



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



TRABAJO FIN DE MÁSTER  
Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad Alimentaria.  
Curso 2014/2015.

## VIABILIDAD DE AGENTES DE BIOCONTROL INCORPORADOS A RECUBRIMIENTOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Autor: VÍCTOR CERRUDO LÓPEZ

Directoras: Dra. Maite Cháfer Nácher<sup>1</sup> y Lorena Atarés Huerta<sup>1</sup>

Directora experimental: Anna Marín Gozalbo<sup>1</sup>

### RESUMEN

El control biológico es una de las alternativas más eficientes y prácticas a los fungicidas químicos para el control de enfermedades fúngicas en agricultura. Su aplicación práctica no ha tenido lugar en gran medida, debido a la sensibilidad de los agentes de biocontrol (ABCs) a las condiciones ambientales adversas, que dan lugar a variabilidad y poca reproducibilidad en los resultados. Se ha elegido el agente de biocontrol *Candida sake*, una levadura efectiva en el control de enfermedades postcosecha, así como en podredumbres de campo. Para ello se seleccionaron ingredientes formadores de recubrimiento compatibles con ABC. En concreto dos tipos de polímeros de origen vegetal, un polisacárido derivado de la celulosa (hidroxipropilmetilcelulosa, HPMC) y una proteína, la de guisante (PG). Para conseguir mejorar la adherencia del ABC en condiciones de aplicación, se incorporaron a las formulaciones tres tensoactivos de diferente hidrofobicidad (ácido oleico, Span 80 y Tween 85). Se obtuvieron películas y se caracterizaron sus propiedades físicas más relevantes. Después se formularon conjuntamente y se caracterizó la viabilidad del ABC tras el secado de las películas y a diferentes tiempos de almacenamiento en condiciones controladas (25°C, HR de 53 y 68%). Para entender mejor los resultados obtenidos, se analizó la microestructura de las películas por microscopía óptica. Los resultados muestran que las películas de HPMC tienen menos espesor, permeabilidad al vapor de agua y humedad en el equilibrio que las de PG. El ácido oleico disminuyó la permeabilidad al vapor de agua de las películas. La viabilidad del ABC durante el almacenamiento fue mayor en las películas de PG. La microscopía corroboró las diferencias encontradas en las propiedades físicas de las películas, y la idoneidad de la PG como soporte para el ABC.

Palabras clave: biocontrol, recubrimiento, *Candida sake*, películas comestibles, biopolímeros.

<sup>1</sup>: Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD-UPV).

## RESUM

El control biològic és una de les alternatives més eficients i pràctiques als fungicides químics per al control de malalties fúngiques en agricultura. La seua aplicació pràctica no ha tingut lloc en gran mesura, a causa de la sensibilitat dels agents de biocontrol (ABCs) a condicions ambientals adverses, que donen lloc a variabilitat i poca reproductibilitat en els resultats. S'ha triat l'agent de biocontrol *Candida sake*, un llevat efectiu en el control de malalties postcollita, però també en podridures de camp. Amb aquest fi se seleccionaren ingredients formadors de recobriments compatibles amb l'ABC. En concret dos tipus de polímers d'origen vegetal, un polisacàrid derivat de la cel·lulosa (hidroxipropilmetilcel·lulosa, HPMC) i una proteïna, la de pèsol (PP). Per aconseguir millorar l'adherència de l'ABC en condicions d'aplicació, es van incorporar a les formulacions tres tensoactius de diferent hidrofobicitat (àcid oleic, Span 80 i Tween 85). Es van obtenir les pel·lícules i es van caracteritzar les seues propietats físiques més rellevants. A continuació es van formular conjuntament i es va caracteritzar la viabilitat de l'ABC després de l'assecat de les pel·lícules i a diferents temps d'emmagatzemament a condicions controlades (25°C, HR de 53 i 68%). Per a comprendre millor els resultats obtinguts es va analitzar la microestructura de les pel·lícules per microscopia òptica. Els resultats mostren que les pel·lícules de HPMC tenen menys espessor, permeabilitat al vapor d'aigua i humitat en l'equilibri que les de PP. L'àcid oleic va disminuir la permeabilitat al vapor d'aigua de les pel·lícules. La viabilitat de l'ABC durant l'emmagatzemament va ser major en les pel·lícules de PP. La microscopia va corroborar les diferències trobades en les propietats físiques de les pel·lícules, i la idoneïtat de la PP com a suport per a l'ABC.

Paraules clau: biocontrol, recobriments, *Candida sake*, pel·lícules comestibles, biopolímers.

## ABSTRACT

Biological control is one of the most efficient and practical alternatives to chemical fungicides aiming to control fungal diseases in agriculture. It has not been broadly applied due to the sensitivity of the biocontrol agents (BCAs) to adverse environmental conditions, leading to variability and poor reproducibility of results. *Candida sake*, a yeast effective in controlling postharvest diseases, has been chosen as BCA. Two polymers have been utilized as film-forming carriers, namely hydroxypropylmethycellulose (HPMC) and pea protein (PP), which were compatible with the biocontrol agent. Three surfactants of differing hydrophobicity were incorporated to the formulations in order to improve the adherence of *Candida sake*, namely oleic acid, Span 80 and Tween 85. Films were obtained and their most relevant physical properties were studied. Once the BCA was incorporated into the edible films, its viability was characterized immediately after drying and over storage at controlled conditions (25°C, 53 and 68% RH). The microstructure of the films was observed with an optical microscope. HPMC films had lower thickness, water vapour permeability and equilibrium moisture content than those of PP. Oleic acid improved the water barrier properties of the films. *Candida sake* viability over storage was higher in PP films. Microstructural analysis was coherent with the physical properties studied and with the suitability of PP as carrier for the BCA.

Key words: biocontrol, films, coating, *Candida sake*, edible coatings, biopolymers.

## 1. INTRODUCCIÓN

La preocupación de la sociedad por los problemas medioambientales, así como por cuestiones de seguridad alimentaria, ha ido en aumento en los últimos años. Coherentemente, en la actualidad la industria alimentaria tiende a la reducción o eliminación de residuos químicos en los cultivos (Sui *et al.*, 2015). En este sentido, el control biológico es una de las alternativas más ampliamente estudiadas y de mayor potencial. El control biológico o biocontrol consiste en la utilización de organismos vivos (agentes de biocontrol, ABCs o antagonistas) que tienen una acción específica contra otros organismos que son patógenos y causan deterioro de cultivos en campo y/o durante el periodo postcosecha (Usall *et al.*, 2000). En la actualidad, el biocontrol es una de las alternativas más efectivas y prácticas a la utilización de fungicidas químicos en agricultura (Cañamás *et al.*, 2011). Durante los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos para comprender el modo de acción de los ABCs y para mejorar su viabilidad, ya que su sensibilidad a condiciones ambientales adversas deriva en una baja reproducibilidad y control en condiciones prácticas de aplicación (Droby *et al.*, 2009).

