



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

PELÍCULAS COMESTIBLES A BASE DE KEFIRAN Y PROTEÍNAS DE ALTO VALOR BIOLÓGICO PARA INCORPORAR EN ALIMENTOS FUNCIONALES

Nina Gagliarini¹, Gabriela Diosma^{1,2}, Judith Piermaria¹ y Analía G. Abraham^{1,3}

¹CIDCA (CONICET, CIC, UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina. ² UNLP, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. ³ UNLP, Facultad de Ciencias Exactas.
nina.gagliarini@gmail.com

RESUMEN

La investigación relacionada con la utilización de biopolímeros, especialmente los producidos por microorganismos, continúa su crecimiento debido a la búsqueda de recursos genuinos que permitan una producción sustentable con una amplia funcionalidad debido a su diversidad biológica. El kefiran es un polisacárido neutro producido por bacterias ácido lácticas con *status GRAS* que se encuentra presente en el gránulo de kefir. Su purificación es simple y utiliza reactivos compatibles con el procesamiento de alimentos.

El objetivo del trabajo fue obtener y caracterizar películas comestibles elaboradas a partir de kefiran incluyendo en su formulación proteínas de suero.

Se prepararon formulaciones con diferente relación proteínas de suero:kefiran (8:0, 7:1 y 6:2), diferentes contenidos de glicerol (30, 40, 50 y 60 g cada 100 g de la suma de macromoléculas) y se sometieron a secado en estufa a 37°C empleando convección natural o convección forzada de aire. Se evaluó espesor, humedad, color y transparencia de las películas obtenidas y se observó su microestructura mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Asimismo, se determinaron la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y las propiedades mecánicas mediante ensayos de tracción en texturómetro.

Se obtuvieron películas transparentes e incoloras ($\Delta E=5,54$; máxima diferencia obtenida a partir de los parámetros de color CieLab respecto al patrón blanco). Aquellas conteniendo 30% de glicerol resultaron quebradizas y las plastificadas con 60% de glicerol fueron muy difíciles de manipular debido a su adhesividad, por lo que ambas formulaciones fueron desestimadas para el análisis. El espesor medio de las películas mixtas varió entre 128 y 157 μm y no resultó dependiente de la relación entre las macromoléculas empleadas ni de la metodología de secado utilizada para su obtención. Sin embargo, la utilización de convección forzada en el secado condujo a mayor heterogeneidad de espesor, observado en elevados valores de los desvíos respecto al valor medio. La humedad de las películas varió entre 23,8 y 29,7 % p/p y presentaron superficies homogéneas y compactas al SEM. Se hallaron valores de WVP entre 2.28 y $2.84 \times 10^{-10} \text{g} \cdot (\text{seg} \cdot \text{m} \cdot \text{Pa})^{-1}$.

Respecto a las características mecánicas, el mayor contenido en glicerol modificó el patrón de comportamiento mecánico aumentando la flexibilidad y

disminuyendo la resistencia a la ruptura y el módulo elástico. El secado mediante convección natural de aire permitió obtener películas con mayor elongación a la tracción que el empleo de convección forzada para una misma concentración de plastificante (130% vs 47% en películas con 40% de glicerol).

Las películas conteniendo la relación proteína:polisacárido 6:2 y 40% p/p de glicerol presentaron las mejores características mecánicas. La utilización de convección forzada de aire en la etapa de secado redujo los tiempos de obtención de las películas respecto a la utilización de convección natural, sin embargo condujo a características mecánicas inferiores y mayor heterogeneidad en los parámetros físicoquímicos.

Estas películas se presentan como una alternativa para la inclusión en alimentos mejorando su calidad nutricional debido a la incorporación de proteínas de alto valor biológico y otorgando valor agregado por la inclusión de kefiran, polisacárido bacteriano con interesantes propiedades tecnofuncionales.

Palabras clave: películas, kefiran, proteínas de suero, propiedades mecánicas.

1. Introducción

La producción de nuevos alimentos conduce a la industria a una búsqueda continua de moléculas que puedan aportar funcionalidad tecnológica o biológica. La potencialidad de los biopolímeros como recursos que permiten la producción sustentable hace que la investigación relacionada con la utilización de dichas moléculas continúe en crecimiento.

Entre los biopolímeros, aquellos producidos por microorganismos son de especial interés por la amplia diversidad que representan. El kefiran es un polisacárido neutro producido por bacterias ácido lácticas con *status GRAS* que se encuentra presente en el gránulo de kefir. Su purificación es simple y utiliza reactivos compatibles con el procesamiento de alimentos (Piermaria *et al* 2015).

