržaja vlage, što može biti posledica manje gustine filma formiranog na većem pH, zbog slabijeg rastvaranja i geliranja hitozana. Značajniji rast sadržaja vlage, se porastom pH uočen je kod filmova formiranih postupkom dodatka TGaze smeši filmogenih rastvora. Najveći sadržaj vlage (42.04%) ima film pripreman na pH=6.0, a najmanji (9.82%) film na pH=4.0, kada je TGaza dodata smeši polimernih rastvora.



Slika 69. Uticaj pH i načina umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na sadržaj vlage kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

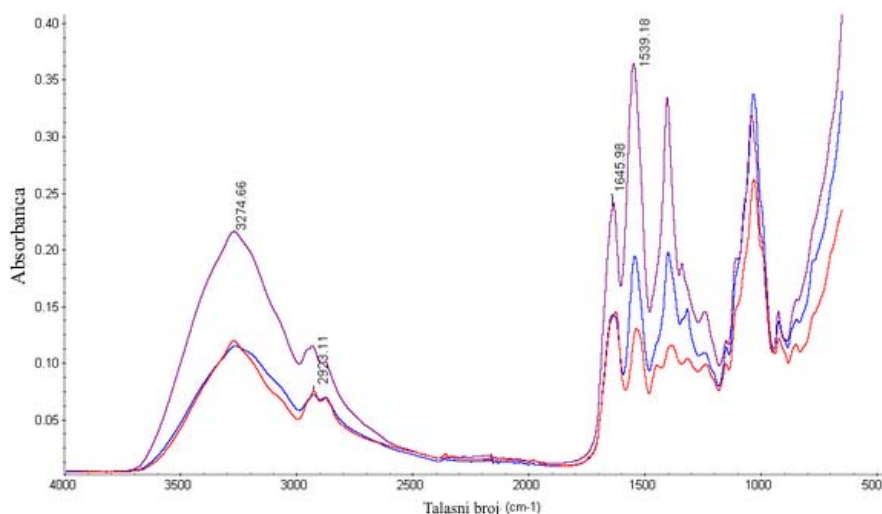
Rastvorljivost kompozitnog filma PI PuOC/hitozan, dobijenog u prisustvu TGaze, prikazana je na *Slici 70*. Rezultati pokazuju da pH nema značajnog uticaja ($p > 0.05$) na rastvorljivost dobijenih filmova. Srednja vrednost rastvorljivosti kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan je $43 \pm 3\%$. Prisustvo TGaze nije značajno uticalo ($p > 0.05$) na rastvorljivost ispitanih uzoraka, sem kod filma pripremanog na $\text{pH}=4.0$. Rastvorljivost ovog filma se smanjila sa 52.47 na 38.34%, kada je umesto umrežavanja proteina i polisaharida TGazom, najpre umrežen proteina, a hitozan naknadno dodat.



Slika 70. Uticaj pH i načina umrežavanja proteina i polisaharida, u prisustvu TGaze, na rastvorljivost kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan

Strukturalna analiza FTIR-om kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, dobijenih u prisustvu TGaze, pokazuje najveće adsorbancije, na karakterističnim talasnim brojevima: 3279.11 cm^{-1} , 2936.46 cm^{-1} i 1548.08 cm^{-1} (koje potiču od istezanja -OH i -NH -CH i -NH veze, redom), filmova pripremanih na $\text{pH}=6.0$, gde je i najveća aktivnost TGaze (*Slika 71*). Iako filmovi dobijeni na $\text{pH}=6.0$, prema intrefrogramu, imaju najveći broj veza koje

adsorbuju na karakterističnim talasnim brojevima, ipak, ovi filmovi nemaju najveću TS, što može biti posledica prisustva hitozana, koji se slabije rastvara a više gelira na pH=6.0.



Slika 71. FTIR spektar kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan pripremanih u prisustvu TGaze; enzim dodat smeši filmogenih rastvora; — film pripreman na pH=4.0, — film pripreman na pH=5.0, — film pripreman na pH=6.0

Umrežavanje kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, u prisustvu TGaze, neznatno je uticalo na osobine kompozitnih filmova, u poređenju sa filmovima pripremanim bez prisustva TGaze. Umrežavanje uz TGazu nije značajno povećalo EB filmova pripremanih na pH=4.0 i 5.0, kada je enzim dodat filmogenoj smeši. Sadržaj vlage filmova na pH=5.0, pripremanih umrežavanje polimera u prisustvu TGaze i filmova na pH=6.0, pripremanim na oba ispitana načina povećan je u odnosu na filmove dobijene bez cross-linkinga TGazom. Može se zaključiti da umrežavanje PI PuOC i hitozana enzimom TGaza, u cilju poboljšanja osobina kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan nije dalo rezultate, očekivane na osnovu literaturnih podataka o efikasnosti primene TGaze u postupku dobijanja biorazgradivih filmova (Di Piero *i sar.*, 2006, 2007).

5. Zaključak

U ovoj disertaciji prikazano je dobijanja novih biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Specifičnost novih biorazgradivih filmova je u primeni PuOC i Pi PuOC, kao sirovine za njihovo dobijanje. U istraživanjima usmerenim ka formiranim filmovima, ispitana su fizičko-mehanička, barijerna, biološka i sustrukturna svojstva dobijenih filmova. Na osnovu izvršenih istraživanja, obrađenih i prodiskutovanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. PuOC se uspešno može primeniti kao delimična zamena želatina, poznatog filmogenog proteina, za dobijanje biorazgradivih filmova. U postupku dobijanja biorazgradivih kompozitnih filmova želatin/PuOC, dobijeni su filmovi obojeni žuto-zelenom bojom, čvrsti ali dovoljno fleksibilni da se sa njima može lako rukovati. U poređenju sa karakteristikama želatinskih filmova, dobijenih pod istim eksperimentalnim uslovima, novi kompozitni filmovi imaju poboljšane osobine. Filmovi sa 40 i 60% PuOC, sa 0.15 i 0.2 g glicerola/g biopolimera, pokazuju najveće vrednosti TS (≥ 200 MPa). Svi dobijeni kompozitni filmovi imaju veće vrednosti EB od želatinskih filmova, sa istim udelom glicerola, dok su ukupna rastvorljivost, količina rastvorljivih proteina i sposobnost bubrenja slični vrednostima dobijenim za biorazgradive filmove na bazi želatina. Kompozitni filmovi sa 10 - 15% želatina i 85 - 90% PuOC pokazuju antioksidantnu aktivnost do 25%, za razliku od želatinskih filmova, čija je sposobnost hvatanja DPPH• radikala $\approx 17\%$.
2. U postupku valorizacije, istraživanja usmerena ka dobijanju novih kompozitnih filmova na bazi PuOC, obuhvatila su evaluaciju mogućnosti dobijanja biorazgradivih filmova, uz dodatak PEG i glicerola, kao plasticizera. PEG se pokazao kao nekompatibilan sa makromolekulima PuOC i filmovi nisu formirani. Suprotno tome, u prisustvu glicerola, PuOC pokazuje filmogena svojstva, a filmovi sa najboljim karakteristikama su formirani kada je udeo glicerola bio 0.25 g/g PuOC. Pored mehaničko-fizičkih, hemijskih i barijernih karakteristika filmova, ispitane su i strukturne, SEM i DSC metodom.