Una de las posibles estrategias para disminuir la sensibilidad de los ABCs es su aplicación conjunta con recubrimientos comestibles (RCs). Estos recubrimientos se definen como finas capas de material comestible (Lacroix y Dang Vu, 2014), y pueden proteger a los ABCs de condiciones ambientales adversas, mejorando su adherencia sobre la superficie a proteger. De ese modo se pueden conseguir resultados de efectividad comparables a los de los fungicidas químicos (Cañamás *et al.*, 2008a; 2008b; 2011). Los RCs pueden estar constituidos por diferentes biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos, lípidos o mezclas de los mismos. Otros componentes, tales como plastificantes o tensoactivos, pueden incorporarse con diversos fines (Han, 2009). En términos generales, polisacáridos y proteínas proporcionan buenas propiedades mecánicas y organolépticas a las películas y, además, son barreras efectivas frente a componentes aromáticos y gases (oxígeno y dióxido de carbono). Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, no suponen una buena barrera a la transferencia de agua (Fabra *et al.*, 2008). Con el fin de mejorar estas propiedades de las películas, se pueden incorporar lípidos o agentes tensoactivos. La adición de tensoactivos además puede reducir la tensión superficial de las dispersiones formadoras de RCs, lo cual facilitaría su aplicación directa sobre los vegetales. No obstante, estas incorporaciones deben ser analizadas en profundidad, ya que pueden empeorar las propiedades mecánicas de las películas o afectar a la compatibilidad entre la matriz y el ABC.

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un hidrocoloide derivado de la celulosa comúnmente utilizado en la formulación de películas comestibles debido a sus buenas propiedades mecánicas. Es transparente y flexible y posee una permeabilidad al

oxígeno moderada. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, los RCs de HPMC constituyen una débil barrera al vapor de agua (Pastor *et al.*, 2010). Por su parte, las películas a base de proteínas presentan excelentes propiedades barrera frente al oxígeno y alta permeabilidad al vapor de agua. Como en el caso del HPMC, esta deficiencia puede mejorarse mediante la incorporación de lípidos a la formulación. No son muchos los estudios que se han realizado con proteína de guisante (PG) como base para la formación de películas. No obstante, sus propiedades son similares a las de proteína de soja, y además, el guisante es el principal cultivo "proteico" en la Unión Europea (Kowalczyk y Baraniak, 2011).

En la bibliografía se han encontrado diversos estudios en los que se utilizan diferentes ABCs para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos a través de su incorporación en RCs. Fundamentalmente, se han estudiado las bacterias lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*, empleándose para el control de *Listeria monocytogenes* (Gialamas *et al.*, 2010; Sánchez-González *et al.*, 2014). Por su parte, la utilización de levaduras para el control de enfermedades fúngicas en vegetales ha sido ampliamente estudiada (Liu *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2004).

Dentro de las levaduras, las del género *Candida* han tenido especial protagonismo en el biocontrol de enfermedades post-cosecha en frutas como manzana, cítricos y uva (Usall *et al.*, 2001; Droby *et al.*, 2003). Más concretamente, *Candida sake* ha resultado efectiva en el control de la podredumbre gris producida por *Botrytis cinerea* en uva, enfermedad que causa grandes pérdidas en un cultivo de gran importancia en España (Calvo-Garrido *et al.*, 2013). Sin embargo, existen pocos estudios que aborden en profundidad la mejora de la actividad antifúngica de levaduras mediante su aplicación conjunta con RCs (Aloui *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2009; McGuire y Dimitrioglou, 1999).

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización de películas biodegradables para su aplicación junto al ABC *Candida sake*, así como el estudio de la viabilidad del antagonista en las mismas. Para alcanzar este objetivo general, se plantean como objetivos específicos:

1. Caracterización de propiedades físico-químicas en las películas, con y sin adición de tensoactivos con diferente balance hidrófilo-lipófilo (BHL).
2. Evaluación de la viabilidad del ABC en las películas a lo largo del tiempo de almacenamiento a humedad y temperatura controladas.

Los componentes seleccionados para formular las películas fueron hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y proteína de guisante (PG). Los componentes minoritarios fueron tensoactivos con diferente BHL: ácido oleico (AO, BHL = 1,0), el monooleato de sorbitán o Span<sup>®</sup> 80 (S80, BHL = 4,3) y el trioleato polietilenglicol de sorbitán o Tween<sup>®</sup> 85 (T85, BHL = 11,0).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Preparación de las películas**

La PG fue suministrada por Roquette Laisa España, S.A., (Valencia), y HPMC y los tres tensoactivos por Sigma-Aldrich (Madrid). Por su parte, el glicerol, utilizado como plastificante en las películas de PG fue adquirido en Panreac Química S.L.U., (Barcelona).

HPMC (2% p/p) se dispersó en agua desionizada y se calentó hasta 80°C durante 10 minutos, tras los cuales se mantuvo en agitación toda la noche. La PG (2% p/p) fue dispersada en agua desionizada a temperatura ambiente durante unas 2 horas. Tras la completa dispersión de los polímeros, se incorporaron los tensoactivos en una proporción polímero:tensoactivo de 1:0,1. Asimismo, el glicerol se añadió en las dispersiones de PG en una proporción másica PG:glicerol de 1:0,25. Las concentraciones de biopolímeros, así como las proporciones polímero:glicerol y polímero:tensoactivo, se seleccionaron en base a estudios previos (Jiménez *et al.*, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2013). Las dispersiones se homogeneizaron a 13600 rpm durante 4 minutos con un rotor stator ultraturrax (DI25, Janke and Kunkel, Alemania), se esterilizaron para reducir su carga microbiana y se desgasificaron a vacío mediante una bomba (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania). Las dispersiones formadoras de recubrimiento (DFR) obtenidas se designaron como: HPMC, HPMC-AO, HPMC-S80, HPMC-T85, PG, PG-AO, PG-S80 y PG-T85.

Para obtener las películas, se procedió al vertido en placas de teflón de 15 cm de diámetro colocadas sobre una superficie nivelada. En cada placa se vertieron 50 g de DFR, para obtener una concentración de 1 g de sólidos solubles por cada película, lo que equivale a una densidad superficial de sólidos de 5,6 mg/cm<sup>2</sup>.

### **2.2. Caracterización de las propiedades físicas de las películas**

#### *2.2.1. Espesor*

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro electrónico digital modelo Palmer (Comecta, Barcelona, España) con una sensibilidad de 0,001 mm. Se tomaron valores en 6 puntos de cada película de manera aleatoria. Estas medidas se utilizaron para el tratamiento de resultados en los ensayos de permeabilidad al vapor de agua. Las medidas se tomaron en cuatro películas por formulación.

#### *2.2.2. Humedad*

El contenido en humedad de las películas equilibradas a humedad relativa controlada se determinó mediante un método gravimétrico utilizando una balanza analítica (ME36S, Sartorius, Alemania). Tras 7 días de acondicionamiento en desecadores de vidrio, las muestras se cortaron en pequeños fragmentos y se depositaron en crisoles de vidrio.

