

Efecto de la temperatura sobre películas de un aislado proteico del suero bovino (WPI) adsorbidas sobre la interfase aceite-agua

Por M^a. Rosario Rodríguez Niño, Cecilio Carrera Sánchez y Juan M. Rodríguez Patino*

Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla
C/. Prof. García González, s/núm. 41012-Sevilla
Tel.: +34 954 557183. Fax: +34 954 557134. E-mail: jmrodri@cica.es

RESUMEN

Efecto de la temperatura sobre películas de un aislado proteico del suero bovino (WPI) adsorbidas sobre la interfase aceite-agua.

En este trabajo se ha estudiado la agregación interfacial inducida por el calor en un aislado proteico del suero bovino (WPI), previamente adsorbido sobre la interfase aceite-agua. Se ha seguido la evolución, durante el tratamiento térmico, de las características dinámicas interfaciales (tensión interfacial y propiedades dilatacionales superficiales), determinadas en un tensiómetro dinámico de gota, en unión de la observación microscópica y posterior análisis de la imagen de una gota que tiene adsorbida a la proteína sobre su superficie. Las variables estudiadas fueron la temperatura (en el intervalo comprendido entre 20 y 80 °C) y la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa (en el intervalo comprendido entre $1 \cdot 10^{-1}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ % en peso). Durante el tratamiento térmico, (a) la película de WPI presenta un comportamiento viscoelástico, con un ángulo de fase distinto de cero, (b) se incrementa el carácter elástico de la interfase, (c) se produce un incremento del módulo dilatacional superficial (E) y (d) una disminución de la tensión interfacial. La variación de E con el tiempo puede cuantificarse mediante ecuaciones de primer orden que pueden relacionarse con dos mecanismos cinéticos, asociados con la gelificación de WPI sobre la interfase aceite-agua. El tratamiento térmico produce cambios irreversibles en la película de WPI adsorbida sobre la interfase. Se han observado cambios significativos en las características interfaciales y en la imagen de la gota a concentraciones de proteína tan bajas como $1 \cdot 10^{-5}$ % en peso.

PALABRAS-CLAVE: Aislado de suero - Emulsionante alimentario - Gelificación interfacial - Interfase aceite- agua - Proteína - Reología interfacial.

SUMMARY

Effect of temperature on whey protein isolated (WPI) films adsorbed at the water-oil interface.

Heat-induced interfacial aggregation of a whey protein isolate (WPI) with a high content of β -lactoglobulin, previously adsorbed at the oil-water interface, was studied by interfacial dynamic characteristics (interfacial tension and surface dilational properties) performed in an automatic drop tensiometer coupled with microscopic observation and image analysis of the drop after heat-treatment. The temperature, ranging between 20 and 80 °C, and protein concentration in aqueous bulk phase, ranging between $1 \cdot 10^{-1}$ and $1 \cdot 10^{-5}$ % wt/wt, were studied as variables. The pH, and ionic strength were maintained constant at 5 and 0.05 M, respectively. During the heat-treatment, WPI films behave typically

as viscoelastic with non-zero phase angle, but with increasing elastic characteristics as the heat-treatment progresses. During isothermal treatment the surface dilational modulus, E, increases and the interfacial tension, σ , and phase angle, ϕ , decrease with time to a plateau value. The time dependence of E can be quantified by a first-order equation according to two kinetic mechanisms. The rate of thermal changes in WPI adsorbed films increases with protein concentration in solution. Heat-treatment produces irreversible changes in WPI adsorbed films because the interfacial characteristics do not return to original values after cooling back to the initial temperature. Significant changes in interfacial characteristics and drop image associated with interfacial WPI gelation were observed at protein concentration as low as $1 \cdot 10^{-5}$ % wt/wt, even for heat-treatment at 40 °C.

KEYWORDS: Interfacial gelation - Protein - Water-oil interface - Interfacial rheology - Whey protein isolate - Food emulsifier.

1. INTRODUCCIÓN

La gelificación es la propiedad que posee determinados biopolímeros (proteínas y polisacáridos) de formar un enrejado estructural que mantiene la forma, posee una cierta rigidez mecánica (viscoelasticidad) y permite absorber (atrapar) moléculas de agua (Kinsella, 1989). La gelificación es un importante atributo funcional de las proteínas, con múltiples aplicaciones en el campo de la alimentación (Dickinson, 1992, Kinsella, 1989). Las proteínas en disolución, cuando se calientan por encima de una determinada temperatura crítica, manifiestan importantes cambios estructurales y cuando, posteriormente, se enfrían producen un gel viscoso y blando y coágulos opacos o geles viscoelásticos claros, dependiendo del tipo de proteína, de la velocidad de calentamiento y de las condiciones del medio acuoso, especialmente del pH y de la presencia de iones Ca^{++} (Cayot, 1997, Dickinson, 1992, Ziegler, 1990). La formación de un gel comprende la siguiente secuencia de transformaciones en una proteína (Boye, 1997):

DES NATURALIZACIÓN → AGREGACIÓN → ENTRECruzAMIENTO

La agregación de la proteína da lugar a la formación de complejos de elevado peso molecular a partir de la proteína desnaturalizada que, a continuación,

pueden entrecruzarse a través de enlaces específicos sobre sitios específicos de la cadena proteica o a través de enlaces no específicos a lo largo de la cadena de proteína. Las etapas iniciales de la coagulación por el calor de una disolución acuosa de proteína son: (a) la disociación reversible de la estructura cuaternaria en sub-unidades o monómeros y (b) la desnaturalización irreversible de las estructuras secundarias y terciarias. Las interacciones intermoleculares, que resultan de las atracciones entre moléculas de proteínas adyacentes con la formación de enrejados débiles, pueden presentar un comportamiento reológico no-newtoniano con características viscoelásticas cuando la gelificación de la proteína progresa. Por lo tanto, las medidas reológicas proporcionan una medida valiosa para caracterizar la gelificación. Las medidas reológicas dinámicas, en las que se aplica a la muestra una oscilación sinusoidal del esfuerzo o de la deformación son las preferidas para la caracterización de la viscoelasticidad de los alientos (Oakenfull, 1997, Ziegler, 1990). Las medidas dinámicas hacen posible observar la coagulación y la gelificación, debido a que la deformación que inducen es tan pequeña que su efecto sobre la estructura de la muestra es insignificante.

Los concentrados (WPC) y los aislados (WPI) de proteínas del suero son en la actualidad importantes ingredientes funcionales en la industria alimentaria, especialmente por sus potenciales propiedades gelificantes. La mayoría de las proteínas del suero proceden del suero del queso, como un subproducto de la fabricación de este producto. La proteína más abundante en todos los tipos de sueros es la β -lactoglobulina, comprendiendo entre el 50 y 60% de su peso en base seca. Debido a que es una de las proteínas que más fácilmente forma geles, su presencia en el suero es especialmente importante. La β -lactoglobulina es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 residuos y un peso molecular de 18.300 Da. Su estructura está estabilizada por dos enlaces disulfuro y, además, contiene un grupo sulfhidrilo (Swaisgood, 1982). De la profusión de estudios existentes (Cayot, 1997, Oakenful, 1997, Ziegler, 1990) sobre la gelificación en disolución de WPC, WPI y β -lactoglobulina se concluye que esta depende de la concentración de proteína en el medio acuoso y del pH.

