



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



GELIFICAÇÃO A FRIO DE PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE: EFEITO DA TAXA DE ACIDIFICAÇÃO, pH FINAL E ADIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.

Tese de Doutorado apresentada a comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas

ÂNGELO LUIZ FAZANI CAVALLIERI

Doutorando

ROSIANE LOPES DA CUNHA

Orientadora

ABRIL 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C314g Cavallieri, Ângelo Luiz Fazani
Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos / Ângelo Luiz Fazani Cavallieri. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Rosiane Lopes Cunha
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Soro do leite – Proteínas. 2. Gelificação a frio. 3. Xantana. 4. Guar. 5. Microestrutura. I. Cunha, Rosiane Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Cold set gelation of whey proteins: acidification rate, final pH and polysaccharide addition effects

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey – Proteins, Cold gelation, Xanthan, Guar, Microstructure

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha

Florência Cecília Menegalli

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Ana Lúcia Gabas

Vânia Regina Nicoletti Telis

Ana Luiza Mattos Braga

Data da defesa: 10/04/07

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Dpto. Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Orientadora

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Dpto. Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Dpto. de Alimentos e Nutrição-UNICAMP
Membro

Profa. Dra. Ana Lúcia Gabas

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Dpto. Engenharia de Alimentos - USP
Membro

Profa. Dra. Vânia Regina Nicoletti Telis

Universidade Estadual Paulista – Dpto Engenharia e Tecnologia de Alimentos -UNESP
Membro

Dra. Ana Luiza Mattos Braga

Encapsulation Group - Nestlé Product Technology Centre Konolfingen - Switzerland

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter me concedido a oportunidade maravilhosa de conviver com as pessoas diretamente relacionadas a este trabalho nos últimos quatro anos.

Agradeço à banca examinadora por todas as correções valiosas que contribuíram para a melhoria do texto e da análise do conteúdo apresentado neste trabalho. Ao CNPq, pela bolsa e a FAPESP pelo apoio financeiro. À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Engenharia de Alimentos. A todos os professores e funcionários da FEA e particularmente do DEA.

Agradeço à Professora Rosiane por ter acreditado em meu potencial desde o momento em que nos conhecemos. Agradeço não apenas por ter sido minha orientadora, que corrigiu e revisou todos os meus textos, ou forneceu uma opinião crítica e sincera ao discutir comigo os resultados que obtínhamos no laboratório. Agradeço pela amizade e pelo companheirismo. Ao longo dos últimos quatro anos tive o privilégio de conviver com seus exemplos: de atitude correta e ética, profissionalismo extremo e de amor pelo trabalho de pesquisa. Agradeço por ter me ensinado que para a realização de um bom trabalho é preciso sempre nutrir um encanto e uma profunda paixão pelo que se pretende realizar. A você Rosi, meu maior obrigado, minha mais profunda admiração e respeito.

Agradeço ao meu companheiro Renato, que sempre me compreendeu, me incentivou e forneceu suporte. Agradeço pela sua dedicação e por cuidar de mim durante todos estes anos sem faltar um único dia, por sua paciência inesgotável. Sem você Renato, seria impossível chegar até aqui da forma que cheguei. A você dedico o meu amor, minha admiração sincera, e meu respeito.

Aos meus pais Nasívia e Jairo. Eu confesso que não seria ninguém sem esse amor de casal. Só consegui estudar e ser alguém na vida por causa deles. Se eu tive uma vida tranqüila e com todos os elementos necessários ao meu desenvolvimento, devo ao sacrifício de meus pais. Eu amo muito vocês pai e mãe. Admiração e respeito são insuficientes para expressar esse amor.

Gostaria de agradecer aos colegas do grupo de pesquisa de biofísica de alimentos, em particular a Ângela, Faby e a Carol. A Aninha, que é a pessoa mais doce e sensível desse mundo e foi extremamente companheira e amiga. A Ana Braga, por quem eu sempre nutri a mais profunda admiração profissional. Aos amigos do laboratório de engenharia de processos agradeço pelos mais diversos motivos. À Leila, que é uma amiga querida, por estar presente em

todos os momentos. Aos colegas da pós-graduação, em especial à Roberta que me incentivou tanto com conselhos nestes últimos meses. Às alunas de iniciação científica, Melina e Joicinha, que são meninas realmente adoráveis. Aos funcionários do LEP e do DEA, Dona Ana Rocha, Joyce e também ao carinho da Dona Castorina. Ao pessoal do laboratório de microscopia eletrônica e em especial a Adriana e a Antônia. Ao Professor Marcelo Menossi, (posso dizer meu co-orientador em muitos momentos) pelo apoio e suporte. A todos os amigos do centro de biologia molecular (CBMEG).

E aos amigos que sempre me incentivaram: A Giovana pelo amor, fidelidade e por preencher meus dias de alegria. A Claudia e ao Jefersson, pelo incentivo, onde a simples presença me inundava de energias positivas, principalmente nos momentos difíceis.

Sei que falta muita gente nesta lista, mas seria capaz de preencher muitas páginas com o nome de todos aqueles com quem convivi e me apoiaram ao longo de todos estes anos. Sou um homem de muita sorte e abençoado por Deus, isso é uma verdade incontestável.

OBRIGADO A TODOS!

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	xiv
---------------------	------------

ABSTRACT	xvi
-----------------	------------

CAPÍTULO 01. Introdução geral	1
1.1 Objetivos	8
1.2 Descrição dos capítulos	9
1.3 Justificativa da pesquisa	11
1.4 Referências	13

CAPÍTULO 02. Revisão bibliográfica	19
2.1 Proteínas do soro do leite bovino	21
2.1.1 β -Lactoglobulina (β -Lg)	25
2.1.2 α -Lactoalbumina (α -La)	26
2.1.3 Albumina Bovina (BSA)	28
2.1.4 Imunoglobulinas (Ig)	29
2.2 Géis de proteínas globulares	29
2.2.1 Indução do processo de gelificação das proteínas do soro do leite.	30
2.2.2 Gelificação a frio por modificação do pH	33
2.2.3 Relevância Industrial	44
2.3 Polissacarídeos	44
2.3.1 Xantana	45
2.3.2 Goma Guar	46
2.4 Interações entre proteínas e polissacarídeos	48
2.5 Géis mistos	49
2.6 Propriedades macro e microscópicas de géis protéicos	53
2.7 REFERENCIAS	62

CHAPTER 03. Evaluation of whey protein interactions in acidic cold set gels at different pH values	
Le Lait – Dairy Science and Technology (under review)	73
Abstract	76
1. Introduction	77
2 Material and methods	79
2.1. <i>Material and chemicals</i>	79
2.2. <i>Gel preparation</i>	79

2.3. Mechanical properties	81
2.4. Water holding capacity (WHC)	81
2.5. Determination of protein solubility	82
2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	83
2.7. Protein electro-elution from the polyacrylamide gel	84
2.8. Statistical analysis	85
3 Results and Discussion	85
3.1. Soluble whey protein aggregates	86
3.2. Protein solubility in water and in different buffer systems	90
3.3. PAGE of water-soluble protein fractions	94
3.4. PAGE of buffer soluble protein fractions	102
3.5. Mechanical properties of the gels at equilibrium pH	104
4. Conclusions	106
References	108

CHAPTER 04 The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins

Food Hydrocolloids (in press)	113
Abstract	115
1 Introduction	116
2 Material and methods	119
2.1 Materials and chemicals	119
2.2 Gel preparation	119
2.3 Rheological properties	121
2.3.1 Small amplitude oscillatory rheology	121
2.3.2 Mechanical properties	122
2.4 Statistical analysis	123
3 Results	123
3.1 pH Kinetics.	123
3.2 Gelation Kinetics: Measurements up to the gel point (t_g).	125
3.3 Gelation kinetics from gel point to final pH value.	127
4 Conclusions	141
References	142

CHAPTER 05. Microstructure of cold set whey protein gels with addition of polysaccharides. Fractal and lacunarity analysis.

(to be submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry)	147
Abstract	149
1. Introduction	150
2 Material and methods	155
2.1 Materials	155
2.2 Preparation of biopolymers stock solutions	155
2.3 Preparation of the gels: GDL-induced acidification	156

<i>2.4 Rheological properties: Mechanical Properties</i>	158
<i>2.5 Scanning electron microscopy</i>	158
<i>2.6. Evaluation of fractal dimension (D_f) from the SEM images.</i>	159
<i>2.7. Evaluation of lacunarity (Λ) from the SEM images</i>	159
<i>2.8 Statistical analysis</i>	160
3 Results and Discussion	161
<i>3.1 Visual appearance of the mixed WPI-polysaccharides cold set gels.</i>	161
<i>3.2 Microstructure visualization by SEM microscopy</i>	162
<i>3.3 Mechanical properties</i>	170
<i>3.4 Morphology of the SEM images evaluated by fractal dimension and lacunarity</i>	176
4. Conclusions	184
References	186
<u>CAPÍTULO 06. Conclusões Gerais.</u>	191
<u>ANEXOS</u>	199
ANEXO 1 – Conceitos básicos de fractais	201
ANEXO 2 - Análise de imagem para a análise fractal	205
Referências	217

ÍNDICE DE TABELAS
Capítulo 2

Tabela 2.1: Composição e algumas propriedades das proteínas do soro do leite	22
Tabela 2.2: Composição aminoacídica das principais proteínas do soro bovino.	23
Tabela 2.3: Características gerais das interações moleculares entre moléculas protéicas similares em solução aquosa.	24
Tabela 2.4 A: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL – Ano de 1998	39
Tabela 2.4 B: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL- De 2000 a 2002	40
Tabela 2.4 C: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL – Ano de 2003	41
Tabela 2.4 D: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL – Ano de 2004	42
Tabela 2.4 E: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL – trabalho realizado no grupo de pesquisa (Laboratório de Engenharia de Processos DEA/FEA/UNICAMP	43

Capítulo 4

Table 1: Fitting parameters for the pH kinetics	124
Table 2: Gel point (t_g), corresponding pH, complex modulus (G^*) and its derivative ($dG^*/d(t/t_g)$) for the WPI systems as a function of the different GDL/WPI ratios. $ dpH/dt$ at t_g means the pH first derivative in relation to acidification time, t_{ss} and pH_{ss} are the time and corresponding pH of the first self-supported gel observed..	127

Capítulo 5

Table 1: GDL/WPI ratio (R_{GDL}) for each correspondent pH after 48 hours of storage at 10°C.	157
Table 2: Visual appearance of the obtained gels at final pH values after 48 hours of storage at 10°C	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1: Esquema da conversão de proteínas nativas em uma rede protéica de acordo com o processo de indução térmica e/ou de gelificação a frio.	32
Figura 2.2: Esquema do processo de gelificação a frio induzido por modificação do pH.	34
Figura 2.3: Hidrólise do GDL a ácido glucônico	35
Figura 2.4: Estrutura primária da xantana	46
Figura 2.5: Fragmento da estrutura de algumas galactomananas incluindo a goma guar	47
Figura 2.6: Esquema de misturas de biopolímeros e tipos de interação possíveis.	49
Figura 2.7: Representação esquemática de sistemas gelificados com 2 componentes.	50
Figura 2.8: Representação esquemática da gelificação de sistemas multicomponente com separação de fases	51
Figura 2.9: Representação esquemática do conjunto de fatores associados às propriedades macroscópicas de agregados de partículas coloidais.	54
Figura 2.10: Representação esquemática da rede de um gel coloidal	56

Capítulo 3

Figure 1: Heat-induced polymerisation of whey proteins: (A) Native PAGE, (B) SDS-PAGE under non-reducing conditions and (C) SDS-PAGE under reducing conditions.	86
Figure 2: Solubility profile of 7% (w/w) WPI cold set gels acidified with GDL.	90
Figure 3: Water holding capacity of 7% (w/w) WPI cold set gels acidified with GDL.	93
Figure 4: (A) NATIVE PAGE, (B) SDS-PAGE under non-reducing conditions and (C) SDS-PAGE under reducing conditions, of water-soluble protein fractions of WPI cold set gels.	95
Figure 5: Reducing SDS-PAGE of the aggregates extracted from Native PAGE (Figure 4 A) by electro-elution.	97
Figure 6: Whey protein composition of water supernatant in solubility experiments (C_{WPsup}).	100
Figure 7: Precipitated fraction of each whey protein in water, calculated in relation to its initial amount.	102
Figure 8: SDS-PAGE under non-reducing (A and C) and reducing (B and D) conditions for the soluble WP protein aggregates extracted in different pH 8.0 buffers.	103
Figure 9: Mechanical properties of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios. (A) Stress at rupture, (B) elasticity modulus and (C) strain at rupture.	105

Capítulo 4

Figure 1. Changes in the pH of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios	124
Figure 2. Time dependence of the complex modulus G^* (at 0.1 Hz) for 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios	126
Figure 3. Stress at rupture (A) and elasticity modulus (B) of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios	128
Figure 4. (A) Rupture stress and (B) elasticity modulus of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios as a function of pH lowering.	129
Figure 5. Strain at rupture (ϵ_H) of 7% (w/w) heat-denatured WPI gels as a function of the time of acidification (A) and pH (B), with different GDL/WPI ratios	133
Figure 6. (A) Stress at rupture and (B) elasticity modulus obtained at the same pH but with different acidification rates.	136
Figure 7. (A) Time to reach the equilibrium pH and equilibrium rupture stress (σ_{eq}). (B) Stress at rupture at the moment of reaching equilibrium pH and equilibrium rupture stress (σ_{eq})	139

Capítulo 5

Figure 1: SEM micrographs of pure 5% WPI acidic cold set gels. (A) pH 5.2, (B) pH 4.7 and (C) pH 4.2. Scale bar corresponds to 10 μ m.	163
Figure 2: SEM micrographs (left) and corresponding binary gray scale images (right) of macroscopic phase separated gels of WPI with addition of 0.1% of xanthan at pH 5.2.	164
Figure 3: SEM micrographs of 5% WPI cold set gels with addition of 0.1% of xanthan at (A) pHs 4.7 and (B) 4.2.	165
Figure 4: SEM micrographs of 5% WPI cold set gels with addition of xanthan (0.3% -top row and 0.5% - bottom row). Final pH values: (A, D) 5.2, (B, E) 4.7 and (C, F) 4.2.	166
Figure 5: SEM micrographs of 5% WPI cold set gels with addition of guar (top row are 0.1%, middle row are 0.3% and bottom row are 0.5% of guar). Final pH values: (A, D, G) 5.2, (B, E, H) 4.7 and (C, F, I) 4.2.	167
Figure 6: Stress at rupture (kPa) of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides:	171
Figure 7: Elasticity modulus of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides.	172

Figure 8: Strain at rupture of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides.	173
Figure 9: Examples of box count plots for the determination of D_f from SEM 8-bit binary images of pH 5.2 cold set whey protein gels	177
Figure 10: Fractal dimension of (A) xanthan and (B) guar gels.	178
Figure 11: Example of typical lacunarity plot from SEM binary images of the cold set gels at pH 5.2.	180
Figure 12: Lacunarity ($\Lambda\varepsilon$) obtained during a box count procedure, at a reference box of 100 pixels.	182

ANEXOS

Figura A1.1: Fractais de Koch	202
Figura A1.2: Padrões de similaridade (“self similarity”) da estrutura ramificada de uma folha de samambaia.	203
Figura A2.1: Exemplificação do modo de cor RGB.	206
Figura A2.2: Preparação para a determinação da dimensão fractal do contorno de uma célula neuronal.	208
Figura A2.3: Distribuição do nível de cinza, “Grey level”, (GL) da imagem original mostrada no detalhe.	211
Figura A2.4: Posicionamento de grades sob a estrutura fractal de uma imagem fractal.	213
Figura A2.5: Imagens com diferentes padrões de distribuição de espaços em função da variação da escala de segmentação da imagem	216
Figura A2.6: Distribuição de espaços em função da variação da escala de segmentação da imagem para uma imagem de distribuição de pixels homogênea.	217

Tese de Doutorado

AUTOR: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

TÍTULO: Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: Efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Rosiane Lopes da Cunha.