Praćen je simulatni uticaj pH i udela glicerola, kao i pH i temperature zagrevanja filmogenog rastvora PuOC. Rezultati pokazuju na značajan uticaj ($p < 0.05$) procesnih parametara, ali i neophodnost njihove paralenle kontrole i regulacije. PuOC ima filmogena svojstava samo u alkalnoj sredini, a sa porastom temperature pripreme filma, većina ispitanih osobina se poboljšala.

3. Ispitana je mogućnost dobijanja biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC. Praćen je uticaj pH i udele glicerola na dobijanje i karakteristike dobijenih filmova. Primenjeni udeo glicerola je 0.3 - 0.6 g/g PI PuOC, dok je pH bio u opsegu pH=2.0 - 12.0. Rezultati pokazuju da PI PuOC ima sposobnost formiranja filmova u širokom opsegu pH, izuzev pri pH=4.0 - 8.0, a pri udelu glicerola od 0.4 i 0.5 g/g PI PuOC. Dobijeni filmovi su transparentni, čvrsti ali dovoljno fleksibilni za jednostavno rukovanje. Praćenjem uticaja pH i udeo glicerola, ustanovljeno je da ispitani parametri značajno ($p < 0.05$) utiču na mehaničke karakteristike filma (TS i EB) i na rastvorljivost. Udeo glicerola nema značajan uticaj ($p > 0.05$) na sadržaj vlage i antioksidantnu aktivnost. Filmovi sa 0.4 g glicerola/g PI PuOC pokazuju odlična barijerna svojstva (nisku propustljivost gasova) u poređenju sa komercijalnim sintetičkim filmovima. Strukturne karakteristike biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC određene su FTIR metodom.
4. U cilju unapređenja barijernih i mehaničkih osobina biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC, kao i proširenja mogućnosti primene, izvršena je modifikacija proteinske strukture umrežavanjem u prisustvu enzima TGaze i interakcijom molekula proteina sa hitozanom, poznatim filmogenim makromolekulom, sa i bez TGaze. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da PI PuOC u prisustvu hitozana formira biorazgradive filmove na pH bliskom IET, ali da je neophodan udeo hitozana od 75%. Takođe, treba istaći da dobijeni filmovi imaju lošije karakteristike od drugih kompozitnih filmova na bazi proteina i hitozana, i lošije karakteristike od filmova na bazi PI PuOC pripremanih u ekstremno kiselim i bazinim uslovima. Ipak, dobijeni filmovi imaju pH sličan pH hrane, pa je njihova potencijalna primena moguća, uz dodatnu optimizaciju uslova dobijanja radi poboljšanja karakteristika. Umrežavanje kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan, u prisustvu TGaze, neznatno je uticalo na osobine kompozitnih filmova, u poređenju sa filmovima pripremanim bez prisustva TGaze. Uticaj TGaze na strukturne karakteristike biorazgradivih filmova na bazi PI PuOC, PI PuOC/hitozan, sa i bez TGaze određen je snimanjem IR spektara filmova FTIR tehnikom. Umrežavanje sa TGazu nije značajno povećalo EB filmova, pripremanih na pH=4.0 i 5.0, kada je enzim dodat filmogenoj smeši. Sadržaj vlage filmova na pH=5.0, pripreman umrežavanjem polimera u prisustvu TGaze i filmova na pH=6.0, pripremanim na oba ispitana načina povećan je u odnosu na filmove dobijene bez cross-linkiga TGazom. Može se zaključiti da umrežavanje proteina uljane tikve golice i hitozana enzimom TGaza, u cilju poboljšanja osobina kompozitnih filmova PI PuOC/hitozan nije dalo očekivane rezultate.

Na osnovu rezultata ovih istraživanja, pokazano je da se uspešno mogu dobiti biorazgradivi kompozitni filmovi na bazi PuOC i njenog PI, bez i u prisustva agenasa za umrežavanje i drugih filmogenih supstanci. Ova istraživanja predstavljaju osnovu za dalji razvoj i unapređenje biorazgradivih filmova sa velikim aplikacionim potencijalom, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao doprinos valorizaciji nuzproizvoda agroindustrije, smanjenju eksploatacije neobnovljivih sredina i očuvanju životne sredine.

6. Literatura

1. Abugoch, L.E., Tapia, C., Villmán, M.C., Yazdani-Pedram, M., Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25, 879-886.
2. Achet, D., He, X.W. (1995). Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer*, 36, 787–791.
3. Aguilera, G.M., Stanley, D.W. (1999). *Microstructural Principals of Food Processing and Engineering*, 2nd ed.; Aspen Publishers: Gaithersburg, MD, p 131.
4. Alcantara, C.R., Rumsey, T.R., Krochta, J.M. (1998). Drying rate effect on the properties of whey protein films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21, 387–405.
5. Al-Hassan, A.A., Norziah M.H. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26 (1), 108-117.
6. Akbari, Z., Ghomashchi, T., Moghadam, S. (2007). Improvement in food packaging industry with biobased nanocomponents. *International Journal of Food Engineering*, 3 (4), p. 1120, Article 3.
7. Andres, C. (1984). Natural edible coating has excellent moisture and grease barrier properties. *Food Processing*, 45 (13), 48-49.
8. Anker, M. (1996). Edible and biodegradable films and coatings for food packaging literature review. Ski-Report. No: 623: Goteberg, Sweden.
9. Anker, M. (2000). Edible and biodegradable whey protein films as barriers in foods and food packaging. PhD Thesis. University dissertation from Chalmers University of Technology.
10. Anker, M., Stading, M., Hermansson, A.M. (1998). Mechanical properties, water vapor permeability, and moisture contents of α -lactoglobulin and whey protein films using multivariate analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 1820-1829.
11. Anker, M., Berntsen, J., Hermansson, A.M., Stading, M. (2002). Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 81–92.
12. Anonymous. (1993). Biodegradable polymers forge ahead. *BioCycle*, 34 (9), 72-74.
13. ASAE, 1995. Moisture relationship of plant-based agricultural products: ASAE Standard D245.5. St. Joseph, Michigan.

14. Aschaffenburg, R., Drewry, J. (1957). Genetics of the β -Lactoglobulins of cow milk. *Nature* (London) 180, 376-8.
15. ASTM (2001) Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM standards. Designation D882-01. Philadelphia: ASTM, American Society for Testing Materials.
16. Attenburrow, G., Barnes, D.J., Davies, A.P., Ingman, S.J. (1990). Rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 12, 14-31.
17. Audic, J.L., Chaufer, B., Daufin, G. (2003). Non-food application of milk components and dairy co-products: A review. *Lair*, 83, 417-438,
18. Audic, J.L., Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41, 1934–1942.
19. Bamdad, F., Goli, A.H., Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*) Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39, 106–111.
20. Banerjee, R., Chen, H., Wu, J. (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*, 61 (4), 824–828.
21. Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767 (9), 1073-101.
22. Barreto, P.L.M., Pires, A.T.N., Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79, 147–152.
23. Bastioli, C., Aaron, L., Brody, A.L., Marsh, K.S. (1997). The Wiley encyclopedia of packaging technology, (2nd ed.), John Wiley & Sons, pp. 77–83.
24. Beng, G.T., Tze, L.M., Easa, A.M. (2009). Using soy protein isolate/glucose edible films to protect fish oil from lipid oxidation. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2 (3), 342-350.
25. Bertan, L.C., Tanada-Palmua, P.S, Sianib, A.C., Grosso, C.R.F. (2005). Effect of fatty acidics and "Brazilian elemi" on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19, 73-82.
26. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22 (8), 763–768.

27. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K. (2002). Stabilization of gelatin films by cross-linking with genipin. *Biomaterials*, 23 (24), 4827–4832.
28. Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini, K. (2004). Relationship between triplehelix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675–5680.
29. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2011). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110, 208–213.
30. Bourtoom, T., Chinnan, M.S., Jantawat, P., Sanguandeeikulm R. (2006). Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *LWT -Food Science and Technology*, 39, 05–418.
31. Bourtoom, T. (2008). Review Article, Edible films and coating: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15, 237-248.
32. Bourtoom, T. (2009). Review Article, Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16, 1-9.
33. Bonwell, E.S., Wetzel, D.L. (2009). Innovative FT-IR imaging of protein film secondary structure before and after heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10067–10072.
34. Brault, D., Daprano, G., Lacroix, M. (1997). Formation off re-standing sterilised edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2664-2969.
35. Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309.
36. Briston, J.H. (1988). *Plastic films* (3rd ed.). New York: Wiley.
37. Cao, N., Fu, Y., He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1153–1162.
38. Cao, N., Yang, X., Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23, 729–735.
39. Cerqueira, M.A., Lima, Á.M., Bartolomeu, W.S.S., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Vicente, A.A. (2009). Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1456-1462.
40. Cha, D.S., Chinnan, M.S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 44, 223–237.
41. Chambi, H., Grosso, C. (2006). Edible film produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 36, 458-466.

42. Chang BS , Randall CS (1992). Use of subambient thermal analysis of optimize protein lyophilization. *Cryobiology*, 29, 632 – 656.
43. Chang, Y.P., Cheah, P.B., Seow, C.C. (2000). Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. *Journal of Food Science*, 65 (2), 1-7.
44. Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*; Fennema, O.R., Ed.; Dekker: New York.
45. Chen, Y., Tan, H.M. (2006). Crosslinked carboxymethylchitosan-g-poly (acrylic acid) copolymer as a novel superabsorbent polymer. *Carbohydrate Research*, 341, 887–896.
46. Chen, P., Zhang, L. (2006). Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules*, 7, 1700–1706.
47. Chinabhark, K. (2005). Effect of pH, lipids and protein cross linkers on the properties of surimi film from tropical fish. (M.Sc. thesis) Pri nce of Songkla University.
48. Chirife, J., Inglesias, H.A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part 1 – A review. *Journal of Food Technology*, 13, 159–174.
49. Cho, S.Y., Rhee, C. (2004). Mechanical properties and water vapour permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 833–839.
50. Cho, Y., Song, K.B. (2000). Effect of g-irradiation on the molecular properties of BSA and b-lactoglobulin. *Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 33, 133-137.
51. Choi, W.S., Han, J.H. (2001). Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. *Journal of Food Science*, 66, 319–322.
52. Choudhari, S.K., Kariduraganavar, M.Y. (2009). Development of novel composite membranes using quaternized chitosan and Na⁺-MMT clay for the pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338, 111–120.
53. Chowdhury, T., Das, M. (2010). Moisture sorption isotherm and isosteric heat of sorption characteristics of starch based edible films containing antimicrobial preservative. *International Food Research Journal*, 17, 601-614.
54. Chung, D.S., Pfof, H.B. (1967). Adsorption and desorption of water vapour by cereal grains and their products. Part II: development of the general isotherm equation. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 10, 552–555.
55. Cieśla, K., Salmieri, S., Lacroix, M. (2006). Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (6), 908-914.

56. Claudy, P., Jabrane, S., Letoffé, J.M. (1997). Annealing of a glycerol glass: enthalpy, fictive temperature and glass transition temperature change with annealing parameters. *Thermochimica Acta*, 293, 1–11.
57. Colla, E., do Amaral Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2006). *Amaranthus cruentus* flour edible films: Influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring Speed on water vapor permeability and mechanical properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 6645-6653.
58. Coupland, J.N., Shaw, N.B., Monahan, F.J., O'Riordan, E.D., O'Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43 (1), 25-30.
59. Cuppett, S.L. (1994). Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonists. in *Edible Films and Coatings to Improve Food Quality*, eds., J.M. Krochta, E.A. Baldwin and M. Nisperos-Carriedo, Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., Inc., pp. 121–137.
60. Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J.L., Guilbert, S. (1995). Edible packaging filma based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, 60, 1369-1374.
61. Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75, 1–9.
62. Danganan, K., Tomasula, P.M., Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In *Edible films and coatings for food applications*, Ed. Embuscado & Huber, Springer Science+Business Media, LLC 2009.
63. Dean, K., Yu, L. (2005). *Biodegradable polymers for industrial application*. CRC Press, Boca Raton, 289-309.
64. Debeaufort, F., Voilley, A. (1994). Aroma compound and water vapor permeability of edible films and polymeric packagings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42 (12), 2871–2875.
65. 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.
66. De Jong , G.A.H., Koppelman, S.J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food application. *Journal fo Food Science*, 67 (8), 2798-2806.
67. Dias, A.B., Müller, C.M.O., Larotonda, F.D.S., Laurindo, J.B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51 (2), 213–19.

68. Dias, A.B., Müller, C.M.O., Larotonda, F.D.S., Laurindo, J.B. (2011). Mechanical and barrier properties of composite films based on rice flour and cellulose fibers. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (2), 535-542.
69. Di Gioia, L., Guilbert, S. (1999). Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1254-1261.
70. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A.E., Masi, P., Porta, R. (2006). Chitosan-whey protein edible film produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7, 744-749.
71. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Masi, P., Porta, R. (2007). Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin films. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (3), 437-441.
72. Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2324-2327.
73. DIN 53380 (1969). Prüfung Kunststoffolien, Elastomerfolien, Bestimmung der Gasdurchlässigkeit.
74. Eastoe, J.E., Leach, A.A. (1977). The science and technology of gelatin. Academic Press, Inc., New York, 73-107.
75. Elizondo N.J., Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., (2009). Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers*, 75, 592–598.
76. Ellepola, S.W., Ma, C.-Y. (2006). Thermal properties of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds. *Food research international*, 39, 257–264.
77. Emmambux, N.M., Minnaar, A. (2003). The effect of edible coatings and polymeric packaging films on the quality of minimally processed carrots. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1065-1071.
78. Embuscado, M.E., Huber, K.C. (2009). Edible films and coatings for food applications, Ed. Embuscado & Huber, Springer Science+Business Media, LLC 2009.
79. Etzel, M.R. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *Journal of Nutrition*, 134 (4), 996S-1002S.

80. Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85 (3), 393–400.
81. Fennema, O.R. (2007). Food Chemistry (4rd ed.), Ed. Srinivasan Damodaran, Kirk L. Parkin and Owen R. Fennema. Marcel Dekker, Inc, New York.
82. Ferreira, C.O., Nunes, C.A., Delgadillo, I., Lopes-da-Silva, J.A. (2009). Characterization of chitosan-whey films at acid pH. *Food Research International*, 42, 807-813.
83. Filali-Mouhim, A., Audette, M., St-Louis, M., Thauvette, L., Denoroy, L., Penin, F., Chen, X., Rouleau, N., Le, C.J., Rossier, J., Potier, M., Le, M.M. (1997). Lysozyme fragmentation induced by γ -radiolysis. *International Journal of Radiation Biology*, 72, 63-70.
84. Finch, C.A. (1983). Chemistry and technology of water-soluble polymers. C.A. Finch, ed., New York: Plenum Press, Chap. 5, 81-112.
85. Flieger, M., Kantorová, M., Prell, A., Řezanka, T., Votruba, J. (2003). Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica* (Prague, Czech Republic), 48 (1), 27-44.
86. Freeman, B.D., Dhoot, S.N., Stewart, M.E. (2002). Barrier Polymers, in Encyclopedia of Polymer Science and Technology. John Wiley & Sons, Inc.
87. Galdeano, M.C., Mali, S., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F., García, M.A. (2009). Effect of plasticizer on properties of oat starch films. *Materials Science and Engineering:C*, 29, 532–8.
88. Gallagher, W. (2009). FTIR analysis of protein structure. http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf.
89. Gällstedt, M. (2004). Films and composites based on chitosan, wheat gluten or whey proteins - their packaging related mechanical and barrier properties. PhD Thesis. KTH, Superseded Departments, Fibre and Polymer Technology. Stockholm, Sweden.
90. Galiotta, G., di Gioia, L., Guilbert, S., Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and cross-linking agents. *Journal of Dairy Science*, 81, 3123-3130.
91. Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal*, 19 (5), 375-398.
92. Garrison, W.M. (1987). Reaction mechanism in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chemical review*, 87, 381-398.