Debido a su estructura química y tipo de enlaces, el kefiran no puede ser hidrolizado por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal superior, por lo que llega al intestino donde ejerce sus efectos biológicos (Abraham *et al.*, 2010). Entre ellos se demostró su actividad antagonista contra factores de virulencia de *Bacillus cereus* (Medrano *et al.*, 2008 y 2009) y actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* (Furuno & Nakanishi, 2012; Medrano *et al.*, 2011). Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que alcanzan el colon donde son selectivamente fermentados estimulando el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias benéficas (Gibson & Roberfroid, 1995). El kefiran puede ser considerado un aditivo prebiótico ya que se ha demostrado su efecto bifidogénico en un modelo animal (Hamet *et al.*, 2016) y la administración de kefiran a ratones estimuló la producción de células productoras

de mucus en intestino delgado y de macrófagos en lámina propia (Medrano *et. al.*, 2011).

En relación a sus características tecnológicas el kefir posee capacidad espesante, (Abraham *et. al.*, 2010; Ruas-Madiedo *et. al.*, 2008), habilidad de formar geles (Piermaria *et. al.*, 2008) y es capaz de formar películas comestibles transparentes, homogéneas y extremadamente delgadas con buenas propiedades mecánicas y de barrera (Piermaria *et. al.*, 2009 y 2011).

Las proteínas de suero constituyen uno de los biopolímeros más ampliamente utilizados como ingredientes alimenticios debido a sus propiedades tanto funcionales como nutricionales (Foegeding *et. al.*, 2002). Son capaces de formar películas transparentes, con buenas propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno (Ramos *et. al.*, 2012).

Se ha observado que la interacción entre proteínas y polisacáridos puede influir en las propiedades de las películas obtenidas a partir de combinaciones de ambas macromoléculas (Silva *et al.*, 2016). Este hecho permite la generación de sistemas mixtos con características diferenciales (Prommakool *et. al.*, 2011) ya sea por el mantenimiento o la sumatoria de las propiedades individuales de cada uno de los componentes o la potencial sinergia entre ambos (Vieira *et al.*, 2011).

En este marco, el objetivo del trabajo fue optimizar y caracterizar formulaciones para obtener películas comestibles a partir de la combinación de kefir y proteínas de suero con la finalidad de utilizarlas posteriormente para su aplicación en alimentos funcionales.

2. Materiales y métodos

Macromoléculas

El kefir fue obtenido de acuerdo a Piermaria *et. al.* (2015) a partir de gránulos de kefir de leche AGK1 de la colección CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Argentina) disueltos en agua en una relación 1:10 y la concentración de polisacárido fue normalizada a 3.5% p/p por evaporación. Esta solución fue almacenada a -20°C hasta su utilización.

Las proteínas de suero de leche, WPI Lacprodan DI-9224, con un contenido proteico de 92%, fue provisto por *Arla Foods Ingredients* (Dinamarca).

Dispersiones filmogénicas

Se formularon dispersiones acuosas conteniendo diferentes relaciones proteínas de suero:kefiran (6:2, 7:1 y 8:0) y diferentes contenidos de glicerol como plastificante (entre 30 y 60g cada 100g de macromoléculas). Se ajustó el pH de dichas dispersiones a 7 y luego se trataron durante 30min a 90°C con el objetivo de desnaturalizar las proteínas.

Obtención de las películas

Las dispersiones filmogénicas se colocaron en placas de Petri de 50mm de diámetro a razón de 3.5g/placa. Luego, las mismas fueron deshidratadas en estufa a 37°C empleando convección forzada de aire o convección natural, durante 5 o 16hs respectivamente. Las películas obtenidas fueron removidas de las placas y estabilizadas durante 48hs a 20°C y 75% de humedad relativa previo a su caracterización.

Caracterización de las películas

El contenido de agua de las películas se evaluó mediante la diferencia de masa luego de someter las mismas a 105±1°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron como gramos de agua cada 100g de película.