Éstos se dejaron destapados en una estufa de convección a 60°C durante 24 h para eliminar el agua más accesible y superficial, y posteriormente se introdujeron en una estufa de vacío a la misma temperatura. Por último, los crisoles permanecieron en un desecador con pentóxido de fósforo (Panreac Química, S.A. Castellar de Vallés, Barcelona) durante 15 días, hasta que se alcanzó una masa constante. Después de este tiempo, los fragmentos de película totalmente deshidratados se pesaron en la balanza analítica y se calculó el contenido de humedad de las películas en base seca (g agua/ g película seca).

### 2.2.3. Permeabilidad al vapor de agua

Para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para un gradiente de humedad 53 - 100%. Se recortaron cuatro muestras circulares para cada formulación de 3,5 cm de diámetro, seleccionando películas sin defectos visibles. Estas muestras se acoplaron sobre copas de aluminio (3,5 cm diámetro, Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se había depositado 5 mL de agua destilada (HR 100%). La cara de la película en contacto con el aire durante el secado se colocó en cada caso hacia el ambiente (HR del 53% para la temperatura de 25°C). Para asegurar la hermeticidad del sistema, se colocó un anillo de caucho y dos mordazas. Las copas se introdujeron en un soporte con un ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados con soluciones saturadas de nitrato magnésico (Panreac Química, S.A. Castellar de Vallés, Barcelona). Los desecadores se almacenaron en una cámara Hotcold UL (JP Selecta, Barcelona) y se monitorizó la masa de las copas con una balanza analítica (ME36S, Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante un periodo de tiempo de 24 h. La pendiente de la representación de la pérdida de masa frente al tiempo, se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua (VTVA). La presión de vapor de agua en la cara interior de la película ( $p_2$ ) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.* (1993), para corregir el efecto de gradientes de concentración establecidos en el espacio de cabeza de la copa (ec.1).

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot \ln\left[\frac{(P-p_2)}{(P-p_1)}\right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (1)$$

Donde: P = presión total (atm); D = difusividad del agua en aire a 25°C ( $m^2/s$ ); R = constante de los gases ( $82.057 \cdot 10^{-3} m^3 atm kmol^{-1} K^{-1}$ ); T = temperatura (K);  $\Delta z$  = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final;  $p_1$  = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm);  $p_2$  = presión de vapor corregida en la cara interior de la película. Utilizando la ecuación (2), la PVA se calculó a partir de  $p_2$ , la presión de vapor de agua en la cara exterior de la película ( $p_3$ ) y el espesor (e).

$$PVA = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot e \quad (2)$$

#### 2.2.4. Permeabilidad al oxígeno

La permeabilidad al oxígeno (PO) se midió a 53% HR y 25°C utilizando un equipo OX-TRAN modelo 2/21 ML Mocon (Lippke, Neuwied, Germany), en tres muestras por formulación. Se determinó la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) cada 20 minutos hasta que se alcanzó el equilibrio. Este valor se transformó en permeabilidad al oxígeno (PO) teniendo en cuenta el gradiente de presión de oxígeno a ambos lados de la película y el espesor de la misma. El área de exposición al flujo de oxígeno durante el ensayo fue 50 cm<sup>2</sup>.

### 2.3. Caracterización de la viabilidad del ABC incorporado a las películas

#### 2.3.1. Preparación del inóculo de *Candida sake*

La levadura *Candida sake* fue aislada de la superficie de manzanas por el centro UdL-IRTA (Lleida, España) y fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT-10817) en la Universidad de Valencia (Burjassot, España). El proceso seguido para la producción celular fue el descrito por Cañamás *et al.* (2011).

En primer lugar, se partió de una triple estría de *C. sake* incubada en una estufa a 25°C durante 48 h en medio tripticasa-soja agar (TSA) (Scharlab, Barcelona, España), a partir de la cual se preparó una suspensión de células en agua estéril. Posteriormente, se calculó el volumen de suspensión necesario para inocular una concentración de 10<sup>4</sup> UFC/mL en un medio líquido con una composición de 40 g/L de melazas y 1,2 g/L de urea. Por último, el medio líquido se incubó durante 48 h a 25°C y 150 rpm. Las células se separaron del medio de crecimiento por centrifugación durante 10 minutos, a 10°C y 8631 x g. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó la pasta de células con el volumen de agua estéril necesario para mantener la concentración.

#### 2.3.2. Obtención de películas con *Candida sake* y determinación de la viabilidad

Con el fin de obtener películas con el ABC, a las DFR se les adicionó el volumen necesario de la suspensión de *C. sake* para conseguir una concentración de 5·10<sup>7</sup> UFC/película. Las dispersiones fueron agitadas a 150 rpm durante 10 minutos para conseguir una distribución homogénea del microorganismo. El vertido se realizó del modo descrito en el apartado 2.1., obteniéndose una densidad superficial de UFC de 2,8·10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

Después del secado (unas 48 h a 25°C y 45% HR), las películas se separaron de las placas de teflón cuidadosamente utilizando unas pinzas estériles. La viabilidad de *C. sake* fue determinada en las películas inmediatamente después del secado y tras diferentes tiempos de almacenamiento (7, 14 y 21 días). El almacenamiento tuvo lugar en desecadores a 25°C y a humedades de 53% y 68% conseguidas con disoluciones sobresaturadas de nitrato de magnesio y yoduro de potasio (Panreac Química, S.L.U, Barcelona) respectivamente.

Para determinar la viabilidad de *C. sake*, se introdujeron muestras de película en bolsas de plástico estériles que contenían agua destilada estéril con Tween 85 al 0,01% (p/v). Se homogeneizaron durante 6 minutos en un Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience). Se realizaron diluciones seriadas por duplicado (hasta un máximo de  $10^{-4}$ ), y se sembraron por superficie con un asa de Digrafsky en medio TSA con estreptomocina (0,5 g/L) para prevenir el crecimiento bacteriano. Tras 48 h de incubación a 25°C, se contaron las UFC en las placas cuyo número de colonias se encontraba entre 15 y 300.

#### **2.4. Microestructura de las películas con *Candida sake***

Para estudiar la estructura a nivel microscópico de las películas obtenidas, se depositaron pequeños fragmentos de éstas en un portaobjetos. Con un microscopio óptico (Química y medio ambiente S.L., Leica) se capturaron imágenes con los objetivos de 20x y 63x. Se tomaron imágenes a distintas semanas para estudiar las posibles diferencias en la estructura y densidad de las células de *Candida*.

#### **2.5. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test LSD. Los cálculos se realizaron con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.2.04).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Caracterización de las propiedades físicas de las películas**

La caracterización de las películas se realizó en muestras que no incorporaban los ABCs ya que estudios previos habían demostrado que estas propiedades apenas cambiaban por efecto de la incorporación de microorganismos (Sánchez-González *et al.*, 2013; Aloui *et al.*, 2015).