El objetivo de este trabajo ha sido el ampliar los estudios previos relativos a la gelificación de WPI sobre la interfase aceite-agua (Rodríguez Patino, 1999a y 2001). En estos estudios se ha observado, por primera vez, que los cambios en las características viscoelásticas de las películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua inducidas por el calor dependen de la temperatura y de las condiciones de calentamiento. La gelificación interfacial de proteínas globulares posee una gran importancia

tecnológica (Dickinson 1992), debido a que muchas emulsiones estabilizadas por proteínas experimentan algún tratamiento térmico durante su procesado, almacenamiento o uso. Sin embargo, es un fenómeno del que se conoce muy poco (Ball, 1995, Green, 1999). Se sabe que la estabilidad y las propiedades físico-químicas de las emulsiones aceite-agua estabilizadas por WPI —tales como la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase, la viscosidad superficial y su estabilidad (Demetriades, 1997, Dickinson, 1994 y 1995, Monahan, 1996)— son muy sensibles a la historia térmica (Demetriades, 1997). Un comportamiento similar se ha observado en estudios preliminares con relación a películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua (Rodríguez Patino, 1999 y 2001).

En este trabajo se ha investigado el efecto de la concentración de la proteína en disolución, incluyendo el efecto de la temperatura, sobre las características viscoelásticas de películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua. Debido a que la concentración superficial en exceso de la proteína es mayor que su concentración en disolución, las asociaciones intermoleculares de moléculas de proteína adyacentes deberían facilitar el proceso de gelificación sobre la interfase aceite-agua. Esta hipótesis se ha confirmado en este trabajo.

2. REACTIVOS Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

El aislado del suero bovino (WPI), suministrado por Danisco Ingredients (Dinamarca), con una elevada proporción de β -lactoglobulina (proteína $92 \pm 2\%$, β -lactoglobulina $> 95\%$, α -lactalbumina $< 5\%$) se ha obtenido por fraccionamiento. Para la determinación de las características interfaciales se usaron disoluciones acuosas de WPI a pH 5. El aceite (Trisum, suministrado por Danisco Ingredients), con la siguiente composición en ácidos grasos: C16: 4%, C18: 4%, C18:1: 80%, C18:2: 9%, C18:3: trazas, C20: 0,5% y C22: 1%, se trató con Fluorisil-Aldrich (número de malla 60-100) para eliminar cualquier traza de impurezas de carácter tensioactivo. El ácido acético y el acetato de sodio utilizado para tamponar las disoluciones acuosas fueron de grado analítico (Sigma). Tras la preparación de las muestras, se comprobó la ausencia de sustancias tensioactivas contaminantes, por medida de la tensión superficial.

2.2. Métodos

Para la medida de la tensión interfacial y de las propiedades reológicas superficiales de las películas adsorbidas sobre la interfase aceite-agua se ha utilizado un tensiómetro dinámico de gota, según se ha descrito previamente (Rodríguez Patino 1999a y

1999b). Los parámetros viscoelásticos (tales como el módulo dilatacional superficial, E , y sus componentes elástica, E_d , y viscosa, E_v) se midieron en función de la temperatura (T), del tiempo (θ), de la amplitud de la deformación ($\Delta A/A$) y de la frecuencia de la oscilación (ω). El método consiste en someter a la gota a una compresión-expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas. El módulo dilatacional superficial se determina a través del cambio de tensión interfacial, σ , (ecuación 1), que resulta de un pequeño cambio de la superficie de la gota, A , (ecuación 2), según la ecuación 3 (Lucassen, 1972).

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \sin(\omega\theta + \phi) \quad (1)$$

$$A = A_0 \cdot \sin(\omega\theta) \quad (2)$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = \frac{d\pi}{d \ln A} \quad (3)$$

donde σ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación, respectivamente, ϕ es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, $\pi = \sigma^0 - \sigma$ es la presión superficial, y σ^0 es la tensión interfacial en ausencia de proteína. El módulo dilatacional superficial es una cantidad compleja que se compone de una parte real y otra imaginaria (ecuación 4). La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional superficial, $E_d = |E| \cdot \cos \phi$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial, $E_v = |E| \cdot \sin \phi$. La relación (σ_0/A_0) es el valor absoluto del módulo $|E|$, una medida de la resistencia del material a una deformación dilatacional (elástica + viscosa). Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\phi = 0$) y el término imaginario del módulo es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso $\phi = 90$ y la parte real del módulo es cero. La tangente del ángulo de pérdida se define mediante la ecuación (5). Si la película es puramente elástica, la tangente del ángulo de pérdida es cero.

$$E = (\sigma_0/A_0) \cdot (\cos \phi + i \sin \phi) = E_d + i E_v \quad (4)$$

$$\tan \phi = E_v/E_d \quad (5)$$

Las experiencias se realizaron en el intervalo de temperatura comprendido entre 20 y 80 °C. El pH y la fuerza iónica se mantuvieron constantes en 5 y 0,05 M, respectivamente, usando un buffer acético-acetato. Se estudió, además, como variable la concentración de WPI en la disolución, entre $1 \cdot 10^{-1}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ % en peso. La disolución de proteína se situó en la jeringa desde la que se forma la gota y el aceite en la cubeta del tensiómetro. Por lo tanto, el calor se transmite desde el aceite hacia la superficie de la gota

donde previamente se ha adsorbido el WPI, y se sigue la evolución de su gelificación con el tiempo.

Una gota de la disolución de proteína se suspendió en el seno del aceite y se esperó durante 120 minutos a 20 °C, para conseguir la adsorción de la proteína sobre la interfase aceite-agua. A continuación, la temperatura se incrementó hasta 40, 60 y 80 °C, manteniéndose constante la temperatura de gelificación a cada nivel térmico (40, 60 o 80 °C) durante un cierto tiempo. Durante este proceso, la gelificación de WPI en la interfase aceite-agua se siguió por los cambios de tensión interfacial y de las características viscoelásticas de la película en función del tiempo. Tras 60 minutos de gelificación a la máxima temperatura (80 °C), el sistema se enfrió hasta 20 °C y, de nuevo, se midieron la tensión interfacial y las características viscoelásticas de la película durante 15 minutos. Finalmente, la gota se mantuvo durante toda la noche y, tras 12 horas a 20 °C, se siguió las variaciones de la tensión interfacial y de las características viscoelásticas de la película durante otros 120 minutos a 20 °C.

La observación microscópica (forma y opacidad) de la gota durante la gelificación, unido a un análisis de la imagen, proporcionan una información complementaria sobre la estructura del gel. Este puede variar entre una estructura de red particulada, con débiles repulsiones electrostáticas entre las moléculas de proteína, o una estructura de filamentos finos, con fuertes repulsiones proteína-proteína. La opacidad de la gota se midió mediante el nivel de gris de la gota en relación con el de la fase continua. Los gels claros de proteína están caracterizados por un elevado valor del nivel de gris. La forma de la gota tras un ciclo brusco de expansión-compresión proporciona una información cualitativa acerca de la textura de la película gelificada sobre la interfase aceite-agua. La reproducibilidad de los resultados (para al menos dos medidas) fue del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Efecto de la temperatura sobre la gelificación interfacial

El efecto de la temperatura sobre la tensión interfacial y propiedades reológicas superficiales (módulo dilatacional superficial y ángulo de fase) para películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua desde una disolución de proteína de $1 \cdot 10^{-3}$ % en peso (como un ejemplo) a pH 5, fuerza iónica 0,05 M, una amplitud de la deformación del 15% y a una frecuencia de 100 mHz, durante el tratamiento térmico a 40, 60 y 80 °C, se muestra en las figuras 1 a 6. En la figura 1 se observa que E disminuye durante el tratamiento térmico, pasa por un mínimo a 25 °C (aproximadamente) y, a continuación, se incrementa y tiende a un valor constante, al final del periodo de calentamiento a 40 °C. Estos resultados