La evaluación de color se llevó a cabo utilizando un colorímetro Serie CR 300, Minolta (Osaka, Japón), calibrado empleando el patrón blanco. La luminosidad (L^*) y los parámetros de color a^* y b^* fueron obtenidos utilizando la escala CIE Lab. Las muestras de películas se dispusieron sobre el patrón blanco y se tomaron determinaciones en 10 posiciones aleatorias. Para cada parámetro, se calculó la diferencia con el valor promedio del mismo correspondiente al patrón. A partir de dichas diferencias (ΔL^* , Δa^* y Δb^*) se calculó la diferencia de color total (ΔE) utilizando la ecuación:

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

La transparencia se evaluó de acuerdo a Zhang and Han (2006). Se cortaron muestras rectangulares de las películas y se dispusieron sobre la cara interna de una celda espectrofotométrica (espectrofotómetro Beckman DU650, Palo Alto, CA, USA). La absorbancia registrada a 600nm se utilizó para calcular la transparencia de cada

muestra como la relación entre este valor y el espesor de la película, utilizando la ecuación de Han y Floros (1997). Los resultados se expresaron como [UA/mm].

El espesor de las películas fue evaluado utilizando un medidor electrónico de espesores (CM-8822 Digital meter Microprocessor). Se tomaron valores en 10 posiciones aleatorias de cada película y se utilizó el valor promedio de los mismos.

La permeabilidad al vapor de agua a 20°C se determinó utilizando una modificación del método ASTM (Mali *et al*, 2002), utilizando celdas de permeabilidad con un gradiente de humedad relativa de 0-75%.

Las propiedades mecánicas de las películas fueron evaluadas mediante ensayos de tracción utilizando un texturómetro (TA.XT2i—Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) con un sistema de mordazas A/TG de acuerdo al método ASTM D882-91 (1996). Se evaluaron 10 réplicas por cada formulación, graficando el esfuerzo en función de la deformación.

La resistencia máxima a la tracción se calculó como la relación entre la fuerza máxima registrada y la sección transversal inicial de las películas. La elongación máxima resultó de la relación entre la longitud alcanzada al momento de ruptura y la longitud inicial de las muestras, expresada como porcentaje. El módulo de elasticidad se calculó a partir de la pendiente de la recta tangente a la porción inicial de la curva esfuerzo-deformación.

Microestructura de las películas

La microestructura de las películas fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido utilizando un microscopio de barrido electrónico 505 (Philips, Eindhoven, Países Bajos). Pequeños fragmentos obtenidos por criofractura de las películas fueron fijados sobre el soporte utilizando cinta adhesiva bifaz y cubiertas con una capa de oro de 40nm previo a su observación.

3. Resultados y discusión

Se combinó kefirán con proteínas de suero y glicerol como plastificante para formar las dispersiones filmogénicas, ensayando distintas relaciones entre las cantidades de ambas macromoléculas, como así también diferentes concentraciones de glicerol y dos metodologías de deshidratación alternativas con el fin de seleccionar la formulación y condiciones de secado que condujeran a mejores características en las películas obtenidas.

Para todas las combinaciones ensayadas, se obtuvieron películas transparentes e incoloras (Tabla 1 y Figura 1). La máxima diferencia de color obtenida a partir de los parámetros CieLab respecto al patrón blanco fue de 5.54, por lo que las películas constituidas por la combinación de kefiran y proteínas de suero presentan menores valores de ΔE que aquellas basadas sólo en proteínas de suero (Pereira *et al.*, 2016).

Tabla 1: Parámetros ópticos (diferencias ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE , y transparencia) de películas con diferentes relaciones de proteínas de suero y kefiran (6:2, 7:1 y 8:0) obtenidas a partir de formulaciones conteniendo 30 o 50% de glicerol como plastificante respecto a la suma de macromoléculas.

Formulación	6:2 ₃₀	6:2 ₅₀	7:1 ₃₀	7:1 ₅₀	8:0 ₃₀	8:0 ₅₀
ΔL^*	0.042 ± 0.2	-0.598 ± 0.11	-0.696 ± 0.29	-0.922 ± 0.09	0.656 ± 0.23	-0.44 ± 0.90
Δa^*	0.098 ± 0.004	-0.048 ± 0.045	0.122 ± 0.015	0.05 ± 0.04	0.198 ± 0.02	0.166 ± 0.01
Δb^*	-1.16 ± 0.008	-0.78 ± 0.15	-1.086 ± 0.09	-1.034 ± 0.17	-1.168 ± 0.29	-1.372 ± 0.16
ΔE	1.18 ± 0.02	0.99 ± 0.06	1.32 ± 0.08	1.39 ± 0.07	1.36 ± 0.37	1.65 ± 0.25
Transparencia (UA/mm)	1.75 ± 0.08	0.90 ± 0.08	1.18 ± 0.09	0.83 ± 0.06	1.42 ± 0.07	1.96 ± 0.06



Figura 1: Fotografías de películas de kefiran y proteínas de suero conteniendo diferentes concentraciones de glicerol en su formulación: 50 (a) o 30 (b) % respecto de la totalidad de macromoléculas), luego de ser removidas de la placa de Petri.