93. Gennadios, A. (2002). Protein-based films and coatings. In: Protein-based films and coatings. CRC Press, Florida, USA.
94. Gennadios, A., Weller, C.L. (1990). Edible films and coating from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44, 63-69.
95. Gennadios, A., Weller, C.L. (1994). Moisture adsorption by grain protein films. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 37, 353–359.
96. Gerrard, J.A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications, *Trends in Food Science & Technology* 13, 391–399.
97. Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R. (2008a). Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 209–215.
98. Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R. (2008b). 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.
99. Giancone, T. (2006). Hydrocolloid-based edible films: composition-structure properties relationship. PhD Thesis, University of Naples-Federico II.
100. Gill, A.O. (2000). Application of lysozyme and nisin to control bacterial growth on cured meat products. M.S. thesis, The University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.
101. Gillgren, T., Stading, M. (2008). Mechanical and barrier properties of avenin, kafirin, and zein films. *Food Biophysics*, 3, 287–294.
102. Gilmer, J.W., Barbee, R.B., Lan, T., Matayabas, Jr.J.Ch., (2002). Polymer/clay nanocomposite having improved gas barrier comprising a clay material with a mixture of two or more organic cations and a process for preparing same, *US patent*: 6486253.
103. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C., Montero, M.P. (2009). Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatine films by the addition of hydrolysates from squid gelatine. *Food Hydrocolloids*, 23, 1322-1327.
104. Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105, 511–520.
105. Gómez-Estaca, J., Bravo L., Gómez-Guillén, M.C., Alemán, A., Montero, P. (2009a). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatine films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112, 18-25.

106. Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2009b). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92 (1), 78-85.
107. Gómez-Guillén, M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). *Food Hydrocolloids*, 21 (7), 1133-1143.
108. Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58, 206-211.
109. Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.L., Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.
110. Gontard, N., Ring, S. (1996). Edible wheat gluten film: Influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3474-3478.
111. Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., Guilbert, S. (1996). Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1064-1069.
112. Gonzáles, A., Strumia, M.C., Alvarez Igarzabal, C.I. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering*, 106, 331–338.
113. Gounga, M.E., Xu, Sh.-Y. Wang, Z. (2007). Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83, 521-530.
114. Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P., Subirade, M. (1998). Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea protein. *Industrial Crops and Products*, 7, 149-157.
115. Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. In Mathlouthi, M. (Ed.), *Food packaging and preservation: theory and practice*, 371-394. Essex: Elsevier.
116. Guilbert, S., Gontard, N. (1995) Technology and applications of edible protective films. *In: VII Biotechnology and Food Research – “New Shelf-Life Technologies and Safety Assessments”* Helsinki, Finland, pp. 49–60.

117. Gücbilmez, C.M., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40, 80-91.
118. Ha, T.T. (1999). Extrusion processing of zein-based biodegradable plastics. Ph.D. Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign.
119. Haard, N.F., Chism, G.W. (1996). Characteristics of edible plant tissue. In: Fennema, O. (ed) *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, NY, p 1067.
120. Halsey, G. (1948). Physical adsorption on ono-uniform surfaces, *Journal of Chemical Physics*, 16, 931-937.
121. Harwalkar, V.R., Ma, C.-Y. (1996). Thermal analysis: Principles and applications In: Nakai, S. & Modler, H. W., editors. *Food Proteins: Properties and Characterization*. New York, NY: VCH Publishers, Inc. p. 405-27.
122. Han, J.H. 2000. Antimicrobial Food Packaging, *Food Technology*, 54 (3), 56–65.
123. Han, X.Q., Damodaran, S. (1996). Thermodynamic compatibility of substrate protein affects on properties of glutelin-rich films. *Food Hydrocolloids*, 18, 403-411.
124. Hedenqvist, M.S., Backman, A., Gällstedt, M., Boyd, R.H., Gedde, U.W., (2006). Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 66, 2350-2359.
125. Henderson, S.M. (1952). A basic component of equilibrium moisture. *Agricultural Engineering*, 33. 29-32.
126. Hendrix, K.M., Morra, M.J., Lee, H-B., Min, S.C. (2011). Defatted mustard seed meal-based biopolymer film development. *Food Hydrocolloids*, 26 (1), 118-125.
127. Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., Chiralt, A. (2004). Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*, 18 (3), 403-411.
128. Hewage, S., Vithanarachchi, S.M. (2009). Preparation and characterization of biodegradable polymer films from cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolate. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 37, 53-59.
129. Hill, S.E., Mitchell, J.R., Armstrong, H.J. (1992). The production of heat stable gels at low protein concentration by the use of the Maillard reaction. In: *Gums and stabilizers for the food industry* (edited by G.O. Phillips, D.J. Wedlock and P.A. Williams), Oxford University Press, 79-482.
130. Hoffman, K.L., Han, I.Y., Dawson, P.L. (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *Journal of Food Protection*, 64, 885–889.

131. Hoojjat, P., Harte, B.R., Hernandez, R.J., Giacín, J.R., Miltz, J. (1987). Mass transfer of BHT from high density polyethylene film and its influence on product stability. *Journal of Packaging Technology*, 22, 78-81.
132. Hong, S.-I., Krochta, J.M. (2006). Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*, 77, 3739-3745.
133. Hoque, M. S., Benjakul, S., Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of filmforming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 96 (1), 66-73.
134. Irissin-Mangata, J., Banduin, G., Boutevin, B., Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat gluten films, *European Polymer Journal*, 37, 1533-1541.
135. Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K., Bawa, A.S. (2003). Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 88 (1), 64-71.
136. Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D., Bawa, A.S. (2006). Studies on the stability of an edible film and its use for the preservation of carrot (*Daucus carota*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 498-506.
137. Jang, S-A., Lim, G.-O., Song, K.B. (2011a). Effect of rapeseed protein–gelatin film containing grapefruit seed extract on ‘Maehyang’ strawberry quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 620–625.
138. Jang, S-A., Lim, G.-O., Song, K.B. (2011b). Preparation and mechanical properties of edible rapeseed protein films. *Journal of Food Science*, 76, 218-223.
139. Jangchud, A., Chinnan, M.S. (1999). Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. *Journal of Food Science*, 64, 153–157.
140. Jerez, A., Partal, P., Martínez, I., Gallegos, C., Guerrero, A. (2007). Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing. *Rheol Acta*, 46, 711-720.
141. Jia, D., Fang, Y., Yao, K. (2009). Water vapour barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soyprotein isolate edible films. *Food and Bioprocess Processing*, 87, 7-10.
142. Jiang, Y., Tang, Ch-H., Wen, Q-B., Li, L., Yang, X-Q. (2007). Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 218-225.

143. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2006a). Fatty acids and their sucrose esters affect the properties of fish skin gelatin-based film. *European Food Research Technology*, 222, 650–657.
144. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2006b). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research Technology*, 222, 229–235.
145. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22 (3), 449-458.
146. Jung, H.H. (2002). Protei-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In: Protein-based films and coatings. Ed. A. Gennadios, CRC Press, Florida, USA. pp 485-499.
147. Kalichevski, M.T., Jaroszkiwicz, E.M., Blanshard, J.M. (1992). Glass transition of gluten. 1: Gluten and gluten-sugar mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 257.
148. Karbowski, T., Debeaufort, F., Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 21, 879–888.
149. Ke, Sh., Huang, Y., Yu, H., Lee, T.-Ch., Huang, Q. (2011). Reducing the brittleness of zein films through chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 56–61.
150. Kester, J.J., Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40 (12), 47-59.
151. Kim, Y., Minami, N., Kazaoui, S. (2005). Highly polarized absorption and photoluminescence of stretch-aligned single-wall carbon nanotubes dispersed in gelatin films. *Applied Physics Letters*, 073103-1 - 073103-3.
152. Kim, K.M., Lee, B.-Y., Kim, Y.T., Choi, S.-G.C., Lee, J., Cho, S.Y., Choi, W.S. (2006). Development of antimicrobial edible film incorporated with green tea extract. *Food Science and Biotechnology*, 15, 478–481.
153. Kinsella, J.E. (1982). Relationship between structure and functional properties of food proteins. In: Fon and Codon ed. Food Proteins, Springer, 51-104.
154. Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21 (3), 197-262.

155. Koelsch, C.Z. (1994). Edible water vapor barriers: properties and promises. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 76-81.
156. Koepff, P., Braumer, K., Stahl, H., Dick, E. (1994). *US Patent 5316717*.
157. Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A., Voilley, A. (2010). Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 503–510.
158. Kowalczyk, D., Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizer, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105, 295–305.
159. Krause, J.-P., Kroll, J., Pudiel, F. (2007). Rape Seed Proteins, Current Issues and Future Prospects. DGF Symposium, Leipzig.
160. Kristo, E., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386.
161. Krochta, J.M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-based Films and Coatings*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–41.
162. Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61–74.
163. Krochta, J., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (1994). Edible coating and films to improve food quality. Technomic Pub Co., Lancaster, USA.
164. Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I.K., Mattiason, B. (2002). Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16 (3), 155–172.
165. Kumar, R., Zhang, L. (2009). Soy protein films with the hydrophobic surface created through non-covalent interactions. *Industrial Crops and Products*, 29, 485-494.
166. Kumar, P., Sandeep, K.P., Alavi, S., Truong, V.D., Gorga, R.E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering*, 100, 480–489.
167. Kunte, L.A., Gennadios, A., Cuppett, S.L., Hanna, M.A., Weller, C.L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fraction. *Cereal Chemistry*, 74, 115–118.
168. Kuorwel K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, W.S. (2011). Antimicrobial Activity of Biodegradable Polysaccharide and Protein-Based Films Containing Active Agents. *Journal of Food Science*, 76 (3), 2011.
169. Labuza, T.P. (1968). Sorption phenomena in foods. *Food Technology*, 22, 15-24.

170. Lacroix, M. (2009). Mechanical and permeability properties of edible films and coatings for food and pharmaceutical applications. In *Edible films and coatings for food applications*, Ed. Embuscado & Huber, Springer Science+Business Media, LLC.
171. Lacroix, M., Le, T.C., Ouattara, B., Yu, H., Letndre, M., Sabato, S:F., Mateescu, M.A., Patterson, G. (2002). Use of g-irradiation to produce film from whey, casein and soya proteins: structure and functional characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 827-832.
172. Lai, H-M., Padua, W.G. (1997). Properties and microstructure of plasticized zein films. *Cereal Chemistry*, 74, 771-775.
173. Larré, C., Mulder, W., Sánchez-Vioque, R., Lazko, J., Bérot, S., Guéguen, J., Popineau, Y. (2006). Charaterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. *Colloids and Surfaces B*, 49, 40–8.
174. Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. (2002). Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrates Polymers*, 48, 179–190.
175. Lazić, V., Budinski-Simendić, J., Gvozdenović, J., Simendić, B. (2010). Barrier properties of coated and laminated polyolefin films for food packaging. *Acta Physica Polonica A*, 117, 855-858.
176. Lee, S.Y., Krochta, J.M. (2002). Accelerated shelf life testing of whey-protein-coated peanuts analyzed by static headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2022–2028.
177. Lee, S.Y., Trezza, T.A., Guinard, J.X., Krochta, J.M. (2002). Whey-protein-coated peanuts assessed by sensory evaluation and static headspace gas chromatography. *Journal Food Science*, 67, 1212–1218.
178. Lee, Y.S., Shin, H.S., Han, J.K., Lee, M., Giacin, J.R. (2004). Effectiveness of antioxidant-impregnated film in retarding lipid oxidation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 84, 194-201.
179. Lee, S.L., Lee, M.S., Song, K.B. (2005). Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. *Food Chemistry*, 92, 621-625.
180. Lent, L.E., Vanasupa, L.S., Tong, P.S. (1998). Whey protein edible film structure determined by atomic force microscope. *Journal of Food Science*, 63, 824-827.
181. Lestari, D., Mulder, W.J., Sanders, J.P.M. (2011). *Jatropha* seed protein functional properties for technical applications. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 297-304.

182. Li, Y., Guo, X., Lin, P., Fan, C., Song, Y. (2010). Preparation and functional properties of blend films of gliadins and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 81, 484-490.
183. Lieberman, E.R., Gilbert, S.G. (1973). Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. *Journal of Polymer Science*, 41, 33-43.
184. Lim, L.-T., Mine, Y., Tung, M.A. (1999) Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. *Journal of Food Science*, 64 (4), 616-622.
185. Lim, L.-T., Mine, Y., Brit, I.J., Tung, M.A. (2002). Formation and properties of egg white films and coatings. In: Protein-based films and coatings. Ed. A. Gennadios, CRC Press, Florida, USA.
186. Limpisophon, K., Tanaka, M., Osako, K. (2010). Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122 (4), 1095-1101.
187. Lin, O.H., Kumar, R.N., Rozman, H.D., Noor, M.A.M. (2005). Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. *Carbohydrate Polymers*, 59 (1), 57–69.
188. Lindsay, M.P., Skerritt, J.H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: Structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 247-253.
189. Liu, Ch.-Ch., Tellez-Garay, A.M., Castell-Perez, M.E. (2004). Physical and mechanical properties of peanut protein films. *LWT -Food Science and Technology*, 37, 731-738.
190. Liu, L.S., Liu, C.-K., Fishman, M.L., Hicks, K.B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2349–2355.
191. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
192. Makino, Y., Hirata, T. (1997). Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan-cellulose and polycaprolactone. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 247–254.
193. Mali, S., Grossmann, M.V.E., Garcia, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75, 453–460.