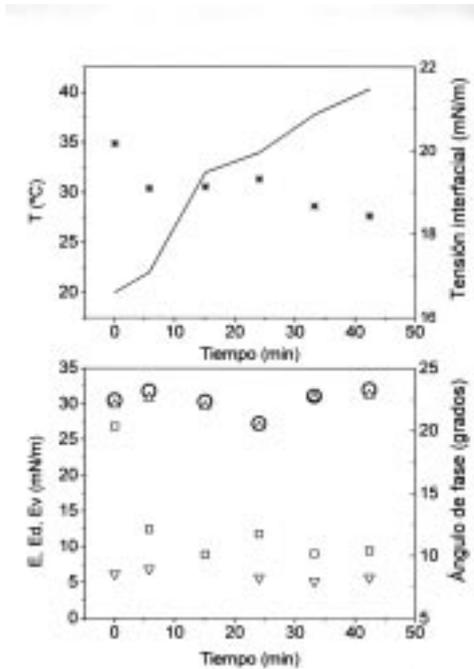


Figura 1

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (V) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 40 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}\%$ en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

corroboran la idea (Rodríguez Patino, 1999a y 2001) de que durante el tratamiento térmico de la película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua existe una competencia entre una mayor fluidez de la película, ocasionado por el aumento de la temperatura, y un cambio en las características mecánicas de la película, debido posiblemente al inicio del proceso de gelificación. La existencia de gelificación interfacial durante el calentamiento del WPI se confirma por la variación del ángulo de fase con el tiempo. Puede comprobarse (Fig. 1) que durante el tratamiento térmico el ángulo de fase desciende desde $20,3^\circ$ hasta $10,4^\circ$ cuando la temperatura se incrementa desde 20 hasta 40 °C. Durante el tratamiento térmico, la película presenta un comportamiento viscoelástico, con un ángulo de fase distinto de cero, aunque sus características elásticas aumentan a medida que progresa el tratamiento térmico. En efecto, durante este proceso la componente elástica del módulo se incrementa mientras que la componente viscosa se mantiene constante en un valor de 6 mN/m.

La desnaturalización térmica de WPI sobre la interfase aceite-agua, a temperaturas muy por debajo de la que se requiere para la gelificación en disolución (Ball, 1995, Beveridge, 1984, Clark, 1981, Phi-

lips, 1994), se ha observado previamente para películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua desde una disolución de $1 \cdot 10^{-2}\%$ (Rodríguez Patino, 1999a) y para películas de lisozima y BSA adsorbidas sobre sustratos sólidos (Ball, 1995, Green, 1999). En este trabajo se ha observado de la gelificación interfacial de WPI, en el mismo intervalo de temperatura, es posible incluso a menores concentraciones de proteína (figura 1). Las razones propuestas previamente (Rodríguez Patino, 1999a) pueden aplicarse también a estos resultados. Puesto que la concentración de WPI en la película adsorbida es superior a la de la disolución de la que procede, esta elevada concentración superficial en exceso facilita las interacciones proteína-proteína y su agregación sobre la interfase, para conducir a la película gelificada. Por lo tanto, aunque la concentración en el seno de la fase acuosa es muy baja como

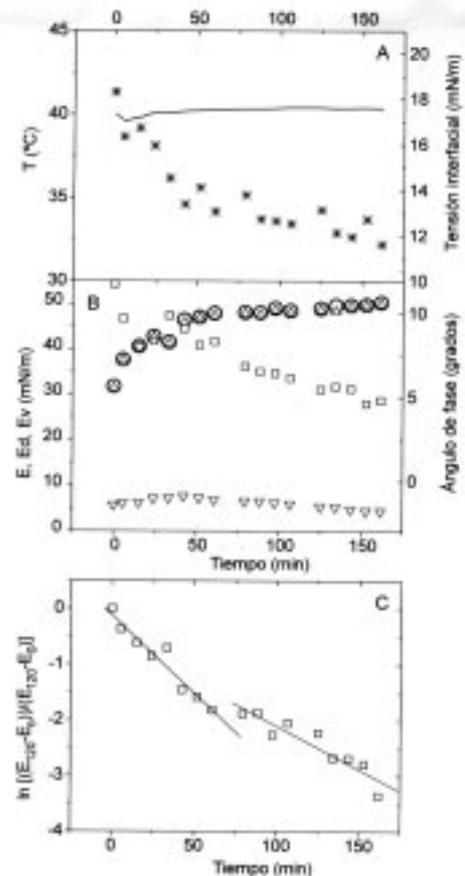


Figura 2

(A) y (B) Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (V) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento isotérmico a 40 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}\%$ en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%. (C) Correlación de los datos experimentales durante el tratamiento isotérmico a 40 °C, mediante ecuaciones cinéticas de primer orden (ecuación 6).

para que se produzca una gelificación del WPI en disolución (Cayot, 1997, Oakenfull, 1997, Ziegler, 1990), la concentración interfacial en exceso, como se deduce a partir del descenso significativo de la tensión interfacial (Fig. 1), puede ser suficiente como para permitir la desnaturalización, agregación y entrecruzamiento de las cadenas de polipéptidos, incluso a bajas temperaturas (por ejemplo, a 40 °C en estos experimentos) y a bajas concentraciones de proteína en disolución.

En la figura 2 se muestra el efecto del tratamiento térmico a una temperatura constante de 40 °C. Durante este periodo la desnaturalización térmica de la película de WPI progresa. Se observa que el módulo dilatacional superficial y su componente elástica (Fig. 2B) aumentan con el tiempo de calentamiento. Sin embargo, lo contrario se observa con el ángulo de fase (Fig. 2B) y la tensión interfacial (Fig. 2A). La componente viscosa del módulo (Fig. 2B) no depende del tiempo de calentamiento y su valor se mantuvo inferior al de la componente elástica. Es decir, durante el tratamiento térmico la actividad superficial y las características elásticas de la película se incrementan, lo que es un comportamiento típico de la gelificación en disolución (Oakenfull, 1997).

Los datos de la figura 2, y en especial la dependencia con el tiempo de E o de ϕ , pueden ser usados para realizar un análisis cinético cuantitativo del proceso de gelificación sobre la interfase. Si se admite que durante el periodo de calentamiento a 40 °C la proteína está prácticamente desnaturalizada, como consecuencia de periodo inicial de adsorción durante 120 min. (Rodríguez Patino, 1999b) y el posterior periodo de calentamiento a 40 °C, la dependencia de E con el tiempo puede usarse para cuantificar la agregación y entrecruzamiento asociados al proceso de gelificación. Si la gelificación sigue etapas consecutivas de primer orden, como se ha observado para la gelificación en disolución (Boye, 1997), se puede proponer el uso de la ecuación 6 para seguir la variación de E durante el calentamiento.

$$\ln [(E_{160} - E_{\theta}) / (E_{160} - E_0)] = -k_1 \cdot \theta \quad (6)$$

donde E_{160} , E_{θ} y E_0 son los valores del módulo dilatacional superficial a los 160 minutos a 40 °C, a cualquier tiempo y en el instante inicial, respectivamente, y k_1 son las constantes cinéticas de primer orden asociadas al proceso de gelificación. Mediante la correlación de los datos según la ecuación 6, se obtienen dos regresiones lineales (Fig. 2C), que pueden asociarse con las etapas de agregación y/o entrecruzamiento. Los valores de las constantes cinéticas de primer orden deducidas de estas correlaciones se muestran en la tabla I y se discutirán posteriormente.