Departamento de Engenharia de Alimentos – FEA - UNICAMP

RESUMO GERAL

A gelificação a frio de soluções de isolado protéico de soro (WPI) foi realizada pela adição de diferentes quantidades de glucona- δ -lactona (GDL) a soluções de WPI desnaturadas termicamente (80°C/30 minutos). Foram analisados sistemas protéicos puros (WPI na concentração de 7% p/p) e mistos, após a adição de xantana ou guar (concentração WPI 5% fixa e de polissacarídeos, 0,1, 0,3 e 0,5% p/p). Estes sistemas exibiram diferentes taxas de acidificação e valores de pH final em torno do ponto isoelétrico das principais frações protéicas do soro (5,2 a 3,9). Nos sistemas protéicos puros foi possível distinguir dois estágios de desenvolvimento estrutural: 1-início da formação da rede até o ponto de gel, em que as propriedades reológicas não foram influenciadas pela taxa de acidificação, e 2-subseqüente desenvolvimento estrutural com a redução do pH devido a fortalecimento de ligações e rearranjos estruturais. O processo lento de acidificação levou a géis mais estruturados no pH final de 5,2 enquanto que a acidificação rápida produziu géis mais frágeis (pH 4,2), que mostraram rearranjo estrutural após a obtenção do pH final. No pH de equilíbrio em torno do pI, a capacidade de retenção de água foi menor, o que foi associado à menor solubilidade protéica (exceto da fração β -Lg) nestas condições. A solubilidade protéica na presença ou ausência de condições desnaturantes indicou que interações eletrostáticas foram responsáveis pela manutenção da rede nos pHs 5,2 a 4,6, porém um maior caráter hidrofóbico foi visualizado no pH 4,2. A adição de polissacarídeos levou a uma descontinuidade da estrutura da rede do gel, com um aumento da quantidade de poros. A adição de xantana enfraqueceu a rede e diminuiu a sua deformabilidade. Em menores taxas de acidificação e concentração de xantana visualizou-se a formação de géis heterogêneos (separação de fases macroscópica), com maiores valores de lacunaridade

(descontinuidade da microestrutura), e menores valores de dimensão fractal, D_f , (agregados protéicos menores e menos complexos na rede). No entanto, o aumento da taxa de acidificação e diminuição do pH final levou à formação de géis homogêneos, com uma rede mais forte, um sistema menos poroso e com maiores valores de D_f (agregados mais complexos na rede devido a maior interação eletrostática entre proteínas e xantana). Em elevadas concentrações de guar houve formação de géis não auto-sustentáveis com grande lacunaridade e menores D_f . Em menores concentrações de guar observou-se a formação de uma rede contínua no gel (menos porosa), com menores valores de D_f . Nos géis auto-sustentáveis foi visualizado que o aumento da taxa de acidificação levou a géis com maior valor de tensão de ruptura e módulo de elasticidade, maior D_f e menor lacunaridade, o que foi associado ao aumento de interação proteína-proteína. A descontinuidade da microestrutura nos géis WPI-xantana foi resultado de fenômenos simultâneos de separação de fases (condição inicial dos sistemas no pH 6,7) e gelificação (fase de redução de pH), sendo, portanto influenciada pela concentração de xantana, taxa de acidificação e pH final do gel, enquanto que nos géis WPI-guar o efeito predominante do aumento da concentração de guar foi associado a efeitos de exclusão de volume entre as proteínas do soro e a guar.

Palavras chave: Proteínas do soro, gelificação a frio, xantana, guar, microestrutura.

Ph. D. Thesis

AUTHOR: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

TITLE: Cold set gelation of whey proteins: Acidification rate, final pH and polysaccharide addition effects.

SUPERVISOR: Prof. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Department of Food Engineering – FEA - UNICAMP

ABSTRACT

The cold set gelation of whey protein isolate (WPI) solutions was induced by addition of several amounts of gluconic- δ -lactone (GDL) to thermal denatured (80°C/30min) WPI solutions. Pure whey protein systems (7% WPI w/w) and mixed WPI-xanthan or WPI-guar gels (5% WPI w/w with the addition of 0.1, 0.3 and 0.5% polysaccharide) were studied. The systems showed different acidification rates, which led to different final pH values near the isoelectric point (pI) of the main whey proteins (5.2 to 3.9). Two gelation stages were defined in pure whey protein systems: 1- until the gel point, in which the rheological properties were not influenced by the acidification rates; 2- gel structure development until the pH equilibrium, in which bonds strengthening and molecular rearrangements on gel network took place. Lower acidification rates led to stronger and structured gels at final pH 5.2. However, the increase in acidification condition caused the formation of weaker gels at final pH 4.2. In the latter case, molecular rearrangements on structure took place during a long time after the achievement of steady pH values. At this pH, the water retention capacity of the gels was also lower, which was attributed to more fragile network but mainly due to the lower protein solubility (except β -Lg fractions) near the pI. The protein solubility in buffers also showed that electrostatic interactions were involved in gel structure stabilization at final pH range of 5.2-4.6 and a more hydrophobic contribution was observed at pH 4.2. The polysaccharide addition caused the formation of great discontinuity on gels structure, leading to an increment on gel porosity. The xanthan addition weakened the gels. Heterogeneous gels (macroscopic phase separation), with higher values of lacunarity (network discontinuity) and lower values of fractal dimension, D_f , (smaller and less complex aggregates) were formed at lower acidification conditions and xanthan concentration. However, the increase in acidification rate led to homogeneous gels

formation, with lower lacunarity. This could be explained by an increased electrostatic attraction between proteins and xanthan at $\text{pH} < \text{pI}$, leading to higher values of stress at rupture and elasticity modulus at final pHs 5.2 and 4.2, respectively. At higher guar concentration the WPI-guar gels were not self-supported, with greater lacunarity and lower D_f values. More continuous network was observed for mixed gels at lower guar concentration. The increase in acidification rate led a reduction in lacunarity and an increase stress at rupture; elasticity modulus and D_f values of self supported WPI-guar gels. This latter result was attributed to an increase in protein-protein interactions. The network discontinuity in mixed WPI-xanthan gels was attributed to simultaneous effects of phase separation and gelation. These effects were influenced by xanthan concentration, acidification rate and final pH. However, mixed WPI-guar gels showed a predominant effect of guar concentration on microstructure discontinuity, which was attributed to excluded volume effects between the whey proteins and guar.

Keywords: Whey proteins, cold gelation, xanthan, guar, microstructure.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

A preferência dos consumidores por produtos industrializados que apresentam reduzido teor de gordura, porém com a mesma textura e sabor agradável do produto tradicional tem crescido ao longo dos últimos anos. A indústria de laticínios é um dos setores que mais vivencia esta demanda, devido a uma intensificação e diversificação das linhas de produção utilizando uma variedade de ingredientes aptos a conferir tais atributos aos alimentos formulados. Estes alimentos processados são estruturados e estabilizados por um complexo arranjo dos vários constituintes alimentícios e dentre estes, as proteínas e os polissacarídeos desempenham um papel chave devido às suas propriedades funcionais e de interação.

O soro do leite já foi considerado um subproduto resultante da fabricação de queijos após a coagulação da caseína, obtida por adição de ácido ou de enzima (soro doce). No entanto, o soro possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, especialmente dos sulfurados. A quantidade de aminoácidos presentes nas proteínas do soro é superior às doses recomendadas a crianças de dois a cinco anos e aos adultos [DE WIT, 1998, SMITHERS et al., 1996].

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade e capacidade de gelificação [DIAS, 2004, MICKE et al., 2002, ROSANELI et al., 2002, SGARBIERI & PACHECO, 1999]. Em relação aos aspectos nutricionais e fisiológicos, as proteínas do soro do leite podem ser usadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis (na forma de proteínas nativas ou hidrolisadas contribuem com o ganho

de peso), em dietas de alimentos de baixas calorias (substituinte de gordura) ou na formulação de alimentos e bebidas [BOTTOMLEY et al., 1990, DE WIT, 1998].

O estudo das propriedades de gelificação de proteínas é importante para a indústria de alimentos por permitir o desenvolvimento de novos produtos e melhorar a textura e outros atributos sensoriais de alimentos tradicionais. A gelificação a frio é um método relativamente novo de produção de géis protéicos, que consiste em um pré-aquecimento de proteínas globulares para promover a sua desnaturação parcial seguido de uma etapa de incubação que promove a gelificação devido à ação de aditivos como sais ou acidulantes [BRYANT & MCCLEMENTS, 1998]. Este processo encontra aplicação em uma grande variedade de produtos e pode ser utilizada para promover a retenção de ferro em alimentos (quando da adição de íons ferro para promover a gelificação) [REMONDETTO et al., 2002], melhorar a textura de produtos cárneos (produtos mais firmes e com consistência mais agradável aos consumidores) [HONGSPRABHAS & BARRET, 1999, HONGSPRABHAS & BARBUT, 1999] ou permitir a encapsulação de retinol, devido à gelificação em temperaturas reduzidas e a propriedade da β -Lg de se ligar a este composto [BEAULIEU et al., 2002].

A gelificação a frio das proteínas do soro obtida através da acidificação do meio com glucono-delta-lactona (GDL) tem sido amplamente estudada nos últimos 10 anos [ALTING et al., 2003a, ALTING et al., 2003b, ALTING et al., 2004, JU & KILARA, 1998a, b, c]. O uso do GDL apresenta a vantagem de causar um decréscimo lento do pH e evitar algumas dificuldades de processo associadas ao emprego de bactérias lácticas como meio de acidificação [LUCEY et al., 1998]. Em solução, o GDL se hidrolisa em ácido

glucônico promovendo a redução do pH, sendo este processo dependente da temperatura. Em geral o tempo necessário para a hidrólise do GDL será maior quanto menor for a temperatura.

As condições de processo de indução da gelificação a frio de proteínas do soro são bastante variadas. Em estudos anteriores, a gelificação foi induzida em temperaturas ambientes [ALTING et al., 2000, ALTING et al., 2002, ALTING et al., 2003a] ou superiores [JU & KILARA, 1998a, b, c]. A velocidade do processo de acidificação é um fator determinante para as características de textura dos géis protéicos, uma vez que géis acidificados lentamente são mais resistentes à compressão e mais estruturados, enquanto que em condições intensas de acidificação são fracos e débeis [BRAGA et al., 2006a]. No entanto, poucos são os estudos que relatam a relação entre as propriedades de géis de soro produzidos a frio com a velocidade de acidificação utilizada.

As propriedades mecânicas de géis de proteínas do soro produzidos a frio podem ser moduladas não somente pela velocidade do processo de acidificação, mas também pelo pH final do sistema [ALTING et al., 2004]. Géis acidificados até valores de pH em torno do pI das proteínas do soro, são mais rígidos [JU & KILARA, 1998b]. O decréscimo de pH leva a que as interações moleculares associadas à manutenção da rede protéica destes géis de proteínas do soro produzidos a frio sejam essencialmente devido às interações eletrostáticas entre os agregados protéicos, porém as pontes dissulfídicas estariam diretamente associadas à força da rede [ALTING et al., 2000]. As forças de interação entre as frações protéicas na matriz da rede dos géis têm sido distinguida e quantificada através da solubilidade protéica em diferentes tampões em conjunto com ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida [BRAGA et al., 2006b]. A solubilidade em diferentes tampões também tem sido utilizada

na tentativa de avaliar como estas interações estão relacionadas com as características de retenção de água e propriedades mecânicas do sistema [LUPANO, 2000, SHIMADA & CHEFTEL, 1988].

Os produtos alimentícios podem ser considerados sistemas multicomponentes ou misturas, em que um ou mais biopolímeros (gelificantes ou não) são incorporados ao sistema para obter as características ótimas de textura [MORRIS & WILDE, 1997]. Apesar do estudo detalhado da gelificação a frio de sistemas protéicos ter sido iniciada recentemente [BRYANT & MCCLEMENTS, 1998], poucos trabalhos abordam as propriedades da gelificação a frio de sistemas mistos de proteína/polissacarídeos. Um dos poucos exemplos encontrados na literatura é o estudo do efeito da adição de xantana na gelificação a frio de proteínas do soro, induzida por NaCl [BRYANT & MCCLEMENTS, 2000]. Também foram encontrados estudos da gelificação das proteínas do leite em conjunto com xantana e/ou goma jataí [SANCHEZ et al., 2000] pela acidificação do sistema, e recentemente foi avaliado este mesmo processo com a adição de diversos polissacarídeos de diferentes densidades de cargas, em particular a xantana e a goma guar [DE JONG & VAN DE VELDE, 2007]. No entanto, em ambos os casos a formação dos géis foi realizada em uma taxa fixa de acidificação levando a pHs finais dos géis em torno de 5,0, permanecendo pouco explorado o efeito da velocidade do processo de acidificação nestes sistemas mistos.

Neste trabalho foi avaliado o efeito da adição de xantana ou guar nos géis de proteínas do soro do leite formados a frio em diferentes condições de acidificação. A xantana é um polissacarídeo aniônico comumente utilizado como estabilizante e espessante em produtos alimentícios, enquanto que a guar (polissacarídeo neutro) é a galactomanana

mais utilizada em alimentos devido à sua habilidade de formar soluções viscosas mesmo quando adicionadas em pequenas quantidades na etapa de formulação, sendo esta propriedade pouco afetada por adição de íons, modificações do pH ou aplicação de aquecimento.

Recentemente, a análise fractal tem atraído muita atenção como um método analítico quantitativo para caracterizar a agregação e a microestrutura de sistemas protéicos. Fractais são caracterizados por padrões de auto-similaridade “self-similarity”, e não são descritos por fórmulas matemáticas, mas sim por dependências periódicas, sendo que as dimensões fractais não podem ser representadas por números inteiros [KAYE, 1989, MANDELBROT, 1983].