##### *3.1.1. Espesor*

La tabla 1 muestra los resultados del espesor de todas las películas estudiadas. Todos ellos estuvieron comprendidos entre 43 y 56  $\mu\text{m}$ . Los mayores espesores se dieron en las películas de PG, lo que podría atribuirse a un mayor grado de empaquetamiento de las cadenas de polisacáridos en las películas de HPMC, lo que dio lugar a menores espesores. La incorporación de tensoactivos causó un cierto aumento en el grosor de las películas, atribuible a la formación de estructuras matriz-tensoactivo más heterogéneas que las de biopolímero y de densidad menor.

##### *3.1.2. Humedad y permeabilidad al vapor de agua*

Los resultados obtenidos para la humedad de equilibrio y la PVA se muestran en la tabla 1. Las películas obtenidas con HPMC demostraron tener mejores propiedades



barrera frente al vapor de agua que las de PG, lo que podría estar relacionado con el menor contenido en humedad de estas películas. El agua actúa como plastificante en las películas, y su presencia en mayor proporción puede favorecer el transporte de agua a través de la película, aumentando la permeabilidad.

La incorporación de tensoactivos tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la PVA en función de sus características y el tipo de polímero. La incorporación de AO indujo cierto descenso de la PVA, probablemente debido a su carácter hidrofóbico (Fabra *et al.*, 2008). En estudios previos incluso se ha señalado la formación de una estructura bicapa (Zhong *et al.*, 2011). Por otra parte, la incorporación de S80 y T85 no tuvo este efecto. Este diferente comportamiento de los tensoactivos puede estar relacionado con las interacciones matriz-tensoactivo que introducen diferencias estructurales en las películas obtenidas en cada caso. La adición de S80 y T85 pudo ocasionar interrupciones en el empaquetamiento de las cadenas de hidrocoloides, lo cual dio lugar a películas menos homogéneas. Esto pudo suponer una estructura más abierta a través de la cual las moléculas de agua podrían difundir más fácilmente (Ortega-Toro *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Espesor ( $\mu\text{m}$ ), humedad de equilibrio tras el equilibrado al 53% HR (% agua), permeabilidad al vapor de agua ( $(\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$ ) y permeabilidad al oxígeno ( $\text{cm}^3\cdot\text{mm}/\text{m}^2\text{ atm}\cdot\text{día}$ ) de las películas. Valores medios, desviaciones (entre paréntesis) y análisis estadísticos.

Película	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	% Humedad	PVA ( $\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$	PO ( $\text{cm}^3\cdot\text{mm}/\text{m}^2\text{ atm}\cdot\text{día}$ )
HPMC	43,8 (0,8) <sup>a</sup>	5,0 (1,3) <sup>b</sup>	62 (17) <sup>a</sup>	>ld
HPMC-AO	48 (4) <sup>ab</sup>	3,6 (1,6) <sup>a</sup>	49 (3) <sup>a</sup>	>ld
HPMC-S80	52 (5) <sup>ab</sup>	3,6 (0,4) <sup>a</sup>	81 (13) <sup>a</sup>	>ld
HPMC-T85	49 (4) <sup>ab</sup>	4,3 (0,5) <sup>ab</sup>	68 (13) <sup>a</sup>	>ld
PG	48 (3) <sup>ab</sup>	9,4 (0,5) <sup>d</sup>	171 (5) <sup>c</sup>	5,4 (0,7) <sup>a</sup>
PG-AO	51 (9) <sup>ab</sup>	6,7 (0,4) <sup>c</sup>	131 (28) <sup>b</sup>	8,8 (0,8) <sup>b</sup>
PG-S80	54 (5) <sup>b</sup>	6,9 (0,5) <sup>c</sup>	156 (14) <sup>bc</sup>	5,63 (0,19) <sup>a</sup>
PG-T85	56 (8) <sup>b</sup>	8,5 (0,4) <sup>d</sup>	180 (47) <sup>c</sup>	6,2 (0,9) <sup>a</sup>

Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las formulaciones. HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85. >ld: superior al límite de detección

### 3.1.3. Permeabilidad al oxígeno

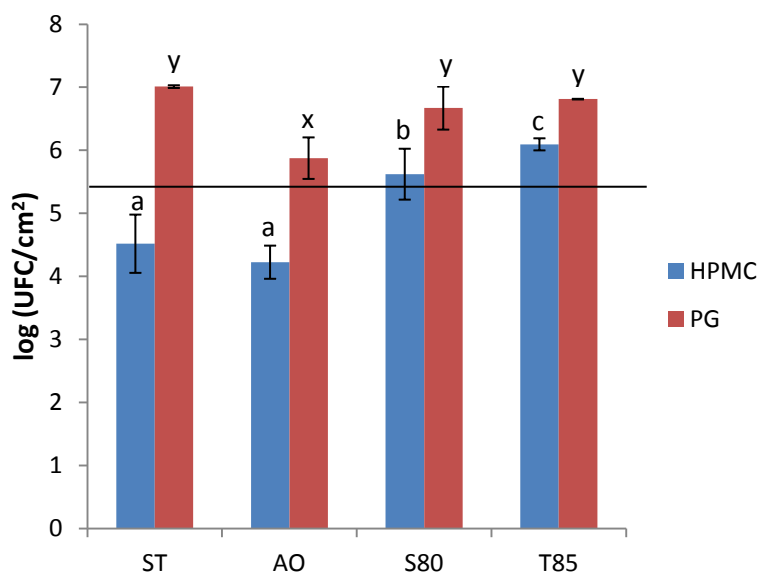
Los resultados de PO de las películas a base de PG se muestran en la tabla 1. Las medidas correspondientes a las películas de HPMC no se pudieron obtener por ser superiores al límite de detección del equipo ( $200 \text{ cm}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ ).

La incorporación de tensoactivos produjo cierto aumento de la PO, que fue estadísticamente significativo en el caso del AO ( $p < 0,05$ ). Estos resultados son coherentes con el carácter hidrofóbico de este tensoactivo, así como con la tendencia encontrada para la PVA. La incorporación de componentes hidrófobos potencia las interacciones lípido-polímero, introduciendo irregularidades estructurales en el seno de la matriz, que aumentan el intercambio gaseoso y la PO, tal y como ha sido descrito en diferentes trabajos (Zhong *et al.*, 2011; Ortega-Toro *et al.*, 2014).

## 3.2. Caracterización de la viabilidad del ABC incorporado a las películas

### 3.2.1. Viabilidad de *Candida sake* inmediatamente después del secado

Tras el secado de las películas, se procedió a realizar los recuentos correspondientes a tiempo inicial con el objetivo de comprobar si el periodo de secado tiene influencia en los niveles poblacionales de *C. sake*. En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones ensayadas.



**Figura 1.** Viabilidad de *Candida sake* en  $\log (\text{UFC}/\text{cm}^2)$ , para las formulaciones estudiadas. Donde HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, ST: sin tensoactivo, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los tensoactivos utilizados ( $^{abc}$  para HPMC y  $^{xyz}$  para PG). La línea horizontal representa el  $\log (\text{UFC}/\text{cm}^2)$  inoculado para verter las dispersiones.