La figura 3 muestra las variaciones de la tensión interfacial y de las propiedades dilatacionales super-

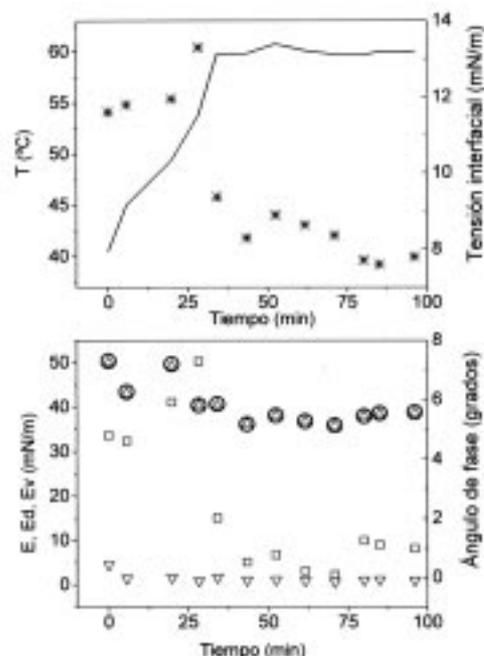


Figura 3

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E , (Δ) componente elástica, E_d , (∇) componente viscosa y (\square) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 60 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}$ % en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

ficiales (E , E_d , E_v y ángulo de fase) durante el periodo de calentamiento desde 40 hasta 60 °C y posterior tratamiento isotérmico a 60 °C, para una película de WPI previamente tratada térmicamente a 40 °C. Se puede observar que las evoluciones con el tiempo de la tensión interfacial y del ángulo de fase siguen las mismas tendencias que durante el periodo de calentamiento previo, con una reducción mayor de estos parámetros interfaciales cuando la gelificación progresa a mayores temperaturas. Se debe destacar que el ángulo de fase desciende hasta un

Tabla I

Parámetros cinéticos característicos (según la ecuación 6) de la evolución del módulo dilatacional superficial con el tiempo durante el tratamiento térmico de una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite agua a 40 °C

Concentración de WPI en disolución (% en peso)	$k_1 \cdot 100$ (min^{-1})	$k_2 \cdot 100$ (min^{-1})
$1 \cdot 10^{-3}$	2.82	1.66
$1 \cdot 10^{-2}$	3.78	1.61
$1 \cdot 10^{-1}$	6.42	1.54

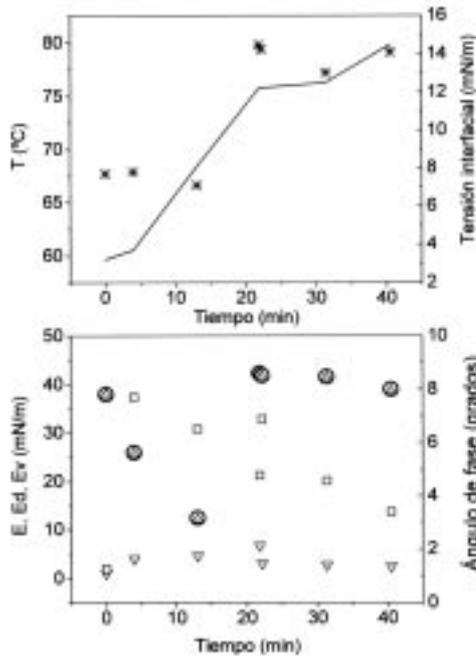


Figura 4

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (∇) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 80 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}\%$ en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

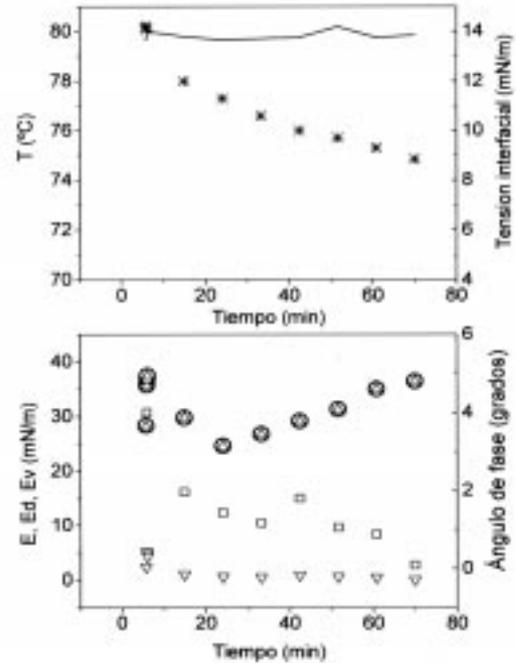


Figura 5

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (∇) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento isotérmico hasta 80 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}\%$ en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

valor próximo a 1° cuando el tratamiento térmico a 60 se ha completado. Estos resultados corroboran la idea de que cuando el tratamiento térmico progresa la gelificación interfacial del WPI continua. Este fenómeno puede deberse a que existen mayores cambios moleculares o a que el grado de estos cambios es mayor, o a una combinación de ambos efectos.

Las figuras 4 y 5 muestran la misma tendencia en la evolución de las características interfaciales de la película de WPI cuando la temperatura se incrementa de 60 a 80 °C y progresa el tratamiento isotérmico a la temperatura de 80 °C durante 60 minutos. Por lo tanto, los mismos razonamientos que se han expuesto previamente se pueden aplicar aquí. Se debe destacar que estas condiciones más severas de calentamiento no van acompañadas de cambios más drásticos en las propiedades interfaciales de la película de WPI.

La figura 6 muestra el efecto sobre las propiedades dinámicas interfaciales del enfriamiento hasta 20 °C de la película de WPI tratada previamente hasta la temperatura de 80 °C. Se observa que E y ϕ aumentan cuando la temperatura desciende desde 80 a 20 °C (Fig. 6 y tabla II). La tensión interfacial también disminuye durante el enfriamiento hasta 20 °C, lo cual sugiere que tras el tratamiento térmico de la película la proteína experimenta un proceso de des-

naturalización y agregación, con la mayoría de los residuos hidrofóbicos orientados hacia la fase oleosa, un fenómeno que produce un aumento de la actividad y de la energía libre superficiales, como se muestra en los datos de la tabla II. La evolución del sistema tras 12 horas de reposo a 20 °C es de importancia práctica. Se observa (Fig. 6 y tabla II) que durante este periodo, E aumenta hasta un valor que es prácticamente el doble del que poseía la película de WPI anterior al tratamiento térmico (Fig. 1). El ángulo de fase es inferior a 1° (Fig. 6), lo que denota que durante el tratamiento térmico la película se comporta como viscoelástica, con una componente elástica prácticamente similar en valor al del módulo, y con una componente viscosa que disminuye durante el tratamiento térmico. Es decir, la película de WPI tratada térmicamente se hace prácticamente elástica. Como una consecuencia de este tratamiento térmico, la tensión interfacial de la película disminuye desde 20 hasta 6 mN/m, lo que sugiere que se han producido importantes cambios conformacionales en la película adsorbida durante este proceso. Un fenómeno similar se ha observado recientemente a través de medidas espectroscópicas en películas de lisozima y BSA adsorbidas sobre sustratos sólidos (Balll, 1995, Grenn, 1999). Finalmente, el tratamien-