A análise fractal de sistemas protéicos puros tem sido bastante utilizada e explorada na literatura [DÁVILA & PERÉS, 2007, HAGIWARA et al., 1997a, HAGIWARA et al., 1997b, HAGIWARA et al., 1998]. Com este intuito relações de escala foram utilizadas para a correlação da agregação do sistema com o aumento exponencial da elasticidade da rede em função da concentração protéica no gel, sendo a dimensão fractal um expoente desta relação [SHIH et al., 1990, WU & MORBIDELLI, 2001]. No entanto, estudos da agregação fractal de sistemas binários proteína-polissacarídeo ainda não foram encontrados. Este fato pode estar associado à dificuldade de utilizar relações de escala uma vez que a adição de polissacarídeos ao sistema protéico pode levar a uma alteração significativa da rede do gel devido a um aumento da porosidade da microestrutura como consequência dos fenômenos simultâneos de gelificação e separação de fases durante a fase de acidificação [DE JONG & VAN DE VELDE, 2007, SANCHEZ et al., 2000]. Apesar destas limitações, as técnicas de análise de imagem a partir de micrografias do sistema correspondem a

métodos diretos de determinação da estrutura fractal e, portanto poderiam ser utilizadas para a avaliação das características estruturais de sistemas binários. O fato da metodologia de análise de imagem também permitir a determinação da propriedade de lacunaridade ou descontinuidade da rede, abre a possibilidade de se utilizar este parâmetro para a descrição da porosidade da microestrutura de sistemas binários causada pela adição de polissacarídeos. A quantificação dos parâmetros estruturais facilitaria a comparação destes resultados com outras técnicas como a avaliação das propriedades mecânicas, permitindo inferir conclusões mais fundamentadas sobre o comportamento reológico estrutural de sistemas complexos.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o processo de gelificação a frio de proteínas do soro do leite usando GDL como precursor ácido sendo primeiramente avaliados sistemas protéicos puros e em seguida avaliados o efeito da adição de polissacarídeos nestes sistemas.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Avaliar o efeito da taxa de acidificação e de diferentes valores de pHs finais (em torno do ponto isoelétrico das proteínas do soro), decorrentes do emprego de diferentes quantidades de GDL, na cinética de gelificação dos sistemas puros de proteínas. Com este intuito foi realizada a avaliação das propriedades reológicas dos géis durante todo o processo de formação dos géis até a obtenção do pH final de equilíbrio.

- 2- Avaliar as interações moleculares responsáveis pelas propriedades de estrutura nos géis protéicos puros após a obtenção do pH final de equilíbrio. Ensaios de solubilidade protéica em diferentes tampões em conjunto com ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida das frações protéicas solúveis nos diferentes tampões foram utilizados para este fim.
- 3- Avaliar o efeito da adição de dois polissacarídeos de diferentes densidades de cargas na agregação do sistema protéico e nas propriedades mecânicas dos géis após a obtenção do pH final de equilíbrio dos géis. Os polissacarídeos utilizados foram xantana e guar. Com este objetivo foram avaliadas a microestrutura dos géis por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as propriedades mecânicas no pH final, sendo que a agregação foi estudada através da dimensão fractal e lacunaridade dos géis.

Desta forma a apresentação deste trabalho foi organizada em 5 capítulos descritos a seguir:

1.2 Descrição dos Capítulos

Capítulo 1: Introdução.

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica geral.

Neste capítulo são abordados aspectos teóricos dos sistemas estudados, bem como uma revisão bibliográfica relatando a literatura recente e mais relevante sobre o tema deste trabalho.

Capítulo 3: The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins.

Neste capítulo foi realizado um estudo do desenvolvimento estrutural da rede protéica durante a etapa de gelificação, de forma a se distinguir a magnitude dos efeitos simultâneos de velocidade de acidificação, pH final e tempo de manutenção dos géis no pH final. Assim, diferentes quantidades de GDL foram adicionadas a soluções de proteínas do soro previamente desnaturadas a 80°C por um período de 30 minutos e as propriedades reológicas foram determinadas em cisalhamento e em compressão até a obtenção das condições de equilíbrio de pH e de propriedades mecânicas.

Capítulo 4: Evaluation of whey protein interactions in acidic cold set gels at different pH values.

Neste capítulo são avaliadas as interações moleculares associadas à manutenção da rede protéica obtida no pH final de equilíbrio. Condições de acidificação foram empregadas de forma a se obter géis com pH final em torno do ponto isoelétrico das proteínas do soro após 48 horas de armazenamento a 10°C. As interações foram estudadas pela determinação da solubilidade protéica do gel em diferentes tampões em conjunto com análises de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Capítulo 5: Microstructure of cold set whey protein gels with addition of polysaccharides. Fractal and lacunarity analysis.

Neste capítulo foram avaliadas a microestrutura (utilizando ensaios de microscopia eletrônica de varredura- MEV) e as propriedades reológicas (obtidas em compressão uniaxial) dos géis de proteínas do soro formados a frio, puros ou mistos com a adição de diferentes quantidades de xantana ou guar. Os resultados foram avaliados pela comparação

das propriedades dos géis puros e mistos, permitindo a avaliação dos efeitos associados à adição dos polissacarídeos. As propriedades reológicas dos diferentes géis foram relacionadas à microestrutura do sistema. O efeito da adição de polissacarídeos na agregação protéica e no aumento da descontinuidade da microestrutura foram avaliados pelos parâmetros de dimensão fractal (D_f) e lacunaridade, respectivamente, os quais foram obtidos por análises de imagem das microestruturas MEV.

Capítulo 6: Conclusões gerais.

Neste capítulo as principais conclusões sobre os resultados obtidos são relatadas e discutidas.

ANEXOS.

Nos anexos são apresentadas descrições dos procedimentos de tratamentos de dados associados à metodologia de análise de imagem para a determinação dos parâmetros de dimensão fractal (D_f) e lacunaridade a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

1.3 Justificativa da Pesquisa

Este trabalho de doutorado se iniciou no ano de 2003 logo após a conclusão do trabalho para a obtenção do título de mestre em engenharia de alimentos [CAVALLIERI, 2003]. Desta forma, os objetivos preliminares naturais do trabalho de doutorado correspondiam à conclusão de pontos-chave levantados durante o trabalho de mestrado e na elaboração de trabalhos a serem submetidos à publicação. De maneira geral, os pontos a serem concluídos correspondiam:

- 1- Avaliação dos efeitos cinéticos associados ao emprego de diferentes quantidades de GDL na formação de géis de proteínas do soro.
- 2- Construção do diagrama de comportamento de fases associado a misturas de proteínas do soro e xantana no pH 6,7.

O primeiro objetivo visava atender à complementação de resultados de propriedades mecânicas (obtidas pela técnica reológica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação - CBIL) de géis puros de proteínas do soro formados em diferentes condições de acidificação e em ampla faixa de pHs finais. Também era necessária a descrição das interações moleculares entre os agregados protéicos para a correlação com comportamentos reológicos observados nos géis durante a realização do mestrado. Este objetivo foi integralmente atendido através das publicações já em processo de finalização apresentadas nos capítulos 3 e 4 desta tese de doutorado.

Para a realização do segundo objetivo preliminar foram realizados no grupo de pesquisa diversos trabalhos em paralelo [BRAGA, 2006]. O trabalho de BRAGA [2006] apresentou as dificuldades associadas à análise das interações em sistemas bipolímeros proteínas-polissacarídeos, bem como as dificuldades experimentais associadas ao experimento de construção de diagramas de fases de sistemas com elevada viscosidade e/ou gelificantes.

Durante a realização dos ensaios para a avaliação do efeito de diferentes taxas de acidificação nas propriedades de géis de proteínas do soro formados a frio, chamou particular atenção a grande modificação das características dos géis devido à adição de xantana (descritas no Capítulo 5 deste trabalho). Um trabalho de iniciação científica foi realizado paralelamente com um sistema semelhante, porém com a adição da goma guar,

revelando propriedades ainda mais distintas (dados não publicados). A análise bibliográfica demonstrava que sistemas mistos de proteínas globulares e polissacarídeos gelificados a frio (e em particular, acidificados em diferentes taxas) eram praticamente inexplorados, o que motivou o seu estudo. Em virtude do amplo espectro de propriedades reológicas dos sistemas mistos no pH neutro ou em torno do pI (após acidificação lenta em diferentes taxas), optou-se neste trabalho pela concentração de esforços no estudo dos sistemas gelificados.

1.4 Referências

- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, G. G.; VISSCHERS, R. W. Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 10, p. 5001-5007, 2000.
- ALTING, A. C.; DE JONGH, H. H. J.; VISSCHERS, R. W.; SIMONS, J. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 16, p. 4682-4689, 2002.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; PAQUES, M.; VISSCHERS, R. W. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 469-479, 2003a.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 3150-3156, 2003b.
- ALTING, A. C.; VAN DER MEULENA, E. T.; HUGENHOLTZ, J.; VISSCHERS, R. W. Control of texture of cold-set gels through programmed bacterial acidification. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 323-329, 2004.

- BEAULIEU, L.; SAVOIE, L.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 2, p. 239-248, 2002.
- BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, C. J. Whey proteins. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food gels**: London: 1990. Cap. 11, p. 435-466.
- BRAGA, A. L. M.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. The effect of the glucono-delta-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 389-398, 2006a.
- BRAGA, A. L. M.; AZEVEDO, A.; MARQUES, M. J.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: the effect of salt addition. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1178-1189, 2006b.
- BRAGA, A. L. M. **Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos**. 2006. 255 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 143-151, 1998.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat- denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 383-390, 2000.
- CAVALLIERI, A. L. F. **Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana**. 2003. 109 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- DÀVILA, E.; PERÉS, D. Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 147-153, 2007.

- DE JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, "in press" Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/foodhyd>>. Acesso em: 25 jan. 2007.
- DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.
- DIAS, N. F. G. P. **Propriedades imunoestimulatórias e antitumoral de cncentrados proteicos de soro de leite bovino, de caseína e de um isolado proteico de soja**. 2004. 1741 p. Tese (Doutor em alimentos e nutrição) - Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T.; NAKAMURA, K. Analysis of aggregate structure in food protein gels with the concept of fractal. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 10, p. 1663–1667, 1997a.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T. Fractal analysis of the elasticity of BSA and beta-Lactoglobulin gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3807-3812, 1997b.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; NAKAMURA, K. Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-36, 1998.
- HONGSPRABHAS, P.; BARRET, A. Effect of pre-heated whey protein level and salt on texture development of poultry meat batters. **Food Research International**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 145-149, 1999.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Use of cold-set whey protein gelation to improve poultry meat batters. **Poultry science**, Savoy, v. 78, n. 7, p. 1074-1078, 1999.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3604-3608, 1998a.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 288-292, 1998b.

- JU, Z. Y.; KILARA, A. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1830-1835, 1998c.
- KAYE, B. H. **A random walk through fractal dimensions**. First Edition ed. Weinheim, Germany: VHC Verlagsgesellschaft, 1989. 421 p.
- LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. **Food Research International**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 147-155, 1998.
- LUPANO, C. E. Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 8, p. 691-696, 2000.
- MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York: Freeman Press, 1983. 468 p.
- MICKE, P.; BEEH, K. M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 41, n. 1, p. 12-18, 2002.
- MORRIS, V. J.; WILDE, P. J. Interactions of food biopolymers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 2, n.6, p. 567-572, 1997.
- REMONDETTO, G. E.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Cold gelation of β -lactoglobulin in the presence of iron. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 2, p. 586-595., 2002.
- ROSANELI, C. F.; BIGHETTI, A. E.; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SGARBIERI, V. C. Efficacy of whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 5, n. 3, p. 221-228, 2002.
- SANCHEZ, C.; ZUNIGA-LOPEZ, R.; SCHMITT, C.; DESPOND, S.; HARDY, J. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 199-212, 2000.

- SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Alimentos funcionais e fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Thechnology**, Campinas, v. 2, p. 7-19, 1999.
- SHIH, W. H.; SHIH, W. Y.; KIM, S. I.; LIU, J.; AKSAY, I. A. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. **Physical Review A**, College PK, v. 42, n. 8, p. 4772-4779, 1990.
- SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Texture Characteristics, Protein Solubility, and Sulfhydryl-Group Disulfide Bond Contents of Heat-Induced Gels of Whey-Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1018-1025, 1988.
- SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.
- WU, H.; MORBIDELLI, M. A model relating structure of colloidal gel to their elastic properties. **Langmuir**, Washington, v. 17, n. 4, p. 1030-1036, 2001.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica Geral

2.1 Proteínas do soro do leite bovino

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite, e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e algumas bebidas não fermentadas como achocolatados e leite aromatizado. Contudo, o aproveitamento desse produto resultante da indústria de laticínios atinge apenas 15% do total de soro produzido no Brasil [CAPITANI et al., 2005]. Todo o potencial comercial do soro não tem sido ainda bem explorado no Brasil devido ao alto custo das tecnologias para a obtenção das frações protéicas concentradas ou isoladas. Apesar disso, o Brasil é um importador de produtos industrializados de proteínas do soro utilizados como ingredientes. Ingredientes a base de proteínas do soro podem ser adquiridos em diferentes formas sendo as mais comuns os isolados (WPI) e concentrados protéicos (WPC). O WPI possui elevado teor protéico (geralmente maior que 90%) e contém menos impurezas que os concentrados (50 a 85% de proteínas), sendo um produto de elevado custo devido à maior elaboração no processo de produção [BRYANT & MCCLEMENTS, 1998, MORR & HA, 1993].

As principais frações protéicas do soro incluem a β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La) e a albumina bovina sérica (BSA), nas concentrações em torno de 3,7; 0,6; e 0,3 g/L de leite no soro do leite bovino, respectivamente. Outras proteínas estão presentes em concentrações mais baixas, são elas: imunoglobulinas (Ig), lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase [DE WIT, 1998, MORR & HA, 1993] As principais características das proteínas do soro estão resumidas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição e algumas propriedades das proteínas do soro do leite bovino [MORR & HA, 1993].

	β -Lg	α -La	BSA	Ig
Ponto isoeletrico	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3
Concentração no soro (g/L)	2-4	0,6-1,7	0,4	0,4-1,0
Concentração no soro (% total das proteínas)	56-60	18-24	6-12	6-12
Massa Molar (Da)	18.000	14.000	66.000	\geq 146.000
Hidrofobicidade média (kcal/resíduo)	1075	1020	995	nd
Total de resíduos aminoácidos (/mol)	162	126	581	nd
Resíduos apolares (/mol)	54	44	163	nd
Resíduos contendo cisteína (/mol)	5	8	35	nd
Resíduos dissulfídicos (/mol)	2	4	17	nd
Resíduos sulfidrilas livres (/mol)	1	0	1	nd

nd = não declarado

A Tabela 2.2 apresenta a composição aminoácida das principais proteínas do soro. Muitas das propriedades individuais das proteínas estão relacionadas à sua composição de aminoácidos [KINSELLA & WHITEHEAD, 1990]. Os aminoácidos podem ser classificados em várias categorias baseadas no grau de interação de suas cadeias laterais (radicais) com a água [DAMODARAN, 1996].

As propriedades funcionais das proteínas são fortemente determinadas pela sua estrutura e pelas interações entre as moléculas protéicas [KINSELLA & WHITEHEAD, 1990]. O entendimento das bases da funcionalidade protéica é essencial para o desenvolvimento e aplicação de novos produtos. As possibilidades principais de interações protéicas correspondem a interações do tipo estérica e de van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações do tipo pontes de hidrogênio e dissulfídicas, estas últimas resultantes das interações entre grupos cisteína ou sulfidrilas livres (Tabela 2.3).

Tabela 2.2: Composição aminoacídica das principais proteínas do soro bovino. Adaptado de [DAMODARAN, 1996, KINSELLA & WHITEHEAD, 1990].