Como se puede observar, la viabilidad de *C. sake* tras el periodo de secado de las películas fue mayor en aquéllas a base de PG en comparación con las de HPMC. Esto podría ser debido a la hidrólisis de la proteína durante la etapa de esterilización, que dio lugar a la presencia de aminoácidos libres que supondrían un nutriente para las levaduras. De hecho, la población microbiana en todas las películas de PG es mayor que la que se inoculó, lo cual parece indicar cierto crecimiento durante el periodo de secado. Por el contrario, el HPMC no supuso un soporte tan nutritivo para *C. sake* (figura 1). Las diferencias encontradas entre ambas matrices son coherentes con estudios previos. Sánchez-González *et al.* (2013) estudiaron la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* en películas a base de PG y HPMC, entre otras, y observaron que las películas proteicas permitieron una mayor viabilidad del microorganismo tras el periodo de secado que aquéllas a base de polisacáridos. En el presente estudio, el análisis estadístico no muestra un patrón claro en cuanto al efecto de los tensoactivos en la viabilidad. Sin embargo, de forma general, AO es el que menos favorece la supervivencia de la levadura.

### 3.2.2. Humedad de las películas

Con el fin de analizar los resultados de la evolución de la viabilidad de *C. sake* durante un almacenamiento a las diferentes humedades relativas, se determinó la humedad de equilibrio de las películas con el antagonista a los dos niveles de HR ensayados (53 y 68%). Para ello se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para todas las formulaciones. Al comparar los resultados de humedad de la tabla 2 con los de la tabla 1 (sin ABC) se observan ciertas diferencias entre ellos. Sánchez-González *et al.* (2013) también encontraron diferencias para esta variable al incorporar bacterias del género *Lactobacillus*. Según Romano *et al.* (2014) el nivel de humedad de los films se puede correlacionar con su viabilidad durante el almacenamiento.

**Tabla 2.** Porcentaje de humedad en base seca de las películas tras el acondicionamiento a 53% y 68% de humedad relativa con agente de biocontrol. Valores medios, desviaciones (entre paréntesis) y análisis estadísticos.

Película	% Humedad (53% HR) con ABC	% Humedad (68% HR) con ABC
HPMC	4,436 (1,105) <sup>ax</sup>	4,2 (0,7) <sup>ax</sup>
HPMC-OA	2,72 (0,17) <sup>ax</sup>	3,1 (0,3) <sup>ax</sup>
HPMC-S80	3,09 (0,12) <sup>ax</sup>	3,9 (0,2) <sup>ax</sup>
HPMC-T85	3,1471 (0,1102) <sup>ax</sup>	3,67 (0,09) <sup>ax</sup>
PG	8,7 (0,4) <sup>bx</sup>	13,4 (1,5) <sup>by</sup>
PG-OA	7 (3) <sup>bx</sup>	13 (3) <sup>by</sup>
PG-S80	8,7 (0,7) <sup>bx</sup>	16 (4) <sup>by</sup>
PG-T85	8,8 (0,3) <sup>bx</sup>	12,76 (1,06) <sup>by</sup>

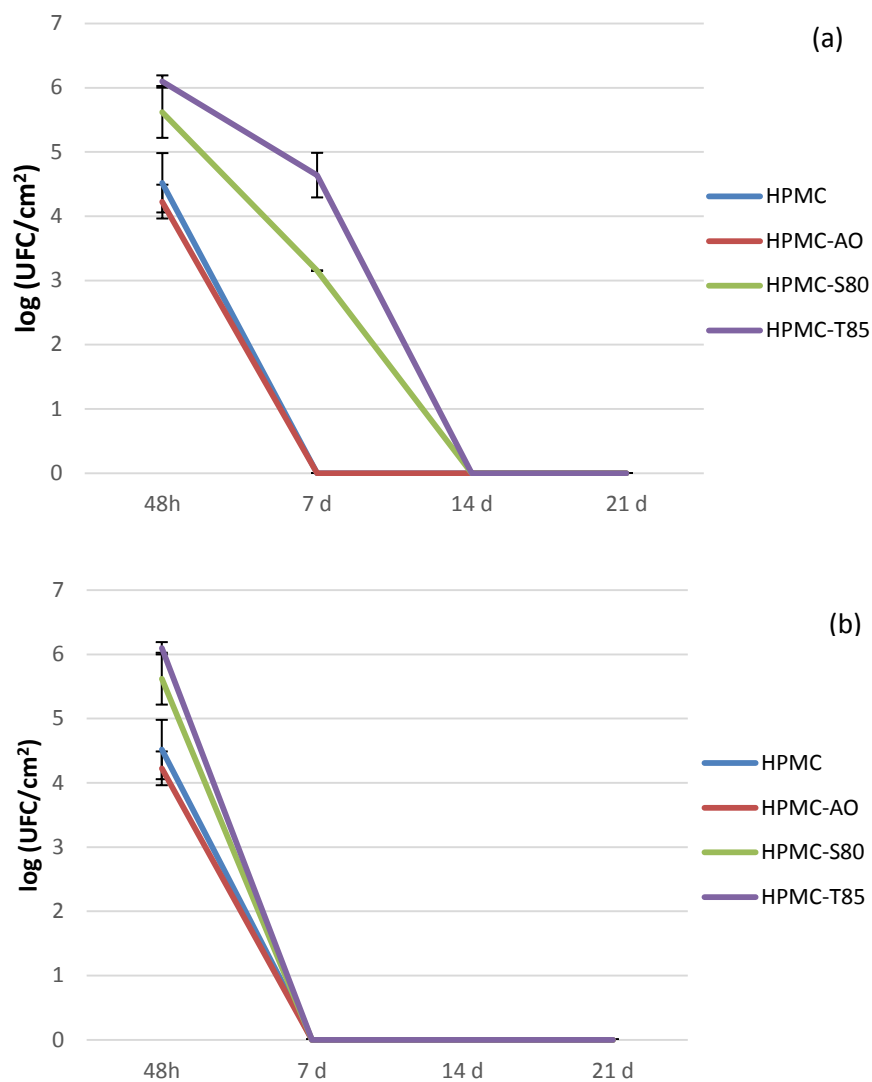
Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las formulaciones <sup>abc</sup> y entre condiciones <sup>xyz</sup>. HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

Las formulaciones a base de PG presentaron un contenido en humedad significativamente mayor que las películas de HPMC ( $p < 0,05$ ). Además, la humedad relativa de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la humedad de las películas de PG, mientras que no afectó significativamente al contenido en agua de las películas de HPMC.

Por otra parte, la presencia de tensoactivos produjo un descenso de la humedad para ambos polímeros, coherentemente con estudios anteriores (Ortega-Toro *et al.*, 2014). Esto podría deberse a que la incorporación de los tensoactivos reduce la capacidad de las cadenas de hidrocoloides para unirse con moléculas de agua. El establecimiento de puentes de hidrógeno entre las cadenas de hidrocoloides y los grupos polares de los tensoactivos reduciría el número de grupos polares disponibles para interactuar con el agua (Villalobos *et al.*, 2006). No se observaron diferencias significativas por efecto del tipo de tensoactivo, aunque en general parece que cuanto más hidrófilo mayor es el nivel de humedad del film en el equilibrio.