Tabla II
Módulo dilatacional superficial, E (mN/m), y tensión interfacial, σ (mN/m), de películas de WPI adsorbidas sobre la interfase aceite-agua (a) a 20 °C tras 120 minutos de adsorción, (b) a 20 °C tras el tratamiento térmico a 80 °C, y (c) a 20 °C a las 12 horas del tratamiento térmico a 80 °C

Concentración de WPI en disolución (% en peso)	T ^a = 20 °C Tras 120 minutos de adsorción		T ^b = 20 °C Tras el tratamiento térmico a 80 °C		T ^c = 20 °C A las 12 horas del tratamiento térmico a 80 °C	
	E (mN/m)	σ (mN/m)	E (mN/m)	σ (mN/m)	E (mN/m)	σ (mN/m)
1 · 10 ⁻¹	25.9	10.95	41.8	7.7	----	----
1 · 10 ⁻²	23.8	17.8	46.0	4.0	46.0	8.95
1 · 10 ⁻³	30.5	20.2	42.7	4.0	66.1	5.95
1 · 10 ⁻⁵	9.3	18.7	44.7	3.3	44.6	4.8

to térmico produce cambios irreversibles en la película adsorbida de WPI porque los valores de sus características interfaciales (tensión interfacial y propiedades dilatacionales superficiales) son diferentes a los valores originales, tras el enfriamiento hasta la temperatura original de 20 °C.

3.2. Efecto de la concentración de WPI en el seno de la fase sobre la gelificación interfacial

Las figuras 7, 8 y 9 muestran la dependencia con el tiempo de la tensión interfacial y propiedades dilata-

cionales superficiales de la película de WPI adsorbida sobre la interfase como una consecuencia del tratamiento térmico (similar al descrito previamente), para concentraciones de proteína en el seno de la

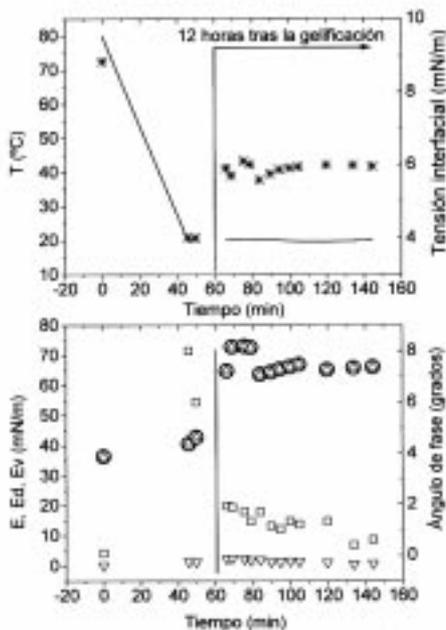


Figura 6

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, E_d, (∇) componente viscosa y (\square) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el enfriamiento hasta 20 °C y tras 12 horas del proceso de gelificación. Concentración de proteína en disolución: 1 · 10⁻³% en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

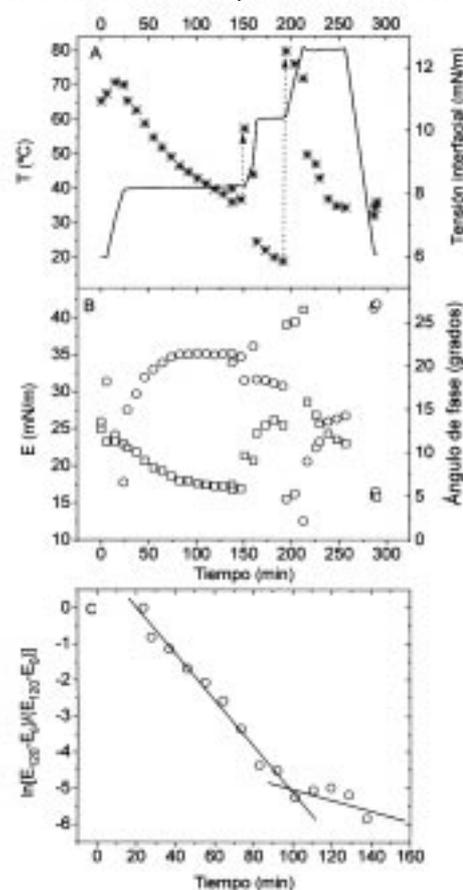


Figura 7

(A) y (B) Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, E_d, (∇) componente viscosa y (\square) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 80 °C y posterior enfriamiento hasta 20 °C. (C) Correlación de los datos experimentales durante el tratamiento isotérmico a 40 °C, mediante ecuaciones cinéticas de primer orden (ecuación 6). Concentración de proteína en disolución: 1 · 10⁻¹% en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

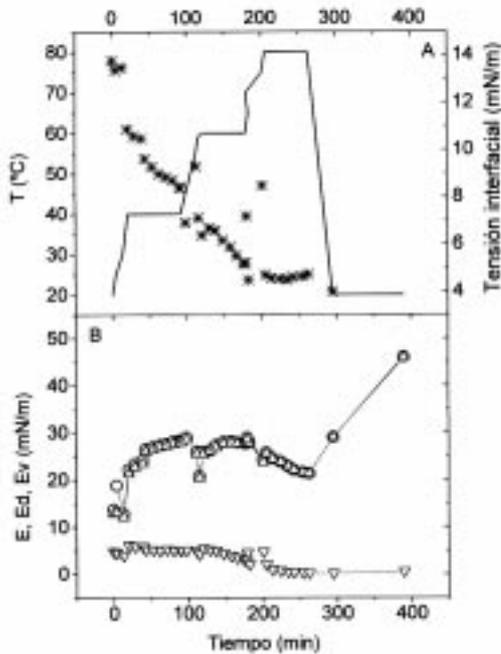


Figura 8

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (∇) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 80 °C y posterior enfriamiento hasta 20 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-2}$ % en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

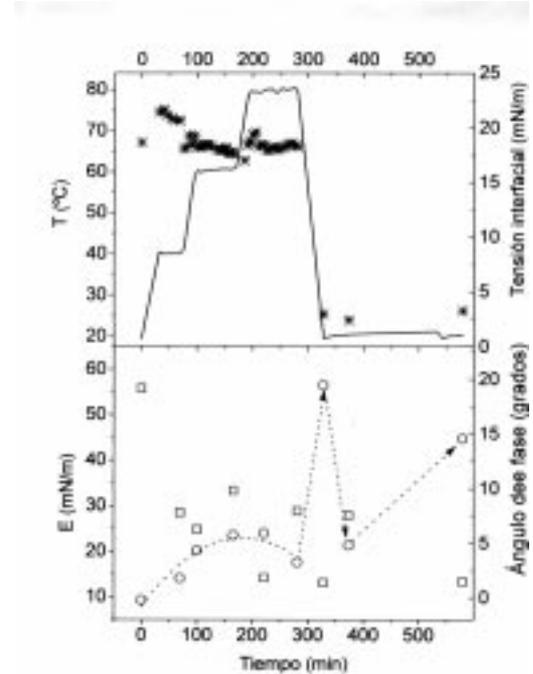


Figura 9

Evolución con el tiempo de (—) la temperatura, (*) tensión interfacial y propiedades reológicas interfaciales [(O) módulo dilatacional superficial, E, (Δ) componente elástica, Ed, (∇) componente viscosa y (□) ángulo de fase], para una película de WPI adsorbida sobre la interfase aceite-agua, durante el tratamiento térmico hasta 80 °C. y posterior enfriamiento hasta 20 °C. Concentración de proteína en disolución: $1 \cdot 10^{-3}$ % en peso. pH: 5. I: 0,05 M. Frecuencia de la oscilación: 100 mHz. Amplitud de la oscilación: 15%.