Aminoácido	β -Lg	α -La	BSA	Afinidade com H ₂ O				
				Hidrofóbicos		Hidrofílicos		
				Cadeias alifáticas	Cadeias aromáticas	Carregados	Não carregados	
Ácido aspártico	Asp	11	9	41			X	
Aspartina	Asn	5	12	13				X
Treonina	Thr	8	7	34				X
Serina	Ser	7	7	28				X
Ácido glutâmico	Glu	16	8	59			X	
Glutamina	Gln	9	5	20				X
Prolina	Pro	8	2	28	X			
Glicina	Gly	3	6	15				X
Alanina	Ala	14	3	46	X			
Cisteína	Cys	5	8	35				X
Valina	Val	10	6	36	X			
Metionina	Met	4	1	4	X			
Isoleucina	Ile	10	8	14	X			
Leucina	Leu	22	13	61	X			
Tirosina	Tyr	4	4	19		X		
Fenilalanina	Phe	4	4	27		X		
Lisina	Lys	15	12	59			X	
Histidina	His	2	3	17			X	
Triptofano	Trp	2	4	2		X		
Arginina	Arg	3	1	23			X	
Total*		162	126	581				

* Total de resíduos aminoacídicos (/mol)

Tabela 2.3: Características gerais das interações moleculares entre moléculas protéicas similares em solução aquosa. Adaptado de [BRYANT & MCCLEMENTS, 1998, CHEFTEL et al., 1996].

Tipo	Sinal Energia (kJ/mol)	Força	Alcance	Influência do pH	Influência da força iônica	Grupos funcionais	Solvente	Efeito do aquecimento
Hidrofóbica	Atrativa 4-12	Forte	Longo	Não	Não	Aminoácidos com cadeias alifáticas e grupos aromáticos	Detergentes (SDS) e diluentes orgânicos	Aumenta
Eletrostática	Repulsiva /atrativa 42-84	Forte ou fraca	Curto ou longo	Sim	Diminui	Grupos carboxila (COO ⁻) e amina (NH ₃)	Soluções salinas, pHs altos e baixos	Aumenta
Pontes de hidrogênio	Atrativa 8-40	Fraca	Curto	Não	Não	Grupos amida, hidroxila e fenol -NH...O=C< -OH...O=C<	Soluções de uréia, cloridrato, guanidina, detergentes (SDS) e aquecimento	Diminui
Pontes dissulfídicas	Atrativa 330-380	Muito forte	-	Pouco	Sim	Grupos cistina S-S	Agentes redutores (β-mercaptoetanol e dietiltreitol)	-
Forças de van der Waals	Atrativa 1-9	Fraca	Curto	Não	Não	Dipolos permanentes e induzidos		

2.1.1 β -Lactoglobulina (β -Lg)

A β -lactoglobulina (β -Lg) é a proteína mais abundante do soro de leite, correspondendo a mais de 50% do seu total protéico. A β -Lg é uma proteína globular, que em sua estrutura molecular possui duas pontes dissulfídicas e um grupo tiol livre incluso na estrutura da proteína, existindo principalmente como um dímero no pH neutro [SAWYER et al., 2002]. Em pHs menores que 3,0 ou maiores que 8,0 os dímeros se dissociam em monômeros. Na faixa de pH entre 5,1 e 3,8 (abaixo do pI) a β -Lg tende a formar octâmeros, quando em baixa temperatura e elevadas concentrações de proteína [MORR & HA, 1993].

Na forma nativa e no pH natural do leite, a β -Lg aparece como uma cadeia protéica de 162 aminoácidos resultando em um complexo globular protéico enovelado em estruturas tridimensionais com as regiões hidrofóbicas da cadeia de aminoácidos voltadas para o interior, enquanto a região polar está exposta ao exterior. Uma das pontes dissulfeto é sempre encontrada ligando os resíduos 66 e 160 e a outra aparece em igual distribuição entre os resíduos 106 e 119 ou entre 106 e 121. Essa é uma situação não usual em estruturas protéicas e pode conferir propriedades de ligação singular para a β -Lg. Da mesma forma que as demais proteínas do soro do leite, a β -lactoglobulina se desnatura termicamente quando aquecida por 30 minutos a temperaturas superiores a 60°C. No mesmo tempo de aquecimento, porém a 95°C se verifica completa desnaturação, com extensa transformação conformacional e a exposição de áreas hidrofóbicas e grupos nucleofílicos (-SH: ϵ -NH⁺³) altamente reativos [HAVEA et al., 2001]. Vários modelos com diferentes graus de complexidade vêm sendo propostos para explicar a desnaturação térmica da β -Lg. O mais aceito envolve a dissociação dos dímeros em monômeros, seguido da perda da estrutura

globular e agregação por formação de pontes dissulfídicas e interações não covalentes intra ou intermoleculares [HONG & CREAMER, 2002].

A estrutura secundária da β -Lg consiste em folhas β antiparalelas (50%), formando nove cordas β (β strands) antiparalelas (A a I) que se arranjam na conformação espacial (estrutura terciária) formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior, o que caracteriza a família das proteínas lipocalinas (proteínas com função de transporte). A estrutura secundária ainda apresenta uma porção de α -hélice (15%), estruturas casualizadas (15%) e 20% das estruturas em curvas (turn structures).

A β -Lg tem a capacidade de se ligar e transportar retinol, e uma vez que é resistente à hidrólise peptídica durante a passagem pelo sistema gástrico, a provável função biológica da β -Lg consiste na transferência da vitamina A do leite materno para o neonato, via receptores específicos no intestino [SAWYER & KONTOPIDIS, 2000, WALSH & FITZGERALD, 2000]. Outras substâncias que se ligam à β -Lg, em geral, apresentam um caráter hidrofóbico e incluem ácidos graxos, retinóides, colesterol e menos pronunciadamente moléculas de hidrocarbonetos como tolueno e pentano [SAWYER et al., 2002].

2.1.2 α -Lactoalbumina (α -La)

A α -lactoalbumina (α -La) é a segunda proteína mais abundante do soro, representando 20% do total. Duas variantes genéticas de α -La (A e B) já foram identificadas, porém somente a variante B foi encontrada em leite das raças bovinas

ocidentais [SGARBIERI, 2005]. Os aminoácidos da variante B são arranjados de modo a formar uma estrutura globular compacta com massa molar de 14.176 Da, que se mantém estável por quatro pontes dissulfeto.

A propriedade mais característica da α -LA é a forte tendência de formar associações em pH abaixo do pI. No pH natural do leite, pH 6,7 e acima, a α -LA apresenta-se como um monômero [SGARBIERI, 2005]. A molécula de α -LA tem a forma elipsóide, com uma fenda profunda, dividindo a molécula em dois lados. Também apresenta 4 ligações dissulfídicas, embora estas não sejam essenciais para manter a sua estrutura [SGARBIERI, 2005], além de não possuir grupos sulfidril livres [MORR & HA, 1993].

A α -La é uma metaloproteína pois é capaz de ligar-se a íons como cálcio e zinco. O cálcio é fortemente ligado à molécula através de três resíduos de ácido aspártico, dando à α -La estabilidade contra a desnaturação térmica irreversível. A α -La em sua forma livre de íons Ca^{+2} tem sua temperatura de transição térmica reduzida de 66°C para 35°C [HONG & CREAMER, 2002]. Muitos autores relatam que a α -La sozinha não forma agregados sob aquecimento [DALGLEISH et al., 1997, HAVEA et al., 2000, 2001, 2002, HONG & CREAMER, 2002, ROJAS et al., 1997], sendo a presença de proteínas com grupos tiol livre, como a β -lg ou a BSA, um pré requisito para induzir a formação destes agregados [ROEFS & DE KRUIF, 1994].

A função biológica da α -La está associada à síntese de lactose pela regulação da atividade da enzima galactosil transferase [WALSH & FITZGERALD, 2000]. Ela promove a ligação da glicose à galactosil transferase, o que aumenta a transferência de galactose, preferencialmente da UDP-galactose (galactose em ligação glicosídica com difosfato

uridine) para glicose [KINSELLA & WHITEHEAD, 1990, PERMYAKOV & BERLINER, 2000].

2.1.3 Albumina Bovina Sérica (BSA)

A albumina bovina sérica (BSA) é uma proteína globular solúvel em água com massa molar de 66kDa, idêntica à albumina do soro sangüíneo. Em pHs abaixo do pI apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, como o aumento do volume hidrodinâmico e redução da solubilidade em solução salina. Sua estrutura secundária é formada de 54% de α -hélice, 40% de estruturas β (folhas e giros β) com três domínios específicos para ligações de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídeos. A quantidade de estrutura em α -hélice varia com o pH, de 54, 44 e 35% nos pHs 3,6, 3,9 e 2,7, respectivamente [SGARBIERI, 2005].

Duas características estruturais importantes da BSA são a presença de grupo sulfidril livre (resíduo 34) do peptídeo N terminal e a existência de 17 pontes dissulfeto [MORR & HA, 1993]. O rompimento dessas ligações resulta em modificações de algumas de suas propriedades físicas e estruturais, em especial o perfil de sedimentação, de solubilidade em função do pH e de suas propriedades imunológicas [SGARBIERI, 2005]. No estado nativo apresenta elevada solubilidade na faixa de pH 1,5 a 8,0 e quando as ligações dissulfídicas são rompidas aparece uma região de solubilidade mínima entre os pHs 3,5 a 5,0 que se amplia com o número de ligações rompidas [SGARBIERI, 2005].

A BSA tem como função orgânica o transporte de ácidos graxos insolúveis na corrente sangüínea [WALSH & FITZGERALD, 2000]. A ligação da BSA com ácidos graxos estabiliza a molécula protéica contra a desnaturação térmica, que é observada entre

40°C e 50°C, resultando na exposição dos resíduos apolares que favorecem as interações proteína-proteína. A BSA também se desnatura em pH ácido, o que é atribuído à repulsão mútua dos resíduos positivamente carregados presentes na cadeia polipeptídica [HAYAKAWA et al., 1992].

2.1.4 Imunoglobulinas (Ig)

O termo Imunoglobulina é aplicado para um conjunto de proteínas presentes no soro, todas de elevado peso molecular, com propriedades físicas, químicas e imunológicas semelhantes. Possuem peso molecular variando de 15 a 1000kDa. Estas proteínas exibem temperatura de desnaturação mais elevada que a α - lactoalbumina e a β -lactoglobulina, porém na presença destas proteínas do soro, as imunoglobulinas são extremamente termolábeis, sendo a interação entre elas realizada via pontes dissulfídicas [MORR & HA, 1993].

2.2 Géis de proteínas globulares

Géis de proteínas do soro podem ser formados pela adição de sais, ação enzimática, mudanças no pH ou por aquecimento. Quando uma proteína é aquecida, as ligações químicas que mantêm as estruturas secundárias e terciárias são enfraquecidas ou mesmo quebradas. Nos primeiros estágios de desnaturação térmica as moléculas de proteína começam a se desdobrar. Este desdobramento aumenta as interações solvente-proteína e proteína-proteína, levando à formação de uma estrutura tridimensional capaz de reter água, que pode conduzir à gelificação [MANGINO, 1984]. Os géis formados por aquecimento são denominados de “termicamente induzidos”.

As características da rede protéica do gel irão depender da intensidade dos diferentes tipos de interações entre as proteínas associadas à rede, bem como das

características destas proteínas (hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, composição aminoacídica, grupos funcionais disponíveis). Por sua vez, estas características serão profundamente influenciadas pelas condições empregadas durante o processo de gelificação (temperatura, pressão, etc) e das características do meio (concentração de proteína, pH e força iônica do sistema) [TOTOSAUS et al., 2002].

2.2.1 Indução do processo de gelificação das proteínas do soro do leite.

A gelificação de uma solução de proteínas globulares pode ser induzida de diversas formas. A gelificação térmica de proteínas globulares é o processo mais estudado na ciência de alimentos e é responsável pela estrutura presente em muitos alimentos [TOTOSAUS et al., 2002]. Outro método de indução física de gelificação corresponde aos processos a altas pressões. Estes dois processos levam à gelificação direta, ou seja, a desnaturação protéica e a agregação ocorrem de maneira simultânea [TOTOSAUS et al., 2002] (ver Figura 2.1). Estes processos podem ser conduzidos em diferentes valores de pH ou na presença de sais [TOTOSAUS et al., 2002]. A baixas forças iônicas ou valores de pH distantes do ponto isoelétrico (pI) da proteína, a repulsão eletrostática impede a formação de agregados protéicos desordenados, favorecendo a formação de agregados mais ordenados, permitindo a passagem de luz pelo sistema e conseqüentemente os géis são mais transparentes. Ao contrário, quando o sistema protéico é aquecido em condições de elevada interação eletrostática (no pI ou alta força iônica), os agregados são formados desordenadamente por interações físicas do tipo hidrofóbicas e de van der Waals, resultando na formação de géis particulados de aparência turva.

Um outro processo, que ocorre em duas etapas é a gelificação a frio (Figura 2.1). Neste, as proteínas são primeiramente convertidas em pequenos agregados solúveis através de aquecimento brando de soluções com baixa concentração deste biopolímero. Com o resfriamento da solução, os agregados formados permanecem solúveis e não ocorre a formação de gel devido à predominante repulsão eletrostática entre estes agregados. A gelificação pode ser posteriormente induzida por mudanças na qualidade do solvente, como mudanças de pH ou adição de sais como cloreto de cálcio [VEERMAN et al., 2003] ou cloreto de sódio [PUYOL et al., 2001]. Ocorre então o processo de interação entre os agregados formados no pré-tratamento térmico, culminando na formação de uma rede protéica. O uso de proteínas do soro como ingrediente gelificante sem a necessidade de aquecimento do produto final tem recebido muita atenção, pois permitiria a adição de componentes termolábeis à matriz protéica do gel, como por exemplo, vitaminas.