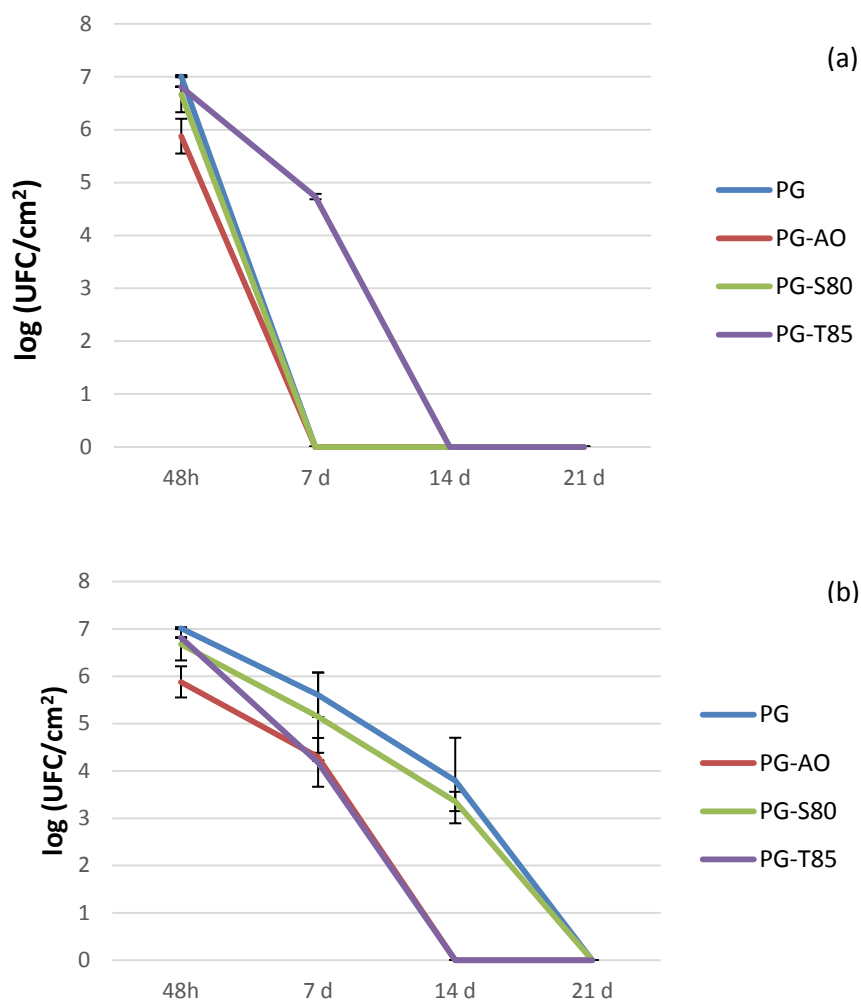
### 3.2.3. Evolución de la viabilidad de *Candida sake* durante el almacenamiento

En las figuras 2 y 3 se muestra la evolución de la viabilidad de *C. sake* en las formulaciones de HPMC y PG, respectivamente, para los diferentes tiempos ensayados (48 h y 7, 14 y 21 días de almacenamiento).



**Figura 2.** Evolución de la viabilidad de *Candida sake* a lo largo del tiempo de almacenamiento a una HR de 53% (a) y 68% (b) en las películas de HPMC. Donde HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

En el caso de las películas de HPMC (figura 2), y puesto que la humedad relativa no tuvo un efecto significativo en la humedad de las películas, se han considerado todas las repeticiones en la presentación de los resultados. Tras solamente 7 días de almacenamiento, la viabilidad se vio muy reducida en las películas de HPMC-S80 y HPMC-T85, y totalmente reducida para HPMC y HPMC-AO. Así pues, nuestros resultados confirman las inadecuadas características de este polímero para mantener la supervivencia del microorganismo, tal y como apuntan Sánchez-González *et al.* (2013).



**Figura 3.** Evolución de la viabilidad de *Candida sake* a lo largo del tiempo de almacenamiento a una HR de 53% (a) y 68% (b) en las películas de proteína de guisante. Donde PG: proteína de guisante, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

Los resultados de la evolución de la viabilidad de *C. sake* en las películas a base de PG se muestran en la figura 3. En este caso, la HR de almacenamiento supuso diferencias en la humedad de las películas (tabla 2), de manera que a la menor humedad relativa ensayada, la evolución de la viabilidad es comparable a la obtenida para las películas de HPMC (figura 2). Así pues, en estas condiciones de almacenamiento las películas de PG no podrían considerarse como un entorno apropiado para la supervivencia del antagonista. Sin embargo, a la humedad relativa más elevada (68%), y por lo tanto para el mayor contenido en humedad de las películas, se encontró un mejor mantenimiento de la viabilidad del antagonista, lo cual podría estar ligado a la estructura más plastificada y permeable de las películas en estas condiciones. Así pues, mientras que para una humedad del 53% únicamente se detectó población con la formulación PG-T85 tras 7 días, a un 68% la población se mantuvo viable tras este

mismo tiempo en todas las formulaciones e incluso tras 14 días para las formulaciones PG y PG-S80.

En los resultados obtenidos de viabilidad se encontró una correlación con los descritos para las humedades de equilibrio en la tabla 2. En general, las HR y películas con los contenidos más altos en humedad entre 13-16% (formulaciones de PG acondicionadas a 68% de HR), fueron las que proporcionaron los valores más altos de viabilidad del ABC durante el almacenamiento. Por el contrario, los contenidos más bajos de humedad en las películas redujeron de forma proporcional la viabilidad de los ABC incorporados en ambas matrices. En el caso del HPMC, este efecto fue independiente de la HR en la que se almacenaron las películas, ya que las humedades de equilibrio de las mismas no se vieron afectadas por este factor, oscilando en torno al 4% en las matrices puras y descendiendo ligeramente al incorporar el tensoactivo hasta los niveles más bajos, en torno al 3% con el AO. Así pues, tanto el tipo de polímero como las condiciones de almacenamiento juegan un papel importante en la viabilidad del ABC.

Estudios previos han mostrado diversos resultados según el microorganismo incorporado y la naturaleza de la matriz polimérica. Sánchez-González *et al.* (2013) encontraron buenos resultados de viabilidad en diferentes especies de *Lactobacillus* (*reuteri*, *plantarum* y *acidophilus*) incorporadas a películas a base de proteínas y polisacáridos. La viabilidad fue mayor al utilizar proteínas (proteína de guisante y caseinato) como matriz de las películas. Otros autores también han descrito buenos resultados de viabilidad de *Lactobacillus sakei* en películas de caseinato (Gialamas *et al.*, 2010) y *Lactobacillus delbrueckii* y *plantarum* en películas de metilcelulosa (Romano *et al.*, 2014). En cuanto a trabajos previos utilizando levaduras, Aloui *et al.* (2015) encontraron buenos resultados de viabilidad en *Wickerhamomyces anomalous* incorporadas a films de alginato sódico y gomas de algarroba.