Las películas obtenidas a partir de la formulación conteniendo proteínas de suero y kefiran en la relación 6:2 presentaron la mayor elongación entre las de composición mixta (datos no mostrados). Por otra parte poseen el mayor contenido de kefiran,

polisacárido con demostrada actividad biológica. En base a estos resultados dicha combinación fue la seleccionada para la continuación del trabajo.

La humedad de las películas mixtas 6:2 (wpi:kefirán) varió entre 23,8 y 29,7 % p/p (Tabla 2). Los valores se encuentran en el mismo rango que los de otras películas basadas en combinaciones de las mismas macromoléculas en relación 1:1 (Zolfiet. *al.*, 2014) o en otras combinaciones de proteínas y polisacáridos como alginato de sodio y proteínas de suero (Soukoulis *et al.*, 2014), o pululano y almidón (Kanmani & Lim, 2013).

Tabla 2: Humedad de películas mixtas de proteínas de suero y kefirán (6:2) conteniendo diferentes cantidades de glicerol cada 100 g de macromoléculas, obtenidas por deshidratación de las formulaciones mediante convección natural o convección forzada de aire.

Formulación		6:2 ₃₅	6:2 ₄₀	6:2 ₄₅	6:2 ₅₀
Humedad (%)	Convección natural	24.9± 1.2	25.3± 2.3	27.2 ± 1.5	27.1 ± 3.1
	Convección forzada	23.8 ± 2.1	26.9 ± 2.3	26.2 ± 5.5	29.7 ± 3.5

El espesor de las películas varió entre 132 y 187µm (Figura 2). Se observó una tendencia a mayores valores de espesor con el aumento en el contenido de plastificante. Para cada contenido de glicerol el espesor medio resultó independiente de la metodología de secado utilizada para obtener las películas. Por otra parte, la utilización de convección forzada en el secado condujo a mayor heterogeneidad en el espesor, que se reflejó en elevados valores de desvíos estándar.

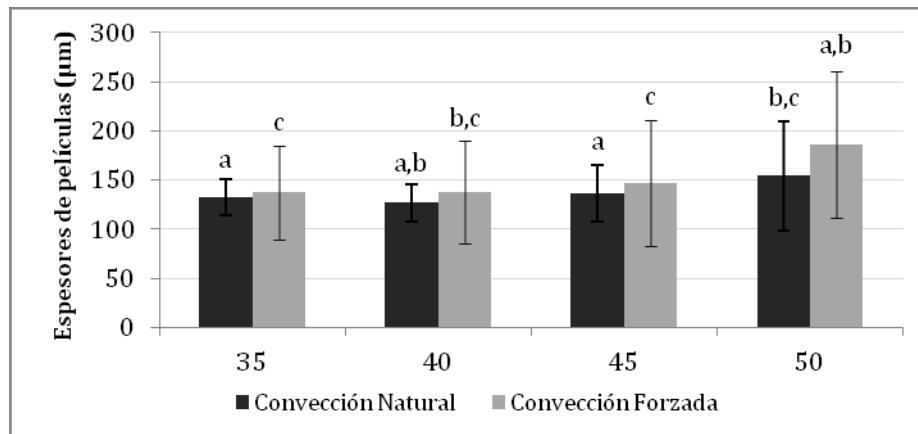


Figura 2: Espesor de películas de kefirán y proteínas de suero (6:2) conteniendo diferentes concentraciones de glicerol en su formulación (35, 40, 45 o 50 g cada

100g de la suma de macromoléculas), obtenidas mediante secado utilizando convección natural (barras oscuras) o convección forzada de aire (barras claras). *Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).*

La evaluación de las características mecánicas de las películas resulta de gran importancia ya que su desempeño durante la manipulación se relaciona con la apariencia y funcionalidad de las mismas. Películas conteniendo 30g de glicerol cada 100g de macromoléculas resultaron quebradizas (Figura 1) y aquellas que incluyeron glicerol en relaciones de 55 y 60 g cada 100 g de macromoléculas presentaron una elevada adhesividad, imposibilitando en ambos casos su evaluación mecánica.