194. Mangavel, C., Barbot, J., Gueaugen, J. Popineau, Y. (2003). Molecular determinants of the influence of hydrophilic plasticizers on the mechanical properties of cast wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1447–1452.
195. Marcone, M.F., Yada, R.Y. Aroonkamonsri, W., Kakuda, Y. (1997). Physico-chemical properties of the purified isoforms of the “12S” seed globulin from mustard seed (*Brassica alba*). *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 61, 65–74.
196. Marcone, M.F., Kakuda, Y., Yada, R.Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants – I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, 62, 27–47.
197. Mariquie, C., Guilbert, S. (2002). Formation and properties of cottonseed protein films and coating, CRC Press, New York.
198. Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102, 191-198.
199. Marquié, C. (2001). Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4676–4681.
200. Mark, J.E. (1999). *Polymer Data Handbook*, Oxford University Press, Inc.
201. Mark S., Alger, M. (1997). *Polymer science dictionary*. Springer. p. 152.
202. Mastromatteo, M., Chillo, S., Buonocore, G., Massaro, A., Conte, A., Bevilacqua, A., Del Nobile, M.A. (2009). Influence of spelt bran on the physical properties of WPI composite films. *Journal of Food Engineering*, 92 (4), 467-473.
203. Maté J.I., Krochta J.M. (1996). Whey protein coating effect on the oxygen uptake of dry roasted peanuts. *Journal of Food Science*, 61, 1202–1210.
204. Maté J.I., Krochta J.M. (1997). Whey Protein and Acetylated Monoglyceride Edible Coatings: effect on the rancidity process of walnuts. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45, 2509-2513.
205. Maté, J.I., Frankel, E.N., Krochta, J.M. (1996). Whey protein isolate edible coatings: effect on the rancidity process of dry roasted peanuts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1736–1740.
206. Martucci, J.F., Ruseckaite, R.A. (2007). Biodegradable bovine gelatin/Na⁺-montmorillonite nanocomposite films. Structure, barrier and dynamic mechanical properties. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 49 (6), 581-588.

207. Mauri, A.N., Añón, M.C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of Science and Food Agriculture*. 86, 1064–1072.
208. Mauri, A.N., Añón, M.C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14, 119-125.
209. McGookin, B.J., Augustin, M.A. (1991). Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures. *Journal of Dairy Research*, 58, 313-320.
210. McGookin, B.J., Augustin, M.A. (1997). Antioxidant activity of a heated casein-glucose mixture in full cream milk powder. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52, 15-19.
211. McHugh, T.H., Krochta, J.M. (1994). Sorbitol- vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 841-845.
212. McHugh, T.H., (2000). Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*, 44 (3), 148–151.
213. Means, G.E., Feeney, R.E. (1971). *Chemical Modification of Proteins*. Holden-Day, San Francisco.
214. Mendes de Souza, P., Fernández, A., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 24, 300–306.
215. Meng, G.-T., Ma, C.-Y (2001). Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. *Food Chemistry*, 73, 453–460.
216. Micard, V., Belamri, R., Morel, M.-H., Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2948-2953.
217. Miller, K.S., Krochta, J.M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 228-237.
218. Min, S., Harris, L.J., Krochta, J.M. (2005). *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science*, 70 (7), M317-324.
219. Mohanty, A.K., Liu, W., Tummala, P., Drzal, L.T., Misra, M., Narayan, R. (2005). Soy protein-based plastics, blends, and composites. In: *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, Ed: Mohanty, A.K., Misra, M., Drzal, L.T. CRC Press. Print ISBN: 978-0-8493-1741-5. DOI: 10.1201/9780203508206.ch22

220. Monedero, F., 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 (4), 509–515.
221. Morales, A., Kokini, J. (1997). Glass Transition of Soy Globulins Using Differential Scanning Calorimetry and Mechanical Spectrometry. *Biotechnological Progress*. 13, 624–629.
222. Morales, F.J., Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction product as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119-125.
223. Morel, M.H., Bonicel, J., Micard, V., Guilbert, S. (2000). Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfide-treated wheat gluten films during aging at temperature and humidities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 186–190.
224. Morllion, V., Debeaufort, F., Bond, G., Capelle, M., Voilley, A. (2002). Factor affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-69.
225. Myers, R.L. (2004). The IC50 rating for antioxidant effectiveness. Internet source: <http://www.funimky.com>
226. Myllarinen, P., Partanen, R., Seppala, J. and Forssell, P., (2002). Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films, *Carbohydrate Polymers*, 50, 355-361.
227. Nadarajah, K. (2005). Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan. PhD Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. USA.
228. Naga, M., Kirihara, S., Tokugawa, Y., Tsuda, F., Hirotsuka, M. (1996). Process for producing edible proteinaceous film. US Patent no. 5,569,482.
229. Ng, B., Parkash, A., Tso, W.W. (2002). Two proteins with ribosome-inactivating, antitumor and abortifacient activities from seeds of *Luffa cylindrica roam* (Cucurbitaceae). *Biochemistry International*, 27, 197–207.
230. Nielsen, L.E., Landel R.F. (1994). Mechanical properties of polymers and composites, 2nd Ed. Marcel Dekker: New York.
231. Nkosi, C.Z., Opoku, A.R., Terblanche, S.E. (2005). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄ – Induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytotherapy Research*, 19, 341–345.
232. Nkosi, C.Z., Opoku, A.R., Terblanche, S.E. (2006). *In Vitro* antioxidative activity of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate and its *In Vivo* effect on alanine

- transaminase and aspartate transaminase in acetaminophen-induced liver injury in low protein fed rats. *Phytotherapy Research*, 20, 780-783.
233. Oh, J.H., Wang, B., Field, P.D., Aglan, H.A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysates crosslinked with transglutaminase. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 287–294.
234. Olabarrieta, I. (2005). Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan. whey and wheat gluten protein films. PhD Thesis. KTH, Superseded Departments, Fibre and Polymer Technology. Stockholm, Sweden.
235. Oliveira, M., Di Maio, E., Iannace, S. (2010). Effect of molecular structure on film blowing ability of thermoplastic zein, *Journal of Applied Polymer Science*, 115, 277-287.
236. Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., Rigal, L. (2002). Effect of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43, 5417-5425.
237. Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., Rigal, L. (2003). Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18, 91-100.
238. Oswin, C.R. (1946). The kinetics of package life III. The Isotherm, *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 65, 419-421.
239. Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70, 205–210.
240. Ouattara, B., Canh, L.T., Vachon, C., Mateescu, M.A., Lacroix, M. (2002). Use of g-irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 821-825.
241. Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5598-5605.
242. Ozdermir, M. (1999). Antimicrobial releasing edible whey protein films and coatings. Ph.D. Dissertation, Purdue University, West Lafayette, IN.
243. Padgett, T.M., Han, I.Y., Dawson, P.L. (1995). Incorporation of lysozyme into biodegradable packaging films. *Poultry Science*, 74 (1), 175.

244. Padget, T., Han, L.J.Y., Dawson, P.L. (1998). Incorporation of food grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, 61 (10), 1330-1335.
245. Padua, G.W., Rokoronirainy, A., Wang, Q. (2000). Zein-based biodegradable packaging for frozen foods. Proceedings of the Food Biopack Conference. 27-29 August 2000., Copenhagen, Denmark, pp. 84-88.
246. Paetau, I., Chen, C.Z., Jane, J. (1994). Biodegradable plastic made from soybean products. I. Effect of preparation and processing on mechanical properties and water absorption. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 33 (7), 1821– 1827.
247. Papadokostaki, K.G., Amanratos, S.G., Petropoulos, J.H. (1997). Kinetics of release of particules solutes incorporated in cellulosic polymer matrices as a function of solute solubility and polymer swellability. I. Sparingly soluble solutes. *Journal of Applied Polymer Science*, 67, 277–287.
248. Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., Marcovich, N.E. (2011). Preparation and characterization of sodium caseinate films reinforced with cellulose derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 86 (2), 1014-1021.
249. Pérez-Gago, M.B., Nadaud, P., Krochta, J.M. (1999). Water vapour permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034–1037.
250. Pérez-Gago, M.B., Krochta, J.M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beewax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.
251. Pérez-Gago, M.B., Serra, M. del Río, M.A. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 84–92.
252. Pérez-Mateos, M., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23, 53–61.
253. Piazza, L., Dürr-Auster, N., Gigli, J., Windhab, E.J., Fischer, P. (2009). Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2125-2131.
254. Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11 (9–10), 347–356.

255. Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21, 240–246.
256. Pitak, N., Rakshit, S.K. (2011). Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving Fresh-cut vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (10), 2310-2315.
257. Pol, H., Dawson, P., Acton, J., Ogale, A. (2002). Soy protein isolate/corn zein laminated films: transport and mechanical properties. *Journal of Food Science*, 67, 212-217.
258. Pommet, M., Redl, A., Morel, M-H., Guilbert, S. (2003). Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44, 115–122.
259. Pommet, M., Morel, M.H., Redl, A. Guilbert, S. (2004). Aggregation and degradation of plasticized wheat gluten during thermo-mechanical treatments, as monitored by rheological and biochemical changes. *Polymer*, 45, 6853–6860.
260. Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S. (2013). Optimization of Transglutaminase Cross-linking of Pumpkin Oil Cake Globulin; Improvement of the Solubility and Gelation Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1105-1111.
261. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
262. Pruneda, E., Peralta-Hernández, J.M., Esquivel, K., Lee, S.Y., Godínez, L.A., Mendoza, S. (2008). Water vapor permeability, mechanical properties and antioxidant effect of Mexican oregano-soy based edible films. *Journal of Food Science*, 73 (6), 488-493.
263. Rachtanapun, P., Tongdeesoontorn, W. (2010). Effect of antioxidants on properties of rice flour/cassava starch film blends plasticized with sorbitol, *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 43, 252-258.
264. Rayas, L.M., Hernández, R.J. (1997) Development and characterization of biodegradable/edible wheat protein films. *Journal of Food Science*, 62, 160–164.
265. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
266. Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Cazeirat, C., Hanna, M.A. (1998). Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8, 195–203.
267. Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C.L., Hanna, M.A. (1999). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *LWT - Food Science and Technology*, 32, 129-133.

268. Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 15, 199–205.
269. Rhim, J.W., Lee, J.H., Kwak, H.S. (2005). Mechanical and barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. *Food Science and Biotechnology*, 14, 112–116.
270. Rhim, J.W., Mohanty, A.K., Singh, S.P., Ng, P.K.W. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and polylactide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 3059-3066.
271. Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531-539.
272. Robertson, G.H., Gregorski, K.S., Cao, T.K. (2006). Changes in secondary protein structures during mixing development of high absorption (90%) flour and water mixtures. *Cereal Chemistry*, 83, 136–142.
273. Rodrigues, E.T., Han, J.H. (2000). “Antimicrobial Whey Protein Films against Spoilage and Pathogenic Bacteria” in *2000 IFT Annual Meeting Book of Abstracts*, Chicago, IL: Institute of Food Technologists, p. 191.
274. Rojas-Grau, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Friedman, M., Henika, R.P., Martin-Belloso, O., McHugh, T.H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (24), 9262-9267.
275. Romero-Bastida, C.A., Martin-Polo, M.O., Velazquez, G., Torres, J.A. (2004). Effect of plasticizer, pH and hydration on the mechanical and barrier properties of zein and ethylcellulose films. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4 (4), 251-256.
276. Rosen, S.L. (1993). *Fundamental principles of polymeric materials*. 2nd. ed., John Wiley & Sons.
277. Roy, S., Weller, A., Gennadios, A., Zeece, M.G., Testin, R.F. (1999). Physical and molecular properties of wheat gluten films casting from heated film-forming solutions. *Journal of Food Science*, 64, 57–60.
278. Roy, S., Gennadios, A., Weller, C.L., Testin, R.F. (2000). Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *Industrial Crops Products*, 11, 43–50.
279. Sabato, S.F., Ouattara, B., Yu, H., D’Aprano, G., LeTien, C., Mateescu, M.A. Lacroix, M. (2001). Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1397–1403.

280. Salame, M. (1986). Barrier polymers. In Bakker, M. (Ed.). *The Wiley Encyclopedia of packaging technology*, 48-54. New Yoerl: John Wiley and Sos.
281. Salgado, P.R., Fernández, G.B., Drago, S.R., Mauri, A.N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25 (6), 1433-1440.
282. Saremnezhad, S., Azizi, M.H., Barzegar, M., Abbasi, S., Ahmadi, E. (2011). Properties of a new edible film made of Faba bean proytein isolate. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 13, 181-192.
283. Sarmadi, B.H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31 (10), 1949–1956.
284. Schuessler, H., Schillinga, K. (1984).Oxygen effect in the radiolysis od proteins. *International Journal od radioation Biology*, 45, 267-281.
285. Secundo, F. Guerrieri, N. (2005). ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effects on protein secondary structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1757–1764.
286. Sejidov, F.T., Mansoori, Y., Goodarzi, N. (2005). Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 240 (1–2), 186–190.
287. Schmidt, V., Soldi, V. (2006). Influence of polycaprolactone-triol addition on thermal stability of soy protein isolate based films. *Polymer Degradation and Stability*, 91 (12), 3124–3130.
288. Shukla, R., Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
289. Siepmann, J., Streubel, A., Peppas, N.A. (2002). Understanding and predicting drug delivery form hydrophilic matrix tablets using the sequential layer model. *Pharmaceutical Research*, 19 (3), 306–314.
290. Sivarooban, T., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781-785.
291. Skurtys O., Acevedo C., Pedreschi F., Enrione J., Osorio F., Aguilera J.M. (2010). *Food hydrocolloid edible films and coatings*. Nova Science Publishers Inc, NewYork.
292. Soares, R.M.D., Maia, G.S., Rayas-Duarte, P., Soldi, V. (2009). Properties of filmogenic solutions of gliadin crosslinked with 1-(3-dimethyl aminopropyl)-3-

- ethylcarbodiimidehydrochloride/N-hydroxysuccinimide and cysteine. *Food Hydrocolloids*, 23, 181–187.
293. Soliman, E.A., Tawfik, M.S., Hosni, E.-S., Moharram, Y.G. (2007). Preparation and characterization of soy protein based edible/biodegradable films. *American Journal of Food Technology*, 2, 462-476.
294. Soliman, E.A., Eldin, M.S.M., Furuta, M. (2009). Biodegradable zein-based films: Influence of γ -irradiation on structural and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2529–2535.
295. Song, F., Zhang, L.M. (2009). Gelation modification of soy protein isolate by a natural occurring cross-linking agent and its potential biomedical application. *Industrial & Engineering Chemistry Research: Materials and Interfaces*, 48 (15). 7077–7083.
296. Song, Y.H., Li, L.F., Zheng, Q. (2009). Influence of epichlorohydrin modification on structure and properties of wheat gliadin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2295–2301.
297. Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2000a). Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 6298-6302.
298. Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2000b). Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3913-3916.
299. Sperling, L.H. (2006). *Physical Polymer Science*, (fourth ed), Wiley, New York (2006).
300. Stuchell Y.M., Krochta J.M., (1995). Edible Coating on Frozen King Salmon : effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. *Journal of Food Science*, 60, 28-31.
301. Su, J.F., Huang, Z., Liu, K., Fu, L.L., Liu, H.R. (2007). Mechanical properties, biodegradation and water vapor permeability of blend films of soy protein isolate and poly (vinyl alcohol) compatibilized by glycerol. *Polymer Bulletin*, 58 (5–6), 913–921.
302. Su, J.-F., Huan-g, Z., Yuan, X.-Y., Wang, X.-Y., Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79, 145-153.
303. Sunday, Y.G. Isaac, I. (1999). Preparation and properties of flours and protein concentrates from raw, fermented and germinated fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 67–77.