Otro efecto clave a considerar es la humedad relativa en la que se almacenan las películas bioactivas, ya que afecta a la humedad de equilibrio que alcanzarán y en consecuencia a la viabilidad del antagonista. Romano *et al.* (2014) mostraron un efecto significativo de este factor en la viabilidad de dos especies de *Lactobacillus* (*delbrueckii* y *plantarum*) en matrices de metilcelulosa con fructo-oligosacáridos. Así, a niveles altos de HR (75%), comparables con los de este estudio, se encontró la menor viabilidad de los microorganismos (tiempos de conservación menores a 15 días), y únicamente en la especie *plantarum*.

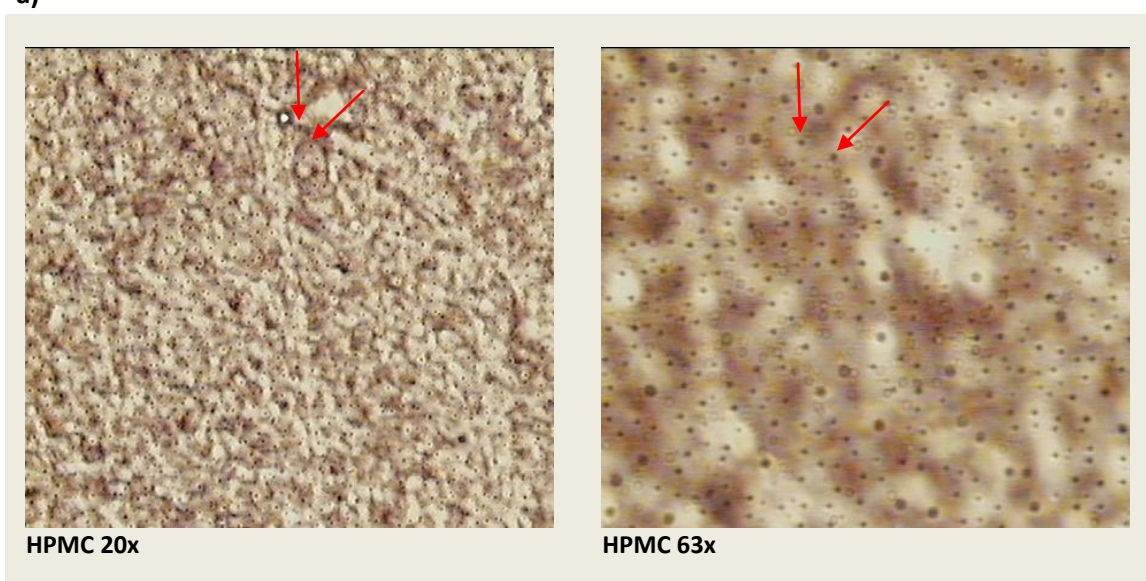
### **3.3. Análisis microestructural**

A continuación se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio óptico con el fin de estudiar la estructura microscópica y la disposición de las células de *Candida sakei* en los recubrimientos.

En la figura 4 se observa, a diferentes aumentos, la microestructura de las películas obtenidas con las matrices puras y el ABC. En general puede apreciarse que las películas de HPMC tienen un aspecto bastante homogéneo y una estructura más cerrada al compararlas con las de PG, en las que se aprecia mayor rugosidad y una estructura más abierta y porosa. Esto se correlaciona con los mayores valores de PVA obtenidos en PG en comparación con HPMC. Las películas de HPMC están formadas por cadenas de polisacáridos que otorgan un aspecto continuo a la matriz polimérica, como ha sido descrito en estudios previos para este tipo de películas (Jiménez *et al.*, 2010). Por el contrario, las películas de PG tienen una mayor rugosidad y presentan microestructuras de aspecto poroso en las que se aprecian gránulos redondos y depresiones características (Kowalczyk y Baraniak, 2011). La presencia de la *C. sake* en la estructura se aprecia claramente a 63x en las películas de HPMC, mientras que la estructura rugosa y con depresiones de las películas de la proteína no permite diferenciar tan claramente los antagonistas en las imágenes.

La incorporación de los tensoactivos cambió notablemente el aspecto de las películas, diferenciándose agregados de la fracción lipídica incorporada, que no queda integrada en el seno de la matriz polimérica, y de forma significativa en aquéllos de mayor hidrofobicidad (AO), como muestran las imágenes de la figura 5. De nuevo la matriz de HPMC permite diferenciar de forma más clara esta fracción lipídica (en forma de gotas esféricas) en comparación con la matriz de PG, en la que las depresiones dejan canales donde se sitúa la fase lipídica. Esto es coherente con los resultados obtenidos para las propiedades barrera de estas películas, puesto que el AO otorgó la mayor barrera al vapor de agua en comparación con las matrices puras. En los otros tensoactivos, al ser más hidrofílicos, se reducen las interacciones lípido-polímero y esto afecta en diferente medida a la PVA según la matriz.

a)

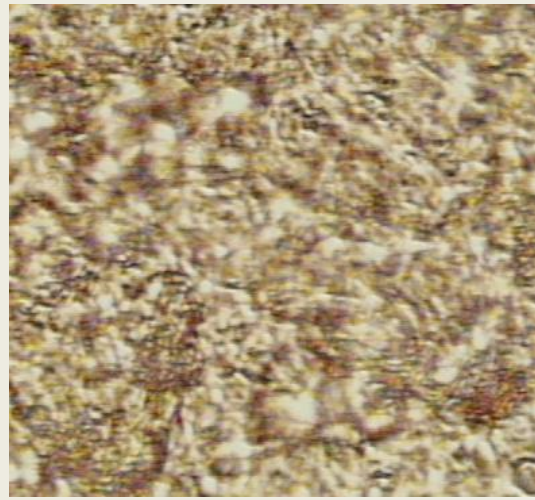




b)



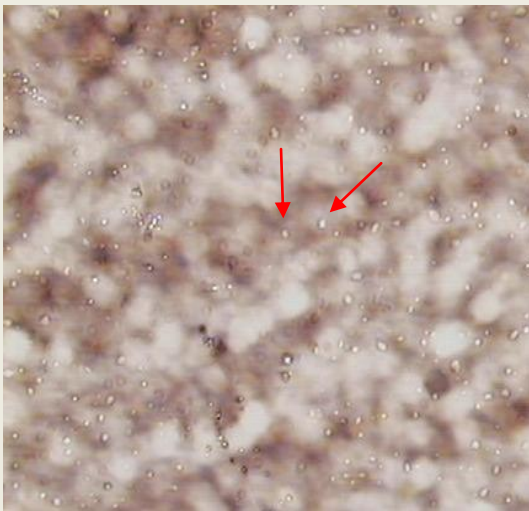
PG 20x



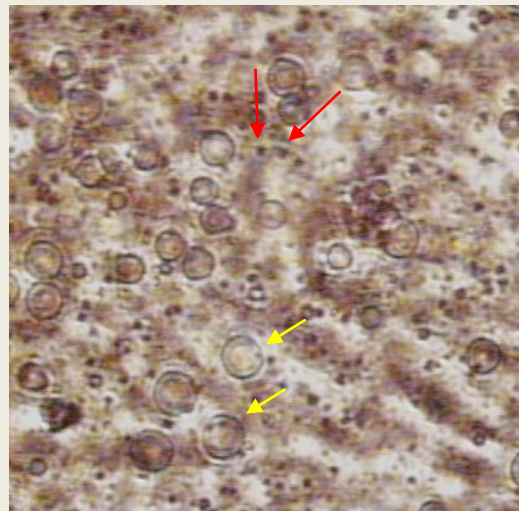
PG 63x

**Figura 4.** Imágenes de microscopía óptica de las películas de HPMC (a) y PG (b) con agentes de biocontrol a 20 y 63 aumentos, donde las flechas indican la presencia de *C. sake*.