A partir de los ensayos de tracción de las películas en texturómetro se obtuvieron los parámetros mecánicos resistencia máxima a la tracción, módulo de elasticidad y elongación máxima a la ruptura que se presentan en la Figura 3.

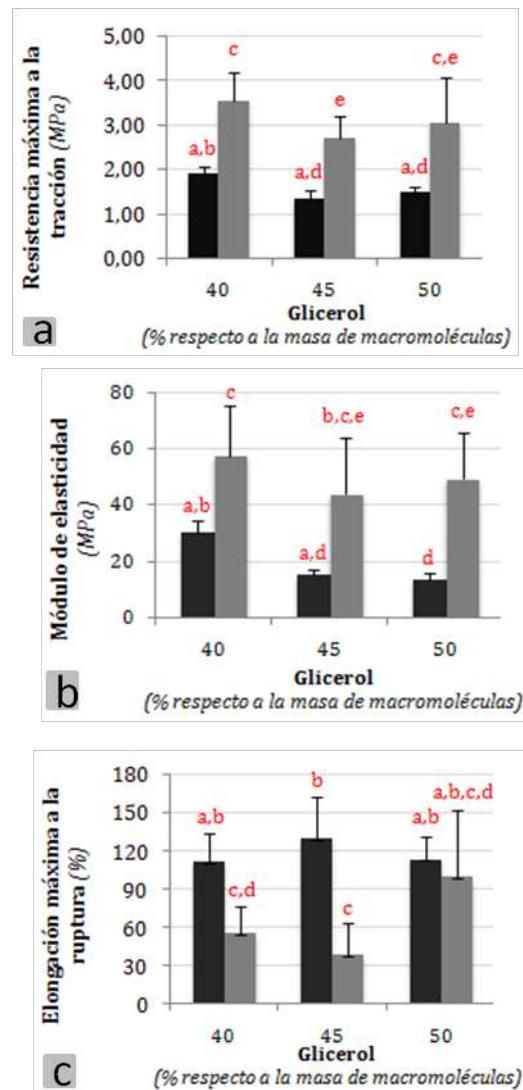


Figura 3: Resistencia máxima a la tracción (a), módulo de elasticidad(b) y elongación máxima a la ruptura (c) de películas de kefirán y proteínas de suero (6:2) conteniendo diferentes

concentraciones de glicerol en su formulación, obtenidas mediante secado por convección natural (barras oscuras) o convección forzada de aire (barras claras). *Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).*

Cuando las películas fueron obtenidas empleando convección forzada se observó mayor heterogeneidad en los valores de todos los parámetros mecánicos, en relación a los correspondientes a películas obtenidas empleando convección natural de aire durante el secado. Este hecho podría ser explicado por la heterogeneidad en el espesor de estas películas, descrita anteriormente, y la influencia del mismo en las características mecánicas.

Respecto a la permeabilidad al vapor de agua, se hallaron valores de $2.28 \times 10^{-10} \text{g.}(\text{seg.m.Pa})^{-1}$ para las 6:2 siendo este resultado intermedio entre aquellos obtenidos para películas constituidas sólo por kefiran ($6.84 \times 10^{-11} \text{g.}(\text{seg.m.Pa})^{-1}$) o sólo por proteínas de suero de leche ($2.85 \times 10^{-10} \text{g.}(\text{seg.m.Pa})^{-1}$) plastificadas con glicerol, valores coincidentes con los descriptos por Piermaria *et al.* (2011).

La microestructura de una matriz se encuentra íntimamente relacionada con sus propiedades. En la Figura 4 se muestran cortes transversales de películas 6:2 plastificadas con 40% de glicerol que fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido. Se pudo observar una estructura homogénea y compacta para películas obtenidas mediante las dos metodologías de secado estudiadas. Esto último reforzaría la hipótesis planteada anteriormente, indicando que las variaciones encontradas en el comportamiento macroscópico de películas obtenidas al deshidratar mediante convección forzada se deberían a la heterogeneidad presente en los espesores y la influencia de este parámetro en sus características finales, más que a una diferencia estructural hallada entre las matrices obtenidas.