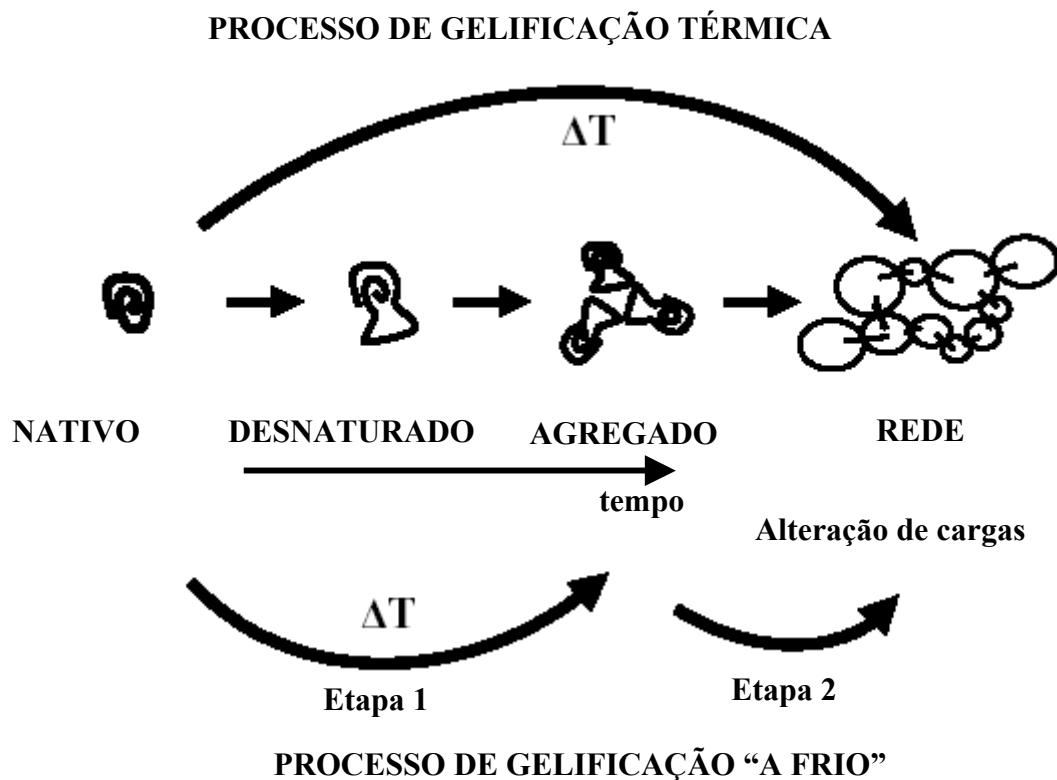


Figura 2.1: Esquema da conversão de proteínas nativas em uma rede protéica de acordo com o processo de indução térmica e/ou de gelificação a frio. Adaptado de [ALTING, 2003c]

Géis dos tipos particulados e turvos foram formados através da adição de sais de cálcio a soluções de WPI [BARBUT & FOEGEDING, 1993, BARBUT, 1995, MCCLEMENTS & KEOGH, 1995], sendo que um aquecimento de no mínimo 70°C foi necessário para que ocorresse a gelificação. Maiores temperaturas ou tempos de aquecimento [HONGSPRABHAS & BARBUT, 1997a] ou um aumento na concentração de proteína da solução inicial [JU & KILARA, 1998c] levaram a um aumento na dureza dos géis, sugerindo que as propriedades dos géis de proteínas do soro formados a frio estão diretamente relacionados às características dos agregados protéicos formados na etapa de aquecimento.

A adição de sais de cálcio em diferentes concentrações alterou a opacidade dos géis e também levou a uma modificação nas propriedades de retenção de água do sistema [HONGSPRABHAS & BARBUT, 1996, 1997b, c]. A adição do agente N-etilamida (um bloqueador de reações de interação entre grupos dissulfídicos) na solução protéica inicial demonstrou que pontes dissulfídicas são responsáveis pela estrutura da rede do gel formado após a etapa de gelificação [HONGSPRABHAS & BARBUT, 1997d].

2.2.2 Gelificação a frio por modificação do pH

O fato de que interações eletrostáticas entre os agregados protéicos formados na etapa de pré-aquecimento sejam responsáveis pela formação dos géis a frio sugere que a alteração de pH também exerce grande influência na etapa 2 de gelificação [JU & KILARA, 1998c]. A Figura 2.2 exemplifica o processo de gelificação a frio em que a alteração de cargas pode ser alcançada pela acidificação do sistema.

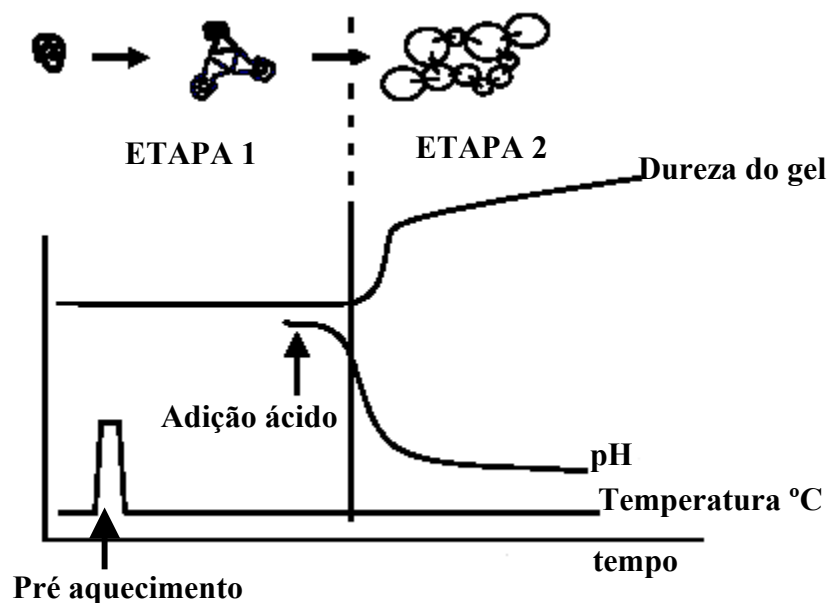


Figura 2.2: Esquema do processo de gelificação a frio induzido por modificação do pH. Adaptado de [ALTING, 2003c]

Conforme visualizado na Figura 2.2, a redução do pH leva à formação dos géis pela interação eletrostática entre os agregados formados no tratamento térmico, com um conseqüente aumento nas propriedades de dureza do gel.

Na indústria de laticínios, a acidificação é resultado da conversão da lactose em ácido láctico pelas bactérias lácticas ou pela adição de reagentes químicos. No caso da acidificação direta, o reagente mais utilizado é a glucona- δ -lactona (GDL) que é um éster cíclico neutro produzido através da fermentação da glicose [JUNGBUNZLAUER, 2006]. O GDL é um cristal branco solúvel em água, com um leve sabor doce, e além de não ser tóxico é completamente metabolizado no organismo humano. Quando adicionado ao leite, o GDL se hidrolisa lentamente a ácido glucônico (Figura 2.3), seguindo uma cinética de primeira ordem [DE KRUIF, 1997]:

$$[GDL]_t = [GDL]_0 \times e^{-k t} \quad (2.1)$$

onde $[GDL]_0$ é a concentração inicial de GDL no momento da sua adição, $[GDL]_t$ é a concentração de GDL no tempo t e k é a velocidade de reação.

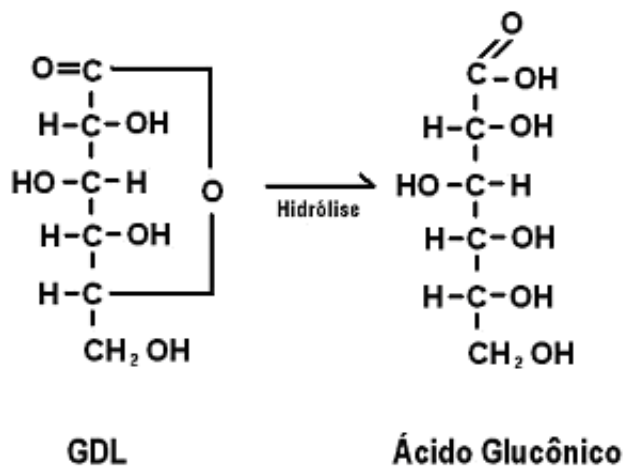


Figura 2.3: Hidrólise do GDL a ácido glucônico [IUPAC, 2006].

O ácido glucônico encontra-se sempre em equilíbrio com o GDL em solução, sendo que a velocidade desta reação depende da temperatura de processo e do pH da solução aquosa, ou seja, o tempo necessário para a hidrólise do GDL será maior quanto menor a temperatura de gelificação [DE KRUIF, 1997]. A concentração residual de GDL atinge 50% em apenas 20min a 20°C, enquanto que a 60°C esta atividade decai a 10% no mesmo período de tempo [JUNGBUNZLAUER, 2006]. O pH final em géis induzidos por GDL é função da quantidade inicial deste composto adicionado ao leite, enquanto que no caso de bactérias o pH continua caindo até que o crescimento bacteriano seja inibido pelos baixos valores de pH (pH < 4,0). Alguns estudos indicam que propriedades físicas e reológicas de

géis lácteos induzidos por GDL diferem dos induzidos por culturas bacterianas, em especial a temperaturas elevadas [LUCEY & SINGH, 1997].

A alteração de pH para promover a gelificação a frio de agregados protéicos de proteínas globulares também pode ser promovida pela adição de GDL (acidificação química) [JU & KILARA, 1998c]. A Tabela 2.4 mostra um resumo com os principais trabalhos apontados na literatura recente sobre o estudo da gelificação a frio de proteínas do soro através da modificação do pH do sistema. Nas Tabelas 2.4 A a 2.4 E são apontados os materiais empregados nos estudos (coluna proteína inicial), e as características de formação de agregados solúveis (coluna ETAPA 1). As condições de acidificação (etapa de gelificação) e os valores de pH final avaliados são também apontados (coluna ETAPA 2), assim como as principais técnicas empregadas e algumas observações sobre a relevância de cada estudo. As ETAPAS 1 e 2 da Tabela 2.4 correspondem às mesmas apontadas nas Figuras 2.1 e 2.2.

Conforme visualizado nas Tabelas 2.4 A a E, as condições de estudo (características de formação dos géis) divergem muito. De maneira geral, os trabalhos se concentram na utilização de GDL como promotor de acidificação, uma vez que a acidificação direta nos valores de pH final (com ácidos inorgânicos como HCL) não é eficiente na formação da rede protéica [BRYANT & MCCLEMENTS, 1998].

Em sua maioria os trabalhos de estudo da gelificação a frio com a utilização de GDL se concentram na avaliação do efeito do pH final do sistema nas propriedades estruturais dos géis formados, bem como nas características de interação moleculares entre os agregados protéicos. Observa-se que, de maneira geral, os trabalhos demonstram que as

pontes dissulfídicas entre os agregados protéicos são formadas não apenas na etapa de aquecimento, mas também na fase de acidificação [ALTING et al., 2000], sendo em grande parte responsáveis pelas características de resistência mecânica da rede protéica formada [ALTING et al., 2003a]. Em trabalho anterior [CAVALLIERI, 2003] a análise destes sistemas, com diferentes pHs no equilíbrio, foi realizada pela técnica reológica conhecida como “compressão biaxial imperfeita com lubrificação” (CBIL). A CBIL se mostrou eficiente na determinação dos parâmetros reológicos extensionais de géis de IPS formados pela adição de GDL em diferentes concentrações. Géis mais consistentes e firmes foram obtidos em valores de pH em torno de 5,2, correspondente ao ponto isoelétrico da maior fração protéica do soro (β -Lactoglobulina), enquanto que a maior redução de pH a valores em torno de 3,0 promoveu a diminuição da consistência do sistema formado. Estes fatores foram atribuídos à repulsão eletrostática entre as proteínas do soro a medida que o pH foi reduzido.

No entanto, poucos trabalhos consideram uma avaliação dos efeitos cinéticos associados ao processo de hidrólise do GDL durante o decaimento do pH. Apesar disso, o estudo cinético associado ao decaimento de pH é muito importante, uma vez que as condições de acidificação variam muito entre os trabalhos publicados na literatura recente, dificultando a comparação entre os diferentes sistemas, e a extrapolação dos resultados a sistemas ainda mais complexos, como no caso dos alimentos que utilizam processos semelhantes à gelificação a frio (iogurtes). A dificuldade na avaliação dos efeitos cinéticos da hidrólise de GDL resulta do fato de que o decaimento do pH é uma função do tempo e não pode ser controlado separadamente a uma mesma temperatura. ALTING et al. [2004a]

propõem uma técnica de acidificação diferenciada onde o pH final e o tempo de decaimento de pH podem ser controlados separadamente pelo controle da quantidade de bactérias lácticas inoculadas ao sistema, ao mesmo tempo em que se controla a disponibilidade de glicose necessária aos processos fermentativos. Baseado nos resultados publicados pelos autores, as propriedades mecânicas do gel formado podem ser diretamente controladas pelo processo de acidificação, sendo que este processo foi recentemente patenteado [ALTING et al., 2004b].

Tabela 2.4 A: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL

Referência	Proteína inicial (%p/p)	Sistema			ETAPA 2 Acidificação		Técnicas de estudo empregadas	Observações
		ETAPA 1 agregação T°C/tempo	Proteína no gel (%p/p)	Tratamentos	GDL no sistema (%p/p)	pH final (tempo para obtenção e temperatura de armazenamento)		
[JU & KILARA, 1998a]	WPI de 1 a 9%	80°C/30 minutos	3%	CaCl ₂ GDL e enzimas. Estudo do efeito do tipo de agregação na fase de gelificação	20 mM CaCl ₂ 0,6% GDL e enzimas	5,0-(37°C/1 hora)	1 -Dureza do gel 2- HPLC e Dynamic light scattering	1- Avaliação das propriedades mecânicas em função do tipo de indução na fase de gelificação 2 – Estabelece relação entre propriedades mecânicas e tamanho de agregados protéicos
[JU & KILARA, 1998c]	WPI 18% no pH 5,7	45°C/60 minutos	1 a 18%	GDL	2 a 6%	5,2 a 4,6 (45°C/1 hora)	1 -Dureza do gel 2- Cor do gel 3- Microscopia TEM	2- Relação entre característica da rede e tipo de agregação 1 e 3 – Relação entre propriedades mecânicas e microestrutura
[JU & KILARA, 1998b]	WPI 9%	80°C/30 minutos	9%	CaCl ₂ , GDL e enzimas. Estudo do efeito do tipo de agregação na fase de gelificação	20 mM CaCl ₂ 0,2 a 2% de GDL e enzimas	5,7 a 3,5 (45°C/4 horas)	1 -Dureza do gel 2- HPLC e Dynamic light scattering	1- Avaliação das propriedades mecânicas em função do tipo de indução na fase de gelificação 2 – Estabelece relação entre propriedades mecânicas e tamanho de agregados protéicos Conclui que géis de GDL são mais resistentes a compressão

Tabela 2.4 B: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL

Referência	Proteína inicial (%p/p)	Sistema			ETAPA 2 Acidificação		Técnicas de estudo empregadas	Observações
		ETAPA 1 agregação T°C/tempo	Proteína no gel (%p/p)	Tratamentos	GDL no sistema (%p/p)	pH final (tempo para obtenção e temperatura de armazenamento)		
[ALTING et al., 2000]	WPI 9%	68,5°C/2 horas	Agregados térmicos WPI 2%	Blocagem N-etilamida e outros agentes bloqueadores de ligação entre grupos SH livres. Estudo das interações dissulfídicas entre agregados por grupo SH livres	0,15 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3	5,0 (24 horas a temperatura ambiente) pH < 4,0 (24 horas a temperatura ambiente)	1- Quantificação de grupo SH 2- SDS Agarose PAGE 3- Dynamic light scattering 4- Turbidez 5- Permeabilidade gel 6- Dureza do gel 7- Microscopia confocal	1- Determina grau de blocagem 2 a 4- Efeito das interações no tamanho de agregados 5 a 7 Avaliação do efeito da blocagem dos agregados nas propriedades mecânicas do gel
[ALTING et al., 2002]	β- Lg e WPI 9% no pH 7,2	68,5°C/4 horas	1,5%	Succinilização = modificação do pH em que se obtém o ponto isoelétrico Modificação da distribuição das cargas superficiais para modificar pI e induzir gel em menores valores de pH (estudo do efeito da interação eletrostática)	0,075 a 6	5,0 a até menores que 3,0 (24 horas de armazenamento na temperatura ambiente)	1- Cromogenic OPA 2- Fluorescence quenching 3- Quantificação de grupo SH 4- SDS Agarose PAGE 5- Dynamic light scattering 6- Turbidez	1 e 2- Determina grau de succinilização 6- Determinação de cinética de gelificação por ensaios de turbidez: verificação do efeito da modificação química 4 a 6- Efeito das interações no tamanho de agregados