a)

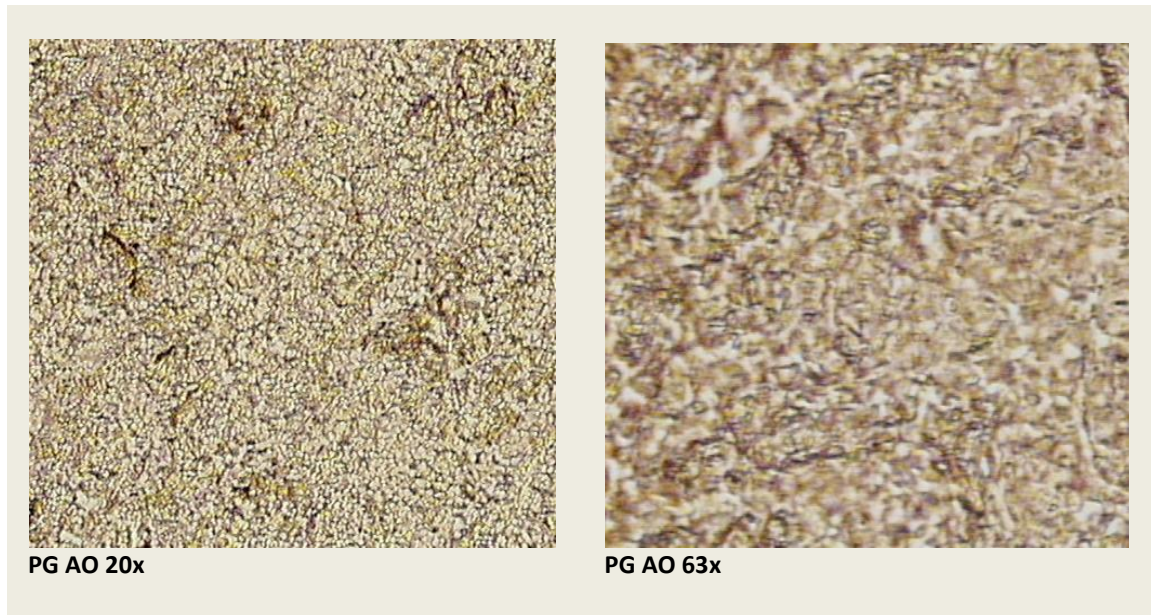


HPMC AO 20x



HPMC AO 63x

b)



**Figura 5.** Imágenes de microscopía óptica de las películas de HPMC-AO (a) y PG-AO (b) con agentes de biocontrol a 20 y 63 aumentos, donde las flechas rojas indican la presencia de *C. sake*, y las amarillas la de AO.

#### 4. CONCLUSIONES

Las propiedades físicas y microestructurales caracterizadas en las películas indican que las mayores diferencias están relacionadas con el tipo de polímero. El tensoactivo tiene un efecto menos marcado y depende de la matriz en la que se incorpore. Los tensoactivos más hidrofílicos (Span 80 y Tween 85) se integraron parcialmente en el seno de la matriz, mientras que el más hidrófobo (ácido oleico) formó agregados con el HPMC y recubrió las depresiones características de la matriz de PG. El ácido oleico fue el que mayor barrera al vapor de agua otorgó a las películas, al promover las interacciones lípido-polímero en el seno de la matriz.

La estructura abierta y porosa de la proteína le confirió mayor permeabilidad y humedad a las películas, lo que favoreció la fijación de los antagonistas y proporcionó mejores condiciones para su conservación durante el almacenamiento. Se constató además, que la humedad en el equilibrio de las películas fue un factor limitante y los mejores resultados se obtuvieron para niveles en torno al 13-16% en las películas de PG a 7 días de almacenamiento al 68% HR y 25°C.

Los resultados obtenidos demuestran además la necesidad de seguir profundizando en estudios para la mejora de la viabilidad de los antagonistas cuando son incorporados a la formulación de películas comestibles. En futuros estudios sería interesante considerar otros polímeros y HR de almacenamiento, así como la incorporación de aditivos que protejan al antagonista, para obtener viabilidades y tiempos de conservación mayores.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., Restuccia, C. (2015). Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 22–30.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P. A. G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., Teixidó, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, 62: 510-519.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N. (2008a). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest. Biol. Tec.* 49(1): 86-95.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. (2008b). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest. Biol. Tec.* 49(1): 96-106.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*. 56: 150-158.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Gaouth, A.D., Wilson, C. (2003). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 127-135.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145.
- Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53(1-2), 84–90.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G., Kousoumanis, K.P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*. 43: 2402-2408.
- Han, J.H. (2009). Innovations in food packaging, Chapter 9: Edible films and coatings: a review, 214-215. Elsevier Ltd.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate polymers* 82, 585-593.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films. *Food Hydrocolloids* 29, 265-271.
- Kowalczyk, D., Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering* 105: 295-305.

- Lacroix, M., Dang Vu, K. (2014). Innovations in food packaging, Chapter 11: edible coating and film materials: proteins, 277-278. Elsevier Ltd.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
- McGuire, R. G., Dimitroglou, D. A. (1999). Evaluation of shellac and sucrose ester fruit coating formulations that support biological control of post-harvest grapefruit decay. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 53–65.
- Mc Hugh, T.H., Avena-Bustillos, R., y Krochta, J.M. (1993). Hydrophobic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58(4). 899–903.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., Chiralt, A. (2014). Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* 38, 66-75.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate polymers*. 82: 1174-1183.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M.J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zabaglia A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64: 560-566.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropyl methylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J.I., Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35: 200-206.
- Santos, A., Sánchez, A., Marquina, D. (2004). Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159(4), 331–338.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, J. (2015). Responses of Yeast Biocontrol Agents to Environmental Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 2968–2975.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 58: 83-92.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., de Eribe, X.O., Viñas, I. (2001). Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 21: 147-156.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl-methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 502:509.
- Zhong, Y., Lib, Y. (2011). Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starch/ascorbic acid films. *Carbohydrate Polymers*. 85(3), 622–628.