304. Swain, S.N., Biswal, S. M., Nanda, P. K. Nayak, P.L. (2004). Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, 2, 35-42.
305. Tae, H.J. (1983). Bifunctional reagents. *Methods in Enzymology*, 91, 580-609.
306. Tang, Ch-H., Jiang, Y. (2007). Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment, *Food Research International*, 40, 504-509.
307. Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2005a). Effects of drying temperature and relative humidity on the mechanical properties of amaranth flour films plasticized with glycerol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 249-256.
308. Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2005b). Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*, 67, 215-223.
309. Tapia-Blácido, D., Mauri, A.N., Menegalli, F.C., Sobral, P.J.A., Añón, M.C. (2007). Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Science*, 72, 293-300.
310. Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1731-1738.
311. Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future, *Trends in Food Science & Technology*, 14, 71-78.
312. Thomas, M.C., Forbes, J. (2010). The Maillard Reaction: Interface Between Aging, Nutrition and Metabolism. Royal Society of Chemistry, The, Cambridge.
313. Van der Berg, C, Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems, *Water Activity: Influences on Food Quality*, Rockland, L.B. & Stewart, G.F. (ed.) (Academic Press, New York, USA), 147-177.
314. Van den Berg, C. (1984). Description of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model of sorption. *Engineering and Food*, Vol. 1, McKenne, B.M. (ed) (Elsevier Applied Science, New York, USA), 311-321.
315. Van Tuil, R., Fowler, P., Lawther, M., Weber, C.J. (2000). Properties of biobased packaging materials. In: *Biobased packaging materials for the food industry*. Ed: Weber, C.J. KVL, Denmark.

316. Vachon, C., Yu, H.L., Yefsah, R., Alain, R., St-Gelais, D., Lacroix, M. (2000). Mechanical and structural properties of milk protein edible films cross-linked by heating and gamma irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3202–3209.
317. Vassiliou, A.G., Neumann, G.M., Condrón, R., Polya, G.M. (1998). Purification and mass spectrometry – assisted sequencing of basic antifungal proteins from seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Plant Science*, 134, 141–162.
318. Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates; Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 277-282.
319. Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316-1321.
320. Veiga-Santos, P., Oliveira, L.M., Cereda, M.P., Scamparini, A.R.P. (2007). Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. *Food Chemistry*, 103, 255-262.
321. Venyaminov, S.Yu., Kalnin, N.N. (1990). Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers*, 30 (13-14), 1243-1257.
322. Verbeek, C.J.R., van der Berg, L.E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics, *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 10-21.
323. Vieira, M.G.A., da Silva, M.A., dos Santos, L.O., Beppu, M.M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47, 254–263.
324. Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51 (5), 361–365.
325. Wang, S., Zhang, S., Jane, J.L., Sue, H.J. (1995). Effect of polyols on mechanical properties of soy protein. *Polymeric Materials: Science and Engineering*, 72, 88-89.
326. Wang, S., Sue, H.J., Jane, J. (1996). Mechanical properties of soy protein plastics. *Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry*, (Ed.) A33, 557-569.
327. Wang, H.X. Ng, T.B (2003). Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds. *Peptides*, 24, 969–972.
328. Wang, Y., Padua, G.W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 886-893.

329. Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Huanng, J., Kerry, J.F., Kerry, J.P. (2008). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of whey protein isolate-based films using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 787–796.
330. Wang, L., Auty, M.A.E., Rau, A., Kerry, J.F., Kerry, J.P. (2009). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering*, 90, 11–19.
331. Wäsche, A., Wurst, S., Borcharding, A., Luck, T. (1998). Film forming properties of rape-seed protein after structural modification. *Nahrung*, 42, 269–271.
332. Weber, C.J. (2000). *Biobased packaging materials for the food industry*. KVL, Denmark.
333. Weng, W.Y., Osako, K., Tanaka, M. (2009). Oxygen permeability and antioxidative properties of edible surimi films, *Fisheries Science*. 75, 233–240.
334. Wool, R.P., Khot, S.N., LaScala, J.J., Bunker, S.P., Thielmans, W., Morye, S.S. (2000). All natural composites for the transportation industry. *Polymer Material Science Engineering* (American Chemical Society), 83, 12.
335. Wright, D.J. (1984). Thermoanalytical methods in food research. In: Chan, H. W.-S., editor. *Biophysical Methods in Food Research*. London, UK: Blackwell Scientific. p. 1-36.
336. Xiong, Y., Brekke, C.J. (1989). Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during storage, *Journal of Food Science*, 54, 1141-1146.
337. Yao, C., Liua, B., Changa, C.J., Hsub, S.H., Chenc, Y.S. (2004). Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics*, 83 (2-3), 204–208.
338. Yang, L., Paulson, A.T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Technology*, 33, 571-578.
339. Yang, Y.-y., Zhang, K.-zh., Song, Y.-h., Zheng, Q. (2011). Preparation and properties of wheat gluten/rice protein composites plasticized with glycerol. *Chinese Journal of Polymer Science*, 29, 87-92.
340. Yarnell, A. (2002). Acrylamide mystery solved. Heating asparagine with sugar yields chemical found in cooked foods. *Chemical and Engineering News*, 80 (40), 7.
341. Yee, V.C., Pedersen, L.C., Trong, I.L., Bishop, P D., Stenkamp, R.E., Teller, C.C. (1994). Threedimensional structure of a transglutaminase: Human blood coagulation factor XIII. *Procedure National Academy Science*, 91, 7296-7300.

342. Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.
343. Yoo, S.R., Krochta, J.M. (2011). Whey protein-polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (14), 2628-2636.
344. Yu, J.H., Cui, G.J., Wei, M., Huang, J. (2007). Facile exfoliation of rectorite nanoplatelets in soy protein matrix and reinforced bionanocomposites thereof. *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 3367-3377.
345. Yuan, Y., Chesnutt, B.M., Utturkar, G., Haggard, W.O., Yang, Y., Ong, J.L., Bumgardner, J.D. (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*, 68 (3), 561-567.
346. Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 100, 102-108.
347. Zhao, R., Tottle, P., Halley, P.J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based nio-nanocomposites. *Journal of Material Science*, 43, 3058-3071.
348. Zhang, J., Mungara, P., Jane, J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*, 42, 2569-2578.
349. Zhang, H., Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental progress and sustainable energy*, 29, 203-220.
350. Zhang, Ch., Guo, K., Ma, Y., Ma, D., Li X., Zhao. X. (2010). Incorporations of blueberry extracts into soybean-protein-isolate film preserve qualities of packaged lard. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1801-1806.
351. Zhang, X., Li, Q., Jing, H. (2011). Film-forming properties of Maillard reaction products formed from whey protein and xylose and their inhibitory effect on lipid oxidation in walnut kernel. *Food Science*, 32 (5), 58-64.
352. Zheng, J.P., Li, P., Ma, J.L., Yao, K.D. (2002). Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86 (5), 1189-1194.