Tabela 2.4 C: Compêndio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição da GDL

Referência	Proteína inicial (%p/p)	Sistema			ETAPA 2 Gelificação		Técnicas de estudo empregadas	Observações
		ETAPA 1 agregação T°C/tempo	Proteína no gel (%p/p)	Tratamentos	GDL no sistema (%p/p)	pH final (tempo para obtenção e temperatura de armazenamento)		
[ALTING et al., 2003b]	2 tipos de WPI 9% (iguais em tamanho da molécula protéica e diferentes em SH livre)	68,5°/2 horas	0,5 a 9	Blocagem N-etilamida	0,06 a 0,63 em função da concentração de proteína	5,0 (24 horas a temperatura ambiente)	1- Turbidez 2- Permeabilidade do gel 3- Confocal 4- Reologia dinâmica, módulo elástico em função do tempo e frequência	Correlação das propriedades reológicas, microestrutura e propriedades mecânicas (porosidade) com dimensões fractais determinadas por reologia
[ALTING et al., 2003a]	WPI de 3 a 9%	68,5°C 2, 4, 7, 21 e 24 horas	2	Blocagem N-etilamida	0,14%	5,0 (24 horas a temperatura ambiente)	1- Quantificação de grupos SH 2- Dynamic light scattering 3- Voluminosidade e viscosidade intrínseca 4- Crio SEM 5- Confocal 6- Dureza do gel	Estudou o efeito da concentração inicial de proteína e do tempo de tratamento térmico na formação dos agregados térmicos 2 e 3 -Estudo dos agregados Correlação com propriedades dos géis (6) Conclusão: Estrutura e tamanho dos agregados não determinam as propriedades do gel, mas sim o número de grupos SH livres na molécula

Tabela 2.4 D: Compendio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição de GDL

Referência	Proteína inicial (%p/p)	Sistema			ETAPA 2 Acidificação		Técnicas de estudo empregadas	Observações
		ETAPA 1 agregação T°C/tempo	Proteína no gel (%p/p)	Tratamentos	GDL no sistema (%p/p)	pH final (tempo para obtenção e temperatura de armazenamento)		
[ALTING et al., 2004c]	WPI 2 e 9% e ovoalbumina 2 e 5% Comparação de propriedades dos géis de diferentes fontes proteicas	WPI 68,5/2 horas e ovoalbumina 78°C/22 horas	2%	Blocagem N-etilamida Proteínas com mesmo número de SH livre mas com formas moleculares de agregados diferentes	WPI 0,15% e ovoalbumina 0,16	5,0 em 24 horas a temperatura ambiente	1- SDS Agarose PAGE 2- Voluminidade e viscosidade intrínseca 3- Turbidez 4- Small angle X ray scattering 5- Microscopia confocal e TEM 4- Reologia dinâmica. 7- Propriedades mecânicas-compressão	-Demonstra a importância das ligações dissulfídicas nas propriedades mecânicas do gel - Demonstra que as ligações se formam na etapa de acidificação e de maneira diferente entre as proteínas estudadas - Ovoalbumina forma agregados mais alongados, o que contribui mais significativamente para propriedades mecânicas.
[ALTING et al., 2004a]	WPI 9% e ovoalbumina 6% Comparação de propriedades dos géis de diferentes fontes proteicas	WPI 68,5/2 horas e ovoalbumina 78°C/19,5 horas	2%	Tenta controlar taxa de acidificação como uma função das condições de acidificação (quantidade de inóculo e de glicose)	1-Inoculação de bactéria láctica <i>Lactobacillus plantarium</i> WCFS1 (constante ou em diferentes quantidades) 2-Suplementação de glicose no meio	1-pH 5,72 a 3,94 inóculo constante e várias quantidades de glicose no inóculo (fermentação de 24 horas a 30°C) 2-pH 4,80±0,1 em várias quantidades de inóculo e glicose constante no sistema (neste caso diferentes tempos para atingir pH final a 30°C)	1- Quantificação de grupo SH 2- SDS Agarose PAGE 3- Propriedades mecânicas - compressão	-Primeiro estudo que relaciona gelificação a frio induzida por bactérias, se tornando uma patente [ALTING et al., 2004b], por separar efeito do tempo de acidificação do pH final - Propriedades mecânicas como uma função que pode ser controlada pelas condições de acidificação -A dureza do gel depende do tempo que se dá para a formação de pontes dissulfídicas na etapa de acidificação

Tabela 2.4 E: Compendio de estudos recentes e relevantes sobre a gelificação a frio de proteínas do soro através de adição de GDL

Referência	Proteína inicial (%p/p)	Sistema			ETAPA 2 Acidificação		Técnicas de estudo empregadas	Observações
		ETAPA 1 agregação T°C/tempo	Proteína no gel (%p/p)	Tratamentos	GDL no sistema (%p/p)	pH final (tempo para obtenção e temperatura de armazenamento)		
[CAVALLIERI, 2003, CAVALLIERI et al., 2004]	WPI 7% No pH 6,7	80°C/ 30 minutos	7	-	0 a 5,35	6,7 a 3,5	1-Eletroforese em gel de poliacrilamida 2-Propriedades mecânicas (CBIL squeezing flow)	1-Estudo da formação de agregados no pré tratamento térmico 2- Avaliação de propriedades mecânicas em ampla faixa de consistência de géis (não auto sustentáveis no pH neutro e abaixo do pI e auto sustentáveis no pI

2.2.3 Relevância Industrial

O processo de gelificação a frio permite a realização da desnaturação protéica em uma etapa prévia à gelificação. A etapa preliminar de pré-aquecimento pode ser entendida como aquela em que os blocos de agregados protéicos são construídos, para que na etapa seguinte estes blocos constituam ou construam a rede da matriz protéica, ou rede do gel. Conseqüentemente, o processo abre a possibilidade de se determinar as propriedades do sistema previamente à etapa de gelificação. Sendo assim, a solução de agregados protéicos poderia constituir um pó que poderia ser utilizado como um ingrediente gelificante nas formulações alimentícias. O processo também abre a possibilidade de se adicionar compostos sensíveis ao processo de aquecimento como, por exemplo, agentes flavorizantes e texturizantes [BRITTEN & GIROUX, 2001] respeitando as características de qualidade de textura ou mesmo nutricional dos produtos. Pode também ser utilizada para a produção de microcápsulas capazes de reter e transportar retinol [BEAULIEU et al., 2002], ou ainda na fortificação de produtos lácteos [BRITTEN & GIROUX, 2001, NEEDS et al., 2000] aumentando a disponibilidade de íons cálcio [HONGSPRABHAS & BARBUT, 1996] ou ferro [REMONDETTO et al., 2002], em particular em formulações de alimentos infantis.

2.3 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são compostos solúveis em água e de elevado peso molecular, amplamente utilizados como ingredientes na indústria de alimentos atuam como estabilizantes e espessantes, devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade do sistema podendo, inclusive, formar géis [SYRBE et al., 1998]. Os polissacarídeos podem ser utilizados como aditivos em produtos com a proposta de redução parcial ou total de

gordura. Estes ingredientes atuam suprindo a perda de textura ocasionada pela falta de gordura e evitam a separação de fases em emulsões [KATZBAUER, 1998]. A seguir são traçadas algumas considerações sobre os polissacarídeos utilizados neste trabalho.

2.3.1 Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo microbiano, extracelular, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*. A estrutura primária da molécula de xantana é composta de uma cadeia principal com unidades de D-glucose ligadas em β (1→4), contendo cadeias ramificadas com duas unidades de manose e uma de ácido glucurônico (Figura 2.4). O primeiro resíduo de manose é normalmente acetilado no carbono C6 e toda cadeia ramificada possui um grupamento carboxílico no resíduo de ácido glucurônico. O resíduo terminal de manose possui um grau variado de substituição por piruvato [SWORN, 2000]. A xantana, em solução, passa por uma transição conformacional irreversível de um estado ordenado e rígido para um estado mais desordenado e flexível (desnaturado), com o aumento da temperatura. A temperatura de transição é função de alguns fatores como a concentração da goma e a força iônica do meio, mas geralmente ocorre em valores inferiores a 50°C [URLACHER & NOBLE, 1997]. Além disto, [LEE & BRANT, 2002] observaram uma outra transição que foi relacionada à transição de uma solução anisotrópica para uma isotrópica. Este último fenômeno mostrou-se fortemente dependente da temperatura e da concentração de polissacarídeo.

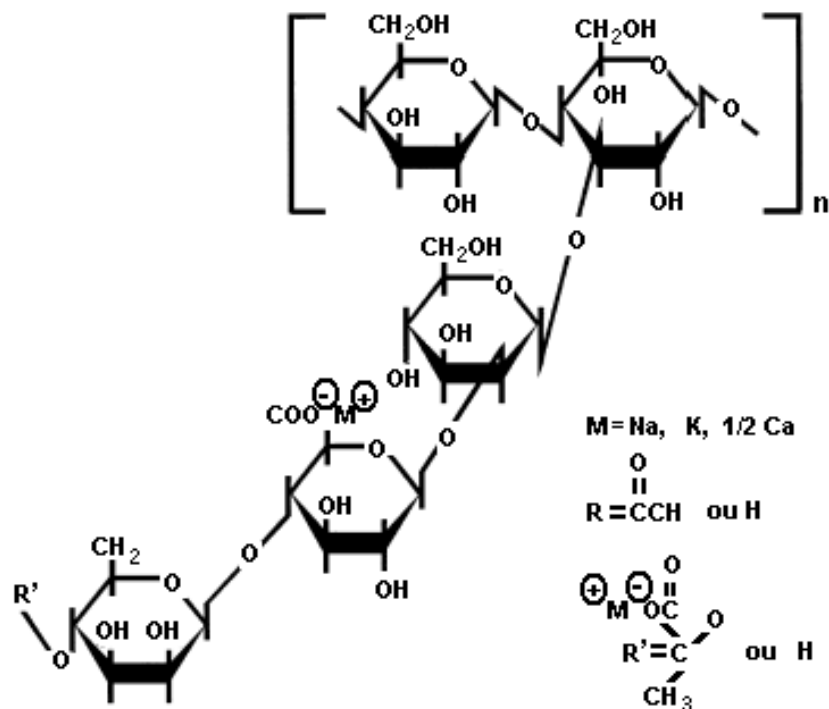


Figura 2.4: Estrutura primária da xantana [SWORN, 2000].

2.3.2 Goma Guar

As galactomananas são polissacarídeos neutros extraídos das sementes de algumas leguminosas. Especificamente a goma guar é extraída da planta *Cyamopsis tetragonoloba* L., que cresce em regiões semi-áridas [WIELINGA, 2000]. As galactomananas consistem em cadeias lineares de manose (M) ligadas por ligações 1→4-β-D glicosídicas em que o átomo de hidrogênio de muitos grupos hidroxila primários são substituídos no carbono C6 por moléculas de α-D-galactose (G) unidas por ligações 1→6 [WIELINGA, 2000], conferindo um elevado grau de ramificações na estrutura molecular. O grau de ramificações da estrutura das galactomananas é relacionado à proporção entre manose e galactose na estrutura (M/G) que é dependente da origem da galactomanana [TAVARES & SILVA, 2003, TAVARES et al., 2005]. A goma guar é a galactomanana mais comum com uma

relação M/G de 2:1, também sendo encontradas a goma tara com M/G de 3:1 e a goma jataí com M/G de 4:1 [WIELINGA, 2000]. A estrutura das galactomananas, entre elas a goma guar, pode ser visualizada na Figura 2.5, sendo que sua cadeia principal é muito similar a da celulose.

As galactomananas são conhecidas por exibir comportamento de soluções macromoleculares, cujas propriedades são governadas por enlaces moleculares topológicos [BOURRIOT et al., 1999]. A grande vantagem do uso das galactomananas é a sua habilidade de, em relativamente baixas concentrações, promover a formação de soluções muito viscosas que são ligeiramente ou pouco afetadas pelo pH, presença de íons e processamento térmico.

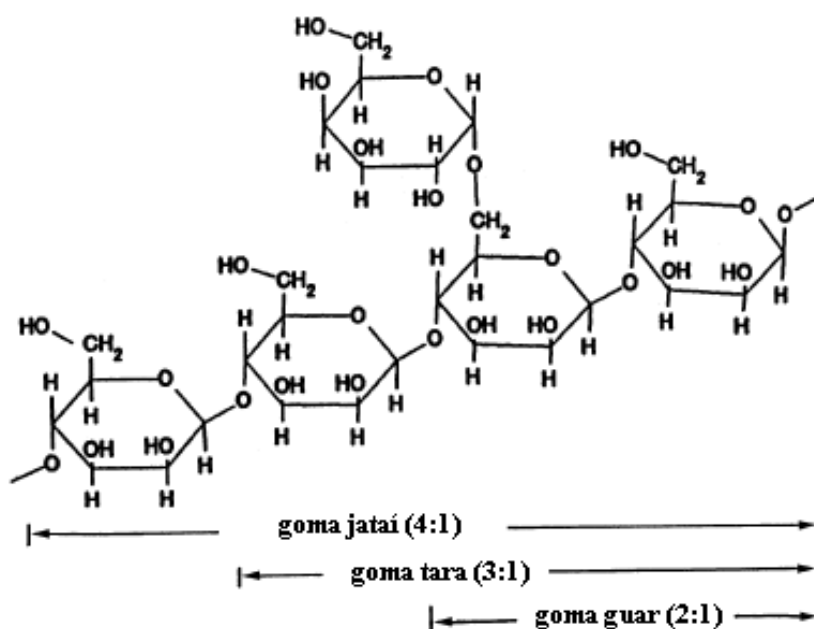


Figura 2.5: Fragmento da estrutura de algumas galactomananas incluindo a goma guar [WIELINGA, 2000].

2.4 Interações entre proteínas e polissacarídeos

As interações que ocorrem entre proteínas e polissacarídeos são interessantes para melhorar algumas características funcionais das proteínas, sendo que estes sistemas são comumente encontrados em alimentos. Sistemas com mais de um biopolímero exibem comportamentos mais complexos do que misturas de polímeros sintéticos. Isto se deve ao fato de que os biopolímeros possuem um equilíbrio relacionado ao estado de ordem - desordem de conformação, além de apresentar transições e separações de fases em determinadas situações [CÈSARO et al., 1999]. Interações entre polímeros resultam em incompatibilidade e formações complexas, sendo exceção a miscibilidade entre os componentes. O comportamento de uma solução com dois biopolímeros é controlado pelo balanço entre os efeitos entálpicos e a entropia do sistema [SYRBE et al., 1998].