fase de $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ %, respectivamente. Brevemente, las películas adsorbidas de WPI se comportan de una manera similar tras el tratamiento térmico independientemente de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa. En efecto, E disminuye durante el calentamiento, pasa por un mínimo y posteriormente se incrementa cuando progresa el calentamiento hasta alcanzar un valor constante al final de este periodo. Durante el tratamiento isotérmico (a 40, 60 y 80 °C) E aumenta hasta alcanzar un valor constante, especialmente durante el primer periodo a 40 °C. La tabla II muestra la evolución del módulo dilatacional superficial y de la tensión interfacial como una consecuencia del tratamiento térmico (tras el enfriamiento a 20 °C de la película de WPI previamente tratada térmicamente a 80 °C) y tras el periodo de 12 horas de reposo a 20 °C, con relación a la película sin tratar a la misma temperatura (20 °C).

Las propiedades mecánicas de la película durante el tratamiento térmico, tal como se detecta por el valor de E, fueron mayores para la disolución más concentrada de proteína (Fig. 7) y disminuyó cuando la concentración de proteína era de $1 \cdot 10^{-5}$ (Fig. 9). Sin embargo, el efecto de la concentración de proteína sobre la actividad superficial y sobre las caracte-

rísticas viscoelástica de la película al final del tratamiento térmico es más complejo (tabla II). Los resultados sugieren que los cambios moleculares que tienen lugar durante el tratamiento térmico producen valores elevados de E en la película de WPI adsorbida e incrementa su componente elástica y su actividad superficial. Independientemente de la concentración de proteína en disolución, el tratamiento térmico produce cambios irreversibles en la película de WPI porque los valores de las características interfaciales (E y σ) no retornan a los valores previos tras el enfriamiento a 20 °C (tabla II).

La velocidad con la que se producen los cambios en la película de WPI durante el tratamiento térmico se incrementa con la concentración de la proteína en disolución. Por aplicación de la ecuación 6 a la dependencia de E con el tiempo, durante el tratamiento térmico de WPI a una concentración en disolución de $1 \cdot 10^{-1}$ % en peso y a 40 °C, se obtienen dos regresiones lineales (Fig. 7C), cuyas constantes cinéticas se incluyen en la tabla I. Se observa que los principales cambios en los parámetros cinéticos, en función de la concentración de la proteína en disolución, se producen durante el primer periodo de calentamiento. La constante cinética de primer orden se incrementa significativamente desde $0,0282 \text{ min}^{-1}$ hasta

0,0642 min⁻¹ cuando la concentración de proteína en disolución aumenta desde 1.10⁻³ hasta 1.10⁻¹ % en peso.

Es decir, los cambios conformacionales y la agregación de la proteína se incrementan con las interacciones proteína-proteína, las cuales aumentan con la concentración de proteína en disolución. Por lo tanto, se puede concluir que el tiempo de gelificación, cuantificado por las constantes cinéticas de primer orden para la dependencia E- θ es un parámetro de utilidad para definir los puntos de transición en la película de proteína tratada térmicamente sobre la interfase aceite-agua, tal como se observa para la gelificación en disolución (Baveridge, 1984, Hillier, 1980, Kinsella, 1994). Estas transiciones están acompañadas también de cambios en las características viscoelásticas interfaciales de la película. Se debe recordar que la misma dependencia entre E y θ (según la ecuación 6), existe para la componente elástica y el ángulo de fase, lo que es un comportamiento típico de la gelificación en disolución (Ziegler, 1990). Como ocurre con la gelificación en disolución (Hillier, 1980), la transición en las características viscoelásticas de la película de WPI tratada térmicamente es dependiente de la concentración de proteína (tabla I). Se ha informado que para la gelificación de WPI en disolución (Paulsson, 1986, Verheul, 1998a) la componente elástica del módulo es una medida de la cantidad de proteína que ha gelificado. Si lo mismo ocurre sobre la interfase, las diferencias observadas en este estudio durante la gelificación interfacial del WPI deben asociarse a la mayor cantidad de proteína agregada y a las mayores fuerzas de interacción entre las moléculas de proteína gelificadas, cuando se incrementa la temperatura o la concentración de proteína en disolución.

Una característica importante de la gelificación interfacial de WPI, que puede ser de interés teórico y práctico, es la baja concentración de proteína en disolución que es necesaria para promover la gelificación en la interfase, si se la compara con el mismo proceso en disolución. En este estudio se ha observado la existencia de cambios significativos en las propiedades dinámicas de la película de WPI asociadas a su gelificación sobre la interfase aceite-agua, a una concentración de proteína tan baja como 1.10⁻⁵ % en peso, incluso a la temperatura de 40 °C. Estos valores son muy inferiores a los que se requieren (1 - 2,5 % en peso) para la gelificación en disolución bajo similares condiciones de pH (Cayot, 1997, Oakenfull, 1997, Verhuel, 1998b, Ziegler, 1990). La razón para este comportamiento, característico de la gelificación interfacial, debe asociarse con el hecho de que la concentración de proteína en exceso sobre la interfase es muy superior a su concentración en la disolución de la que procede. Como se observa en los resultados experimentales (Figs. 1 a 9 y tabla II),

la tensión interfacial decrece bruscamente con el tratamiento térmico, lo que significa que la actividad superficial de la película de WPI aumenta en la misma dirección. Para cada concentración de proteína en disolución, el valor mínimo de la tensión interfacial coincide con el valor máximo de E. Este fenómeno se ha observado tras el enfriamiento a 20 °C de la película de WPI previamente gelificada (tabla II).

La tendencia observada en las características interfaciales (tensión interfacial y características viscoelásticas) de la película de WPI durante el tratamiento térmico tienen una relación directa con la influencia de la temperatura sobre una emulsión de aceite en agua estabilizada por WPI (Demetriades, 1997, Monahan, 1996). Se ha informado que existe una agregación máxima de las gotitas de la emulsión a temperaturas próximas a 75 °C, que disminuye a mayores temperaturas. Se ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas pueden ser determinantes para la estabilidad de las emulsiones sometidas a calentamiento (Monahan, 1996, Hunt, 1994 y 1995). Sobre una cierta temperatura, las proteínas del suero se desnaturalizan y los grupos de aminoácido no polares que estaban localizados en el interior se exponen hacia el exterior, comunicando a la superficie de las gotitas unas propiedades hidrofóbicas. Es decir, cuando la molécula de proteína se desnaturaliza, expone los grupos de aminoácido reactivos hacia el exterior lo que mejora las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína (Dickinson, 1991, McClements, 1993, Monahan 1993 y 1996). Estas interacciones pueden originarse entre moléculas adsorbidas sobre la misma gotita o entre las moléculas adsorbidas sobre diferentes gotitas.