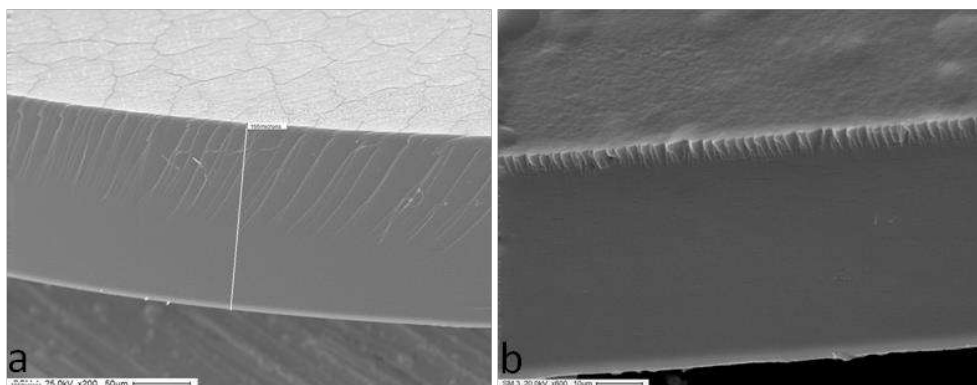


Figura 5: Microfotografías electrónicas de barrido con 200 aumentos de cortes transversales de películas mixtas de kefirán y proteínas de suero (6:2_{40%}) obtenidas mediante convección forzada de aire (a) o convección natural (b).

4. Conclusiones

Las películas conteniendo la relación proteína:polisacárido 6:2 y 40% p/p de glicerol presentaron las mejores características mecánicas. La utilización de convección forzada de aire en la etapa de secado redujo los tiempos de obtención de las mismas respecto a la utilización de convección natural, sin embargo condujo a características mecánicas inferiores y mayor heterogeneidad en los parámetros fisicoquímicos.

Estas películas se presentan como una alternativa para su inclusión en alimentos mejorando la calidad nutricional de los mismos debido a la incorporación de proteínas de alto valor biológico y otorgando valor agregado por la inclusión de kefirán, polisacárido bacteriano con interesantes propiedades tanto prebióticas como tecnológicas.

5. Agradecimientos

El desarrollo de este trabajo fue realizado con el soporte de los proyectos PICT 2016-0639 de la ANPCyT, PIP 2012-0511 del CONICETyPPID 2017-X018 de la UNLP.

6. Referencias

- Abraham, A. G., Medrano, M., Piermaria, J. A., & Mozzi, F. (2010). Novel applications of polysaccharides from lactic acid bacteria: a focus on kefirán. *Food Hydrocolloids: Characteristics, properties and structures*, 253-271.
- Foegeding, E. A., Davis, J.P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*.13, 151-159.
- Furuno, T., & Nakanishi, M. (2012). Kefiran suppresses antigen-induced mast cell activation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(2), 178-183.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Hamet, M. F., Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2016). Oral administration of kefirán exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial microbes*, 7(2), 237-246.
- Han, J. H. & Floros, J.D. (1997) Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film Sheet*, 13, 287-298.

- Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food chemistry*, 141(2), 1041-1049.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379-386.
- Medrano, M., Hamet, M. F., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2009). Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4), 505.
- Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1), 1-7.
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5299-5304.
- Pereira, J. O., Soares, J., Sousa, S., Madureira, A. R., Gomes, A., & Pintado, M. (2016). Edible films as carrier for lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 543-550.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., García, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25, 1261-1269.
- Piermaria, J.A., De la Canal, M.L. & Abraham, A.G., 2008. Gelling properties of kefiran, a food grade polysaccharide obtained from kefir grains. *Food Hydrocolloid* 22: 1520-1527.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 193-199.
- Piermaria, J., Pinotti, A., García, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based of kefiran, an exopolysaccharide obtaneid from kefir grains. Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 684-690.
- Prommakool, A., Sajjaanantakul, T., Janjarasskul, T., & Krochta, J. M. (2011). Whey protein-okra polysaccharide fraction blend edible films: tensile properties, water vapor permeability and oxygen permeability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 362-369.
- Ramos, Ó. L., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45(1), 351-361.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A.G., Mozzi, F. and De los Reyes-Gavilán, C.G., 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Mayo, B., López, P. and Pérez-Martínez, G. (eds.) Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new application B. Research Signpost, pp. 137-166.
- Silva, K. S., Mauro, M. A., Gonçalves, M. P., & Rocha, C. M. R. (2016). Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 54, 179-188.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231-242.
- 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(3), 254-263.
- Zhang, Y. & Han, J. H. (2006). Plasticization of Pea Starch Films with Monosaccharides and Polyols. *Journal of Food Science*, 71, 253-261.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate polymers*, 109, 118-125.