Na presença de polissacarídeos, a temperatura de desnaturação de algumas proteínas é alterada ou a capacidade de formação dos géis é modificada. Em solução, as proteínas podem atrair e repelir os polissacarídeos dependendo da sua origem, do pH, da força iônica, da temperatura, da concentração ou do cisalhamento a que são submetidas [DELBEN & STEFANCICH, 1997]. Em um sistema ternário pode-se distinguir três possíveis situações de equilíbrio (Figura 2.6):

1. Incompatibilidade: ocorre a segregação dos biopolímeros. São formadas duas fases aquosas, imiscíveis, e cada uma em uma espécie de biopolímero.

2. Coacervação: uma forte atração entre moléculas de dois tipos de biopolímeros geram formações complexas. São formadas duas fases aquosas distintas, sendo que uma das fases contém os dois polímeros e a outra fica pobre em polímeros.

3. Miscibilidade: ocorre quando a interação entre dois biopolímeros diferentes é similar à interação entre hidrocolóides de uma mesma espécie, ou seja, há uma miscibilidade instantânea [SYRBE et al., 1998].

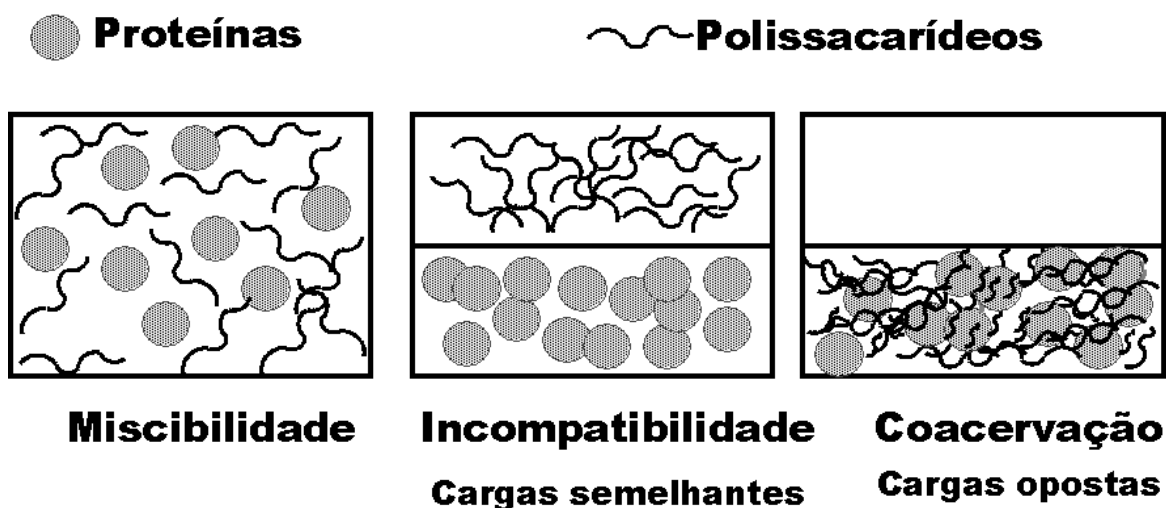


Figura 2.6: Esquema de misturas de biopolímeros e tipos de interação possíveis.

2.5 Géis mistos

Muitos produtos alimentícios podem ser considerados sistemas multicomponentes, em que um ou mais biopolímeros gelificantes são incorporados para obter características especiais de textura e propriedades sensoriais. Estas modificações podem ser utilizadas de forma a se produzir alimentos que simulem propriedades como as de textura encontradas em alimentos em seu estado natural. Este é o caso da utilização de polissacarídeos em sistemas alimentícios para substituir um componente retirado do alimento em uma determinada etapa do processo ou quando se busca atender a dietas especiais [AGUILERA & RADEMACHER, 2000]. Um exemplo, são as formulações “light”, onde a gordura é parcialmente retirada com o objetivo da redução dos níveis calóricos do alimento.

Geralmente, os sistemas gelificantes multicomponentes podem ser classificados em 3 tipos [MORRIS, 1998]: redes interpenetrantes, redes conjugadas ou redes com separação de fases (Figura 2.7).

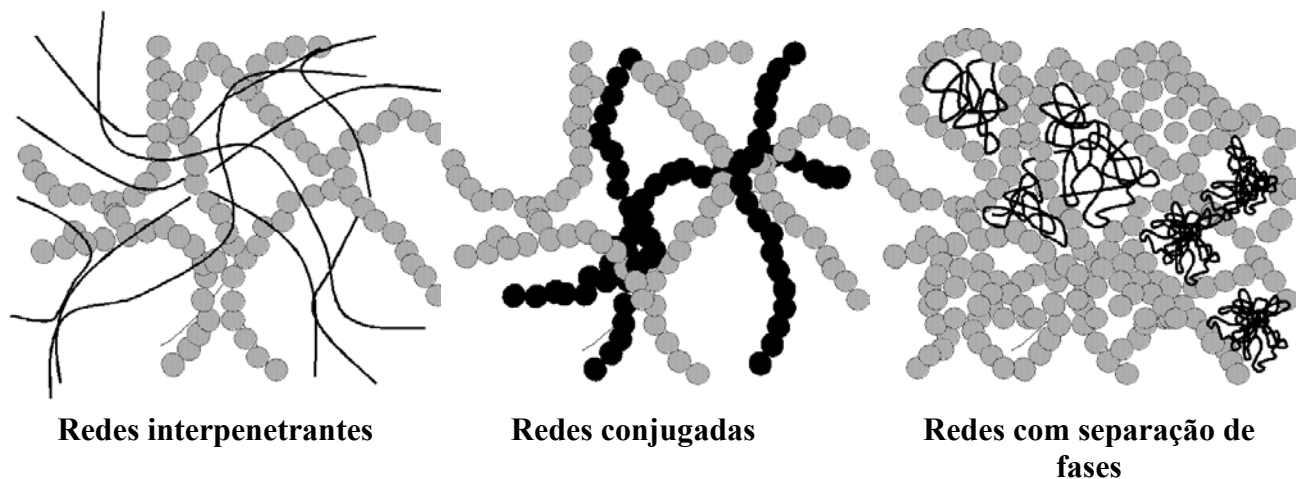


Figura 2.7: Representação esquemática de sistemas gelificados com 2 componentes.

Os tipos de sistema mais comumente encontrados em alimentos são as redes com separação de fases [MORRIS & WILDE, 1997]. A microestrutura de um sistema multicomponente com separação de fases é o resultado da competição entre o processo de “demixing” e formação da rede do gel pela agregação ou gelificação de um ou mais ingredientes. Conforme relatado anteriormente, a separação de fases é causada pela tendência de dois biopolímeros se excluírem mutuamente após a mistura, o que pode ser influenciado pela gelificação de um ou mais ingredientes [EDELMAN et al., 2001]. No caso de biopolímeros gelificantes, o processo de gelificação interrompe o “demixing” antes de se alcançar o equilíbrio macroscópico das duas fases separadas (Figura 2.8). A microestrutura resultante deste processo é a base das propriedades de textura de muitos sistemas alimentícios. Géis com micro separação de fases incluem proteínas e

polissacarídeos como a principal classe de agentes gelificantes, sendo o agente gelificante principal um ou outro biopolímero.

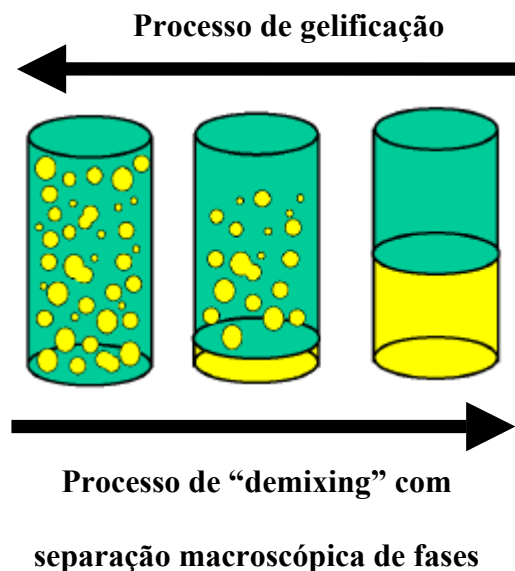


Figura 2.8: Representação esquemática de sistemas multicomponentes que apresentam os fenômenos simultâneos de separação de fases e gelificação.

A propriedade de gelificação térmica de proteínas é o método mais estudado para a obtenção de sistemas gelificados de estrutura heterogênea. Muitos exemplos de géis mistos de polissacarídeos/proteínas do soro, formados termicamente, são encontrados na literatura. Estes exemplos citam tanto a utilização de proteínas do soro comerciais [TAVARES et al., 2005], como frações individuais tais como a β -Lg ou a BSA [OLSSON et al., 2000]. No primeiro caso estudou-se a gelificação térmica de isolado protéico de soro na presença de goma guar, enquanto que no segundo, a gelificação térmica de β -Lg com adição de amilopectina. Em contraste ao processo de gelificação térmica de proteínas do soro, a gelificação induzida a frio é um processo relativamente novo e ainda foi pouco estudado com a adição de polissacarídeos.

O processo de gelificação a frio de proteínas do soro com a adição de xantana, foi induzido pela adição de NaCl [BRYANT & MCCLEMENTS, 2000], e este sistema exhibe elevada incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros no pH 7,0. Como consequência o sistema apresenta separação macroscópica de fases mesmo em baixas concentrações do polissacarídeo [BRYANT & MCCLEMENTS, 2000, CAVALLIERI, 2003]. Na presença do sal, a xantana causou um aumento na taxa de gelificação das proteínas do soro, na elasticidade e na densidade óptica do sistema [BRYANT & MCCLEMENTS, 2000]. Os autores sugerem que a adição de sal levou à formação de uma emulsão do tipo água-água consistindo de uma estrutura com regiões ricas em polissacarídeo aprisionadas por uma fase protéica contínua gelificada.

Géis ácidos de proteínas do leite com a adição do polissacarídeo neutro jataí (LBG) e ou do polissacarídeo aniônico xantana foram formados pela acidificação do sistema com o éster GDL em uma concentração fixa, levando a géis com valores de pH final em torno do pI da caseína (pH 4,6.) [SANCHEZ et al., 2000]. A adição de polissacarídeos foi realizada em níveis de concentração entre 0,001 a 0,1% (p/p) em um sistema contendo 14% (p/p) de proteínas. Os sistemas foram avaliados por ensaios de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão eletrônica. Verificou-se que a adição de ambos os polissacarídeos levou a uma compactação da rede protéica e aumento da porosidade da rede formada. Quando adicionados em combinação (sistemas ternários xantana+LBG+proteína) os efeitos na estrutura foram menos intensos, com menor porosidade do que a microestrutura dos sistemas binários.

Recentemente foi publicado um trabalho que relata o efeito de vários polissacarídeos de diferentes cargas superficiais (neutros e aniônicos) na gelificação a frio

de proteínas do soro [DE JONG & VAN DE VELDE, 2007]. Os sistemas foram acidificados com uma quantidade de GDL necessária para atingir o pH final fixo em 4,8 após 20 horas de armazenamento na temperatura ambiente. Os géis apresentaram microseparação de fases, conforme visualização por microscopia confocal. Os autores demonstraram que nas condições de gelificação empregadas, a carga dos polissacarídeos foi o fator dominante na micro-separação, e o segundo fator foi a polidispersão e rigidez da cadeia molecular dos polissacarídeos. DE JONG & VAN DE VELDE, [2007] também demonstraram que a microseparação de fases e a consequente microestrutura obtida influenciaram significativamente nas propriedades mecânicas de sistemas mistos.

È notório que a literatura no tema é bastante escassa e até o presente momento não foram encontrados trabalhos que relatem o efeito de diferentes taxas de acidificação nas propriedades de géis mistos de proteínas do soro e polissacarídeos formados a frio. No entanto deve-se ressaltar que o processo de microseparação de fases associado à gelificação de sistemas mistos de proteínas e polissacarídeos consiste em um processo dinâmico e portanto, a velocidade de acidificação empregada exercerá grande influência nas propriedades estruturais do sistema.

2.6 Propriedades macro e microscópicas de géis protéicos

Os géis de proteínas globulares correspondem a um aglomerado de pequenas partículas (agregados protéicos) que se caracterizam por estruturas de elevada complexidade, e desta maneira podem ser considerados géis coloidais [WU & MORBIDELLI, 2001].

Muitos trabalhos na área de propriedades físicas de géis protéicos se concentram na determinação das relações entre as propriedades físico-químicas das moléculas protéicas e

as propriedades macroscópicas dos produtos alimentícios que contém as proteínas como principal constituinte [MORR & HA, 1993]. As propriedades físico químicas incluídas neste contexto se referem à natureza química dos aminoácidos constituintes das proteínas (estruturas primárias), as suas estruturas moleculares secundária e terciária, e a estabilidade e flexibilidade destas moléculas frente às modificações do meio (pH, força iônica, etc.). No entanto, as propriedades macroscópicas do gel são influenciadas por um conjunto mais amplo de fatores que não podem ser unicamente relacionados às características individuais das moléculas protéicas. As propriedades reológicas de um gel particulado são, por exemplo, influenciadas pela concentração inicial de proteína, o tamanho e a morfologia dos agregados protéicos que constituem as partículas fundamentais na rede do gel protéico [JU & KILARA, 1998a]. A importância deste conjunto de fatores (Figura 2.9) não pode ser negligenciada na caracterização das propriedades macroscópicas do sistema.

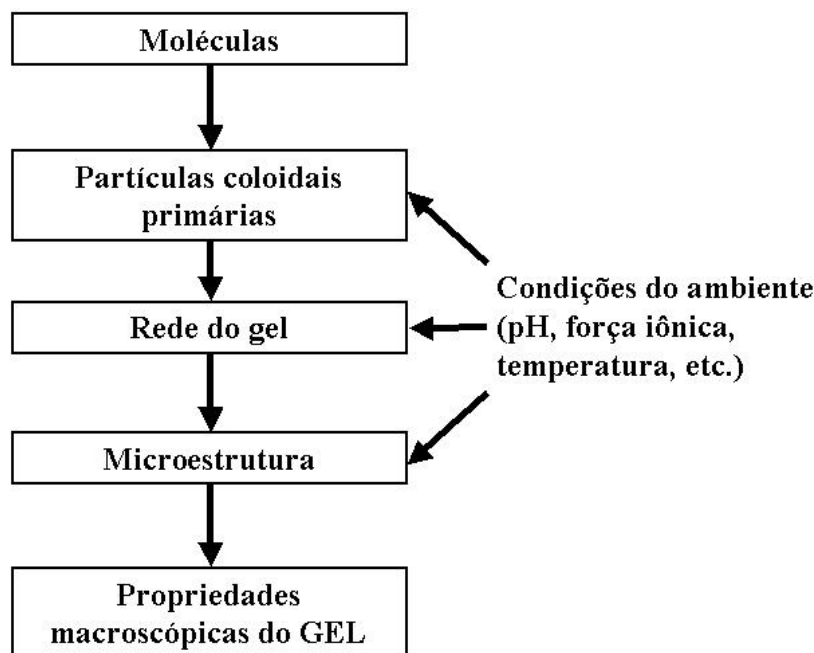


Figura 2.9: Representação esquemática do conjunto de fatores associados às propriedades macroscópicas de agregados de partículas coloidais.