Las interacciones sobre la misma gotita producen un incremento de la viscoelasticidad de la película (Dickinson 1991), tal como se ha observado en este trabajo, mientras que las interacciones entre gotitas diferentes conducen a una floculación de la emulsión (Demetriades, 1997, McClements, 1993). Se ha informado (Demetriades, 1997) que las emulsiones tienden a ser más fluidas cuando la temperatura aumenta desde 30 hasta 70 °C. Por encima de 70 °C, la desnaturalización de la proteína adsorbida hace aumentar las interacciones entre gotitas y se incrementan las propiedades mecánicas del gel que se forma, a la vez que disminuye el ángulo de fase (la emulsión se hace menos fluida), un fenómeno que se relaciona directamente con las características viscoelásticas de la película de WPI, observadas en este trabajo (tabla II).

3.3. Observación microscópica de la gota

La figura 10 muestra diferentes gotas con WPI adsorbida a la temperatura de 20 °C, tras el tratamiento térmico a 80 °C, para concentraciones de proteína en el seno de la fase de 1.10⁻¹ % (Fig. 10A),

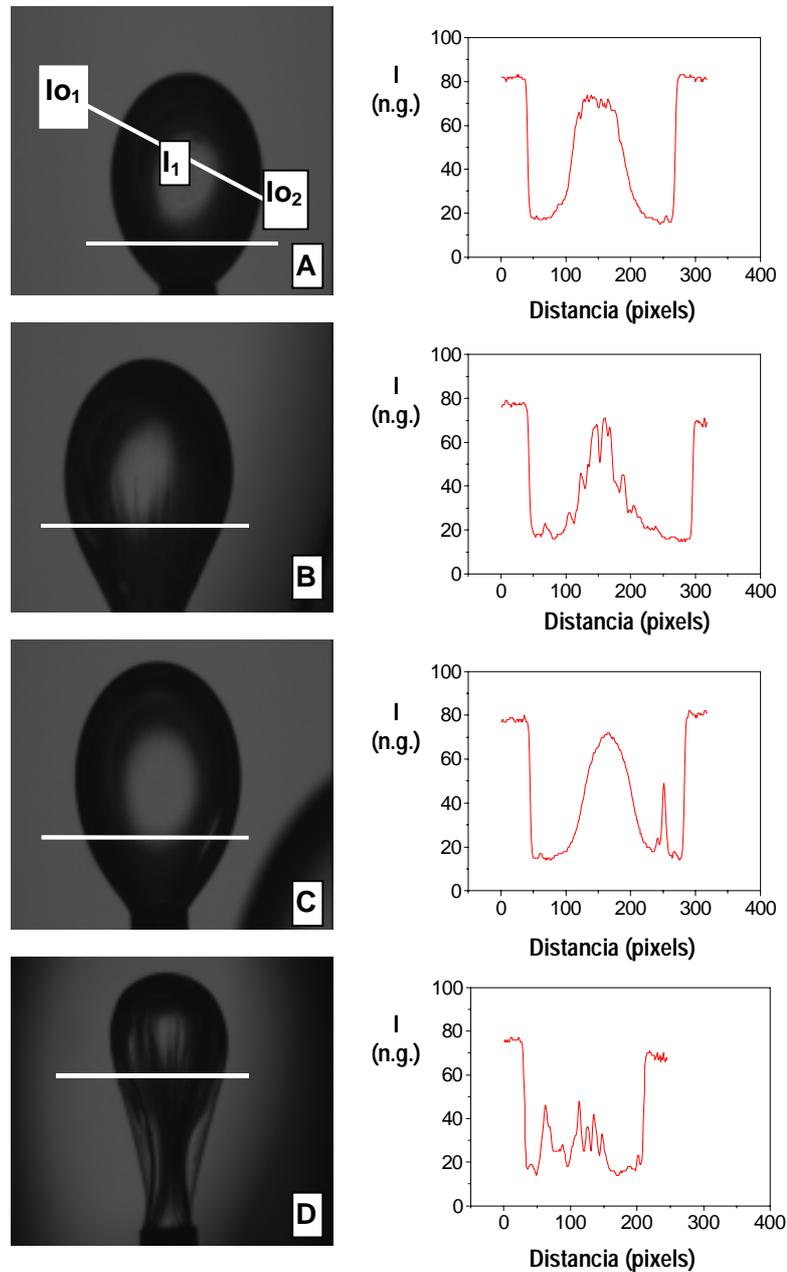


Figura 10

Observación microscópica (forma y opacidad) de las gotas de WPI adsorbidos sobre la interfase aceite-agua tras el tratamiento térmico a 80 °C. Concentración de proteína en disolución (% en peso): (A) $1 \cdot 10^{-1}$, (B) $1 \cdot 10^{-2}$, (C) $1 \cdot 10^{-3}$ y (D) $1 \cdot 10^{-5}$ pH: 5. I: 0,05 M. El perfil de la intensidad de la luz (nivel de gris: n.g.) en función de la distancia (pixels), a lo largo de la línea I_{01} - I_{02} , se incluye en la parte derecha de la imagen de cada gota.

$1 \cdot 10^{-2}$ % (Fig. 10B), $1 \cdot 10^{-3}$ % (Fig. 10C) y $1 \cdot 10^{-5}$ % (Fig. 10D). Se observa que, incluso a la menor concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, se produce una deformación en la superficie de la gota durante el tratamiento térmico, dando lugar a una película elástica cuando la gota se enfría hasta 20 °C, un comportamiento que se puede relacionar con la gelificación interfacial de la proteína. Como

consecuencia de la gelificación, la película presenta algunas irregularidades que pueden ser medidas mediante la intensidad de la luz a través de la gota (Fig. 10). Los picos de intensidad de luz que se observan son una indicación de la existencia de pliegues en la película, originados por el tratamiento térmico. En la tabla III se muestra los valores de los niveles de gris de la gota en función de la concentra-

Table III

Opacidad de la gota (I_1) — medida por medio del nivel de gris [(el intervalo de la escala está comprendido entre 0 (mínima intensidad de la luz para una gota negra) y 255 (máxima intensidad de la luz para una gota blanca)] — en relación con la intensidad de la luz a través de la fase oleosa continua en dos puntos representativos (I_{o1} y I_{o2}) para una película de WPI adsorbida tras el tratamiento térmico y posterior enfriamiento de la gota a 20 °C (ver la Fig. 10A). Concentración de proteína en el seno de la fase: (a, y aa): $1 \cdot 10^{-1}$ % en peso — (aa) tras el enfriamiento a 20 °C. (b, bb, y bbb): $1 \cdot 10^{-3}$ % en peso — (bb) tras el enfriamiento a 20 °C y (bbb) tras 12 horas a 20 °C. (c, cc, and ccc): $1 \cdot 10^{-5}$ %, en peso — (cc) tras el enfriamiento a 20 °C y (ccc) tras 12 horas a 20 °C. Los valores presentados son la media de 10 medidas sobre la misma gota

TRATAMIENTO TÉRMICO (°C)	I_{o1}	I_{o2}	I_1
40 ^a	79.0	81.0	76.3
60 ^a	80.5	82.0	53.2
80 ^a	81.0	81.9	69.2
20 ^{aa}	82.5	82.2	72.4
40 ^b	79.4	80.2	82.7
60 ^b	79.3	81.1	83.1
80 ^b	79.6	80.9	83.4
80 ^{bb}	79.0	81.1	82.4
80 ^{bbb}	76.5	77.2	75.8
40 ^c	80.0	80.5	83.0
60 ^c	80.5	81.4	82.9
80 ^c	79.4	81.1	80.7
80 ^{cc}	78.5	80.7	78.2
80 ^{ccc}	77.0	78.0	76.1

ción de proteína en el seno de la fase acuosa. A partir de estos datos se puede concluir que el WPI adsorbido sobre la interfase aceite-agua da lugar a geles transparentes cuando se somete a tratamiento térmico, independientemente de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa. En efecto, la medida de la intensidad de la luz a través de la gota es prácticamente similar a la que se transmite a través de la fase oleosa continua (las gotas gelificadas a 60 y 80 °C, con una concentración de proteína en disolución de $1 \cdot 10^{-1}$ % en peso constituyen excepciones).

4. CONCLUSIONES

A partir de los datos presentados en este trabajo se puede concluir que la agregación sobre la interfase originada por el tratamiento térmico sobre películas adsorbidas de WPI depende del régimen térmico y de la concentración de proteína en disolución. Durante el tratamiento térmico, las películas de WPI se comportan como viscoelásticas, con un ángulo de

fase distinto de cero. No obstante, las características elásticas de la película se incrementan cuando progresa el tratamiento térmico. Durante el tratamiento isotérmico el módulo dilatacional superficial, E , aumenta, mientras que la tensión interfacial, σ , y el ángulo de fase, ϕ , disminuyen con el tiempo, tendiendo a un valor mínimo constante. La evolución de E con el tiempo puede ser cuantificada mediante dos ecuaciones cinéticas de primer orden. La velocidad con la que se producen los cambios en las propiedades interfaciales de las películas de WPI, originados por el calor, se incrementa con la concentración de la proteína en disolución. El tratamiento térmico produce cambios irreversibles sobre las películas de WPI adsorbidas porque las características interfaciales no recuperan los valores originales previos al tratamiento térmico. La observación microscópica de la gota gelificada proporciona una información complementaria sobre los efectos del tratamiento térmico. Se han observado cambios significativos en las características interfaciales y en la imagen de la gota asociados con el proceso de gelificación interfacial, incluso a concentraciones tan bajas de proteína en disolución como $1 \cdot 10^{-5}$ % en peso y a 40 °C. La razón de esta característica de la gelificación interfacial debe relacionarse con el hecho de que la concentración de proteína sobre la interfase es muy superior a su concentración en disolución, debido a su carácter anfífilico.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se ha realizado gracias a las ayudas recibidas de la Unión Europea, mediante el proyecto FAIR-CT96-1216, de la DGYCIT, a través del proyecto PB97-0734 y de la CICYT, a través del proyecto ALI97-1274-CE.

REFERENCIAS

- Ball, A. y Jones, R. A. L. (1995) Conformational changes in adsorbed proteins. *Langmuir*, **11**, 3542-3548.
- Beveridge, T., Jones, L. y Tung, M. A. (1984) Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumen protein gels. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 307-313.
- Boye, J. I., Ma, C.-Y., y Harwalkar, V. R. (1997) En *Food Proteins and their Applications*; Damodaran, S. y Paraf, A. (Eds.), pp. 25-56, Marcel Dekker: New York.
- Cayot, P. y D. Lorient, (1997) En *Food Proteins and their Applications*; Damodaran, S. y Paraf, A., (Eds.), pp. 225-256, Marcel Dekker: New York, 1997.
- Clark, H. L., Saunderson, D. H. P. y Suggett, A. (1981) Infrared and laser-Raman spectroscopy studies of thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 353-364.
- Demetriades, K., Coupland, J. N. y McClements, D. J. (1997) Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *J. Food Sci.*, **62**, 462-467.
- Dickinson, E. *An Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press: Oxford, U.K., 1992.

- Dickinson, E. y Hong, S. T. (1994) Surface coverage of β -lactoglobulin at the oil-water interface: influence of protein heat treatment and various emulsifiers. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1602-1606.
- Dickinson, E. y Matsumura, Y. (1991) Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulfide bonds at the oil-water interface in emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**, 26-30.
- Dickinson, E. y McClements, D. J. (1995) *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic & Professional: London.
- Green, R. J., Hopkinson, I. y Jones, R. A. L. (1999) En *Food Emulsions and Foams: Interfaces, Interactions and Stability*; Dickinson, E.; Rodríguez Patino, J. M. (Eds.), pp. 285-295, Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1999.
- Hillier, R. M., Lyster, R. L. J. y Cheeseman, G. C. (1980) Gelation of reconstituted whey powders by heat. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 1152-1157.
- Hunt, J. A. y Dalglish, D. G. (1994) The effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate. *J. Food Sci.*, **42**, 2131-2135.
- Hunt, J. A. y Dalglish, D. G. (1995) Heat stability of oil-in-water emulsions containing milk proteins: effect of ionic strength and pH. *J. Food Sci.*, **50**, 1120-1123.
- Kinsella, J. E. y Whitehead, D. M. (1989) Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr. Res.*, **33**, 343-438.
- Kinsella, J. E., Rector, D. J. y Phillips, L. G. (1994) En *Protein Structure-Function Relationships in Food*; Yada, R. Y., Jackman, R. L. y Smith, J. L. (Eds.), Blackie Academic and Professional: London, U.K..
- Lucassen, J. y van den Tempel, M. (1972) Measurements of dilational properties of a liquid interface, *Chem. Eng. Sci.*, **27**, 1283-1291.
- McClements, D. J., Monahan, F. J. y Kinsella, J. E. (1993) Disulfide bond formation affects stability of whey protein isolate emulsions. *J. Food Sci.*, **58**, 1036-1039.
- Monahan, F. J., McClements, D. J. y German, J. B. (1996) Disulfide-mediated polymerization reactions and physical properties of heated WPI-stabilized emulsions. *J. Food Sci.*, **61**, 504-509.
- Monahan, F. J., McClements, D. J. y Kinsella, J. E. (1993) Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1826-1829.
- Oakenfull, D., Pearce, J. y Burley, R. W. (1997) En *Food Proteins and their Applications*; Damodaran, S., Paraf, A. (Eds.), pp. 111-142, Marcel Dekker: New York, 1997.
- Paulsson, M., Hegg, P. O. y Castberg, H. B. (1986) Heat-induced gelation of individual whey protein-A dynamic rheological study. *J. Food Sci.*, **51**, 87-90.
- Phillips, L. G., Withehead, A. W. y Kinsella, J. E. (1994) *Structure-Function Properties of Food Proteins*. Academic Press Ltd., London, U.K..
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. y Carrera, C. (1999a) Dynamic interfacial rheology as a tool for the characterization of WPI gelation at the oil-water interface. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3640-3648.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. y Carrera, C. (1999b) Adsorption of WPI at the oil-water interface as a function of processing conditions. A rheokinetic study. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2241-2248.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Carrera, C., Navarro, J. M., Rodríguez, G. y Cejudo, M. (2001) The effect of temperature on food emulsifiers at fluid-fluid interfaces *Colloids & Surfaces B*, **21**, 87-99.
- Swaigood, H. E. (1982) En *Developments in Dairy Chemistry* (Vol. 1); Fox, P. F. (Ed.), Vol. 1, pp 1-59, Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K.
- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M. y Kruif, K. G. (1998a) Kinetics of heat-induced aggregation of beta-Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 896-903.
- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., Mellema, J. y Kruif, K. G. (1998b) Power law behaviour of structural properties of protein gels. *Langmuir*, **14**, 2263-2268.
- Ziegler, G. R. y Foegeding, E. A. (1990) The gelation of proteins. *Adv. Food Nutr. Res.*, **34**, 203-297.

Recibido: Noviembre 2001
 Aceptado: Abril 2002