As propriedades físico químicas das moléculas individuais, assim como as características do meio (pH, temperatura, força iônica, polaridade e tipo de solvente), vão influenciar no tipo de partícula coloidal primária formada (morfologia, tamanho, propriedades de superfície), e as interações entre estes fatores irão influenciar nas propriedades da rede molecular formada. Esta rede será responsável pelas propriedades reológicas, de retenção de água e de difração de luz do gel obtido. A predição e a manipulação racional das propriedades dos géis protéicos requer um entendimento da influência da microestrutura nas propriedades macroscópicas do sistema. Vários grupos de pesquisa iniciaram um estudo da importância da caracterização de diferentes níveis de estrutura de um gel e estabeleceram relações destas características estruturais com as propriedades macroscópicas [BREMER et al., 1990, FOEGEDING et al., 1995, HAGIWARA et al., 1997a, IKEDA et al., 1999, STADING et al., 1993, VERHEUL et al., 1998, VERHEUL & ROEFS, 1998, VREEKER et al., 1992].

A análise fractal é um método analítico quantitativo para caracterizar formas e estruturas irregulares [MANDELROT, 1983], tipicamente encontradas na microestrutura de géis coloidais. Fractais são caracterizados pelas seguintes propriedades: eles representam padrões de auto-similaridade (self-similarity), não são descritos por fórmulas matemáticas, mas sim por dependências periódicas e as dimensões fractais não podem ser representadas por números inteiros [KAYE, 1989]. Um objeto que pode precisamente ser chamado de auto-similar é aquele que quando dividido em pequenas partes, estas serão réplicas reduzidas do conjunto original. Desde o desenvolvimento da teoria de fractais, muito progresso tem sido feito na caracterização de microestrutura de géis coloidais, sendo estes considerados como aglomerados de partículas que apresentam um elevado grau de auto-

similaridade em uma determinada escala de observação, maior do que o tamanho da partícula fundamental, conforme pode ser visualizado na Figura 2.10.

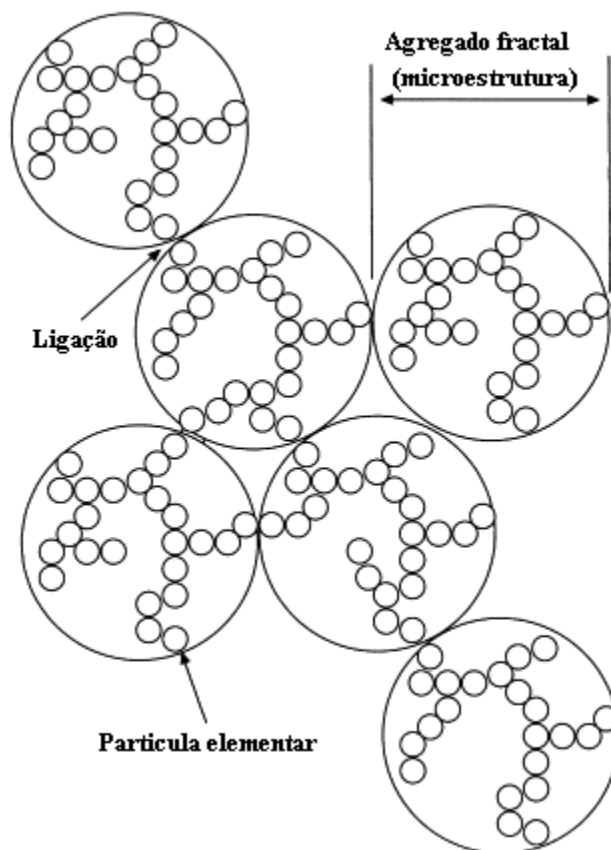


Figura 2.10: Representação esquemática da rede de um gel coloidal mostrando diferentes níveis de estrutura em função da escala. O agregado primário se aglomera em conjuntos maiores formando a rede do gel. O empacotamento destas partículas fundamentais leva à formação de uma estrutura de natureza fractal (auto-similar em função da escala de observação do sistema).

O conceito de fractal foi inicialmente aplicado ao estudo da agregação coloidal em sistemas diluídos empregando-se técnicas de difração de luz (light scattering) e microscopia de transmissão eletrônica, mostrando a estrutura do sistema como um aglomerado de fractais [WEITZ & OLIVEIRA, 1984, WEITZ et al., 1985]. Com o conceito de fractal, foi possível realizar simulações computacionais que permitiram a predição numérica da estrutura, forma e distribuição de tamanho dos agregados em sistemas diluídos [BROWN & BALL, 1985, FAMILY et al., 1985, MEAKIN, 1984, MEAKIN et al., 1985]. Estas simulações foram confirmadas para uma série de sistemas coloidais [LIN et al., 1990a, b, SHAEFER et al., 1984, WEITZ et al., 1985, WEITZ & LIN, 1986].

Os experimentos de espalhamento de luz foram os mais utilizados, no princípio, para o estudo da estrutura dos agregados protéicos. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações de uso, considerando que se aplica apenas para sistemas em baixas concentrações protéicas, não permitindo o estudo do sistema nas condições de concentração comumente encontrados nas formulações alimentícias. Para contornar estas limitações, a dimensão fractal do sistema foi determinada com outras técnicas, através da determinação da microestrutura do sistema [HAGIWARA et al., 1997b, HAGIWARA et al., 1998], ou utilizando correlações de dependência entre a estrutura fractal e propriedades estruturais [SHIH et al., 1990, WU & MORBIDELLI, 2001]. Para este fim, foram utilizadas correlações das características de permeabilidade da rede [BREMER et al., 1989, BREMER et al., 1990] ou das propriedades reológicas do sistema [HAGIWARA et al., 1997b, HAGIWARA et al., 1998].

Ensaio reológico para a determinação da dimensão fractal são uma alternativa aos métodos de difração de luz e apresentam como vantagem o fato de serem conduzidos com

relativa facilidade, permitindo a análise dos sistemas em regimes de concentração mais elevados [IKEDA et al., 1999]. Para esta tarefa, um modelo de escala, ou modelos reológicos fractais são necessários [SHIH et al., 1990, WU & MORBIDELLI, 2001]. SHIH et al. [1990] desenvolveu uma teoria de escala sobre as propriedades elásticas do gel considerando a estrutura como uma rede de agregados fractais. Foi demonstrado que a elasticidade do gel (G) e o limite de linearidade (deformação no limite de linearidade, γ_0) exibem uma relação do tipo lei da potência com a concentração de partículas fractais no sistema (ϕ), onde o expoente da relação está diretamente relacionado à dimensão fractal (D_f) do sistema. Este modelo permite a consideração do regime de gelificação, admitindo duas hipóteses: 1- ligação fraca, em que as ligações internas dos agregados fractais (ou entre as moléculas do agregado) são as mais fortes, ou 2 – ligações fortes, em que as ligações entre os agregados fractais (ou entre os agregados) são as mais fortes na rede do gel. Recentemente, WU & MORBIDELLI [2001] revisaram o modelo de SHIH et al. [1990] permitindo a determinação da dimensão fractal em regimes mais amplos de gelificação definidos como regimes de ligação fraca, forte e intermediário [WU & MORBIDELLI, 2001].

Durante as últimas décadas vários trabalhos utilizaram as teorias de escala de [SHIH et al., 1990] para a caracterização de uma série de sistemas protéicos. Estudos da natureza fractal de géis térmicos de BSA e β -Lg foram realizados [HAGIWARA et al., 1997b] utilizando técnicas reológicas que foram confrontadas com análises de microestrutura, sendo que os valores de dimensão fractal foram semelhantes para os dois sistemas. Os géis mostraram regime de ligação fraca, com dimensão fractal em torno de 2,7 na presença de

sal de cálcio, enquanto que estes valores corresponderam a 2,0 com regime de ligação forte na ausência do sal. As análises de dimensão fractal a partir da microscopia destes sistemas apresentou valores semelhantes aos obtidos através de técnicas reológicas. Posteriormente estes autores avaliaram a gelificação térmica de soluções de BSA em valores de pHs de 5,1 sem a adição de CaCl_2 e no pH 7,0 com diferentes concentrações de CaCl_2 [HAGIWARA et al., 1998]. A dependência das propriedades elásticas do sistema com a concentração de proteína no gel foi avaliada utilizando a teoria de escala proposta por SHIH et al. [1990]. Os géis mostraram regime de ligação fraca e o limite de linearidade de deformação aumentou com o aumento de concentração de proteína.

A dimensão fractal de géis de isolado protéico de soro formados a frio também foi avaliada em função de diferentes quantidades de CaCl_2 adicionado ao sistema [HONGSPRABHAS et al., 1999]. O módulo de Young aumentou com a concentração protéica para todas as concentrações de sal estudadas (5 a 150 mmol/L). A dimensão fractal foi avaliada utilizando a teoria de SHIH et al. [1990] e esta aumentou com o incremento da concentração de sal no meio. O aumento da dimensão fractal com a concentração de sal foi atribuído à formação de uma rede protéica mais desordenada e com ligações cruzadas mais intensas entre os agregados protéicos.

O efeito da adição de sacarose (0 a 70%) a géis ácidos de caseinato de sódio acidificados com GDL a 25°C foi avaliado por microscopia confocal [PUGNALONI et al., 2005]. A porosidade da rede e a dimensão fractal foram determinadas por análise de imagem de micrografias. A adição de sacarose levou a géis mais fortes, com estrutura mais particulada, porém com menor porosidade de rede protéica. Ao contrário da porosidade, a dimensão fractal do sistema não se mostrou significativamente alterada pelo aumento da

concentração de sacarose e, portanto a dimensão fractal não foi considerado um bom parâmetro para a avaliação do efeito da sacarose na rede do gel.

A gelificação a frio de soluções de isolado protéico de soro foi avaliada utilizando-se teoria de escala das propriedades reológicas e de permeabilidade em paralelo ao estudo da microscopia do sistema [ALTING et al., 2003b]. Soluções de isolado protéico em diferentes concentrações foram previamente desnaturadas a 68,5°C por duas horas e posteriormente acidificadas com GDL. Os sistemas foram gelificados a partir de dois tipos de agregados protéicos, iguais em tamanhos, mas com diferentes quantidades de grupos sulfidril (SH) livres nas superfícies dos agregados. Neste trabalho, a dimensão fractal obtida pela teoria de escala não apresentou valores fisicamente consistentes. Os autores especulam que este resultado foi associado a um possível evento de competição entre a gelificação e separação de fases binária do sistema nas condições estudadas, ou que a gelificação ocorreria por outros mecanismos que não pudessem ser considerados como uma agregação fractal. Este fato provavelmente levou a uma configuração estrutural que poderia ter afetado os parâmetros reológicos do sistema como o módulo de elasticidade e o limite de linearidade. No entanto, foi possível determinar a dimensão fractal por análise de imagem de fotografias obtidas em microscopia confocal, o que revelou dimensão fractal dos sistemas em torno de 2,3.

Observa-se que de maneira geral, existe um consenso de que os valores de dimensão fractal determinados através dos modelos reológicos devem ser validados através de outras técnicas de caracterização direta da estrutura fractal. Desta forma, possibilita-se verificar a consistência dos parâmetros obtidos, podendo esta validação ser realizada por técnicas de espalhamento de luz ou de microscopia. Considerando-se que as técnicas de espalhamento

de luz apresentam a limitação de serem aplicadas apenas em sistemas diluídos, as técnicas de microscopia são as mais utilizadas para verificação da estrutura fractal, uma vez que correspondem a um método direto através da visualização da microestrutura do sistema, não dependendo de modelos matemáticos para correlacionar as propriedades fractais com outras propriedades do sistema.

Recentemente a teoria de escala de WU & MORBIDELLI [2001] foi utilizada para a determinação da dimensão fractal de géis térmicos de proteínas de plasma nos pHs 5, 6 e 7 [DÀVILA & PERÉS, 2007]. Os valores de dimensão fractal obtidos variou entre 2,63 e 2,7. A dimensão fractal determinada a partir da análise de imagem de microscopias SEM revelou valores um pouco maiores entre 2,78 e 2,83. O fato de que a diminuição do pH levou a um aumento da dimensão fractal foi associado a um aumento do tamanho de agregados devido a uma redução da repulsão eletrostática entre os mesmos.

O trabalho de DÀVILA & PERÉS [2007] foi pioneiro na utilização da propriedade definida como lacunaridade como um parâmetro complementar na descrição da agregação fractal do sistema. Esta propriedade pode ser obtida através de metodologia de análise de imagem denominada de método “box counting” ou método de contagem de caixas. O parâmetro de lacunaridade complementa a propriedade de dimensão fractal devido a sua característica de descrever a distribuição de espaços vazios entre os fractais do sistema [MANDELROT, 1983] e, portanto pode ser utilizada para descrever a porosidade da rede protéica em função da escala de observação da estrutura durante a aplicação do método de análise de imagem [DÀVILA & PERÉS, 2007]. Foi observado que a heterogeneidade do gel aumentou com a redução do pH. Para géis no pH 5 a lacunaridade média foi em torno

de 0,44 (propriedade adimensional) considerando escala de análise de imagem em torno de 12% da imagem original.

2.7 REFERENCIAS

- AGUILERA, J. M.; RADEMACHER, B. Protein gels. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in food processing**: CRC Press. Boca Raton, USA: 2000. Cap. 20 p. 481-495.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, G. G.; VISSCHERS, R. W. Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 10, p. 5001-5007, 2000.
- ALTING, A. C.; DE JONGH, H. H. J.; VISSCHERS, R. W.; SIMONS, J. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 16, p. 4682-4689, 2002.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; PAQUES, M.; VISSCHERS, R. W. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 469-479, 2003a.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 3150-3156, 2003b.
- ALTING, A. C. **Cold gelation of globular proteins**. 2003. 129 p. (PhD Thesis) – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2003c.
- ALTING, A. C.; VAN DER MEULENA, E. T.; HUGENHOLTZ, J.; VISSCHERS, R. W. Control of texture of cold-set gels through programmed bacterial acidification. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 323-329, 2004a.
- ALTING, A. C.; VITALI, A.; HUGENHOLTZ, J., Wageningen Center of Food Science. **Preparation of a gelled aqueous composition by microbial acidification using a globular protein, usefull in the preparation of a dessert, spread, dressing, sauce or mayonnaise**. ENG. n. EP1411779-A1, 28 Apr 2004.

- ALTING, A. C.; WEIJERS, M.; DE HOOG, E. H. A.; VAN DE PIJPEKAMP, A. M.; STUART, M. A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Acid-induced cold gelation of globular proteins: Effects of protein aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 3, p. 623-631, 2004c.
- BARBUT, S.; FOEGEDING, E. A. Ca^{2+} -induced gelation of pre-heated whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 867-871, 1993.
- BARBUT, S. Effects of calcium level on the structure of pre-heated whey protein isolate gels. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 598-603., 1995.
- BEAULIEU, L.; SAVOIE, L.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 2, p. 239-248, 2002.
- BOURRIOT, S.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 43-49, 1999.
- BREMER, L. G. B.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, T. Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. **Journal of Chemical Society, Faraday Transactions**, Cambridge, v. 185, n. 10, p. 3359–3372, 1989.
- BREMER, L. G. B.; BIJSTERBOSCH, B. H.; SCHRIJVERS, R.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, P. On the fractal nature of the structure of acid casein gels. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 51, p. 171–188, 1990.
- BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, p. 609-617, 2001.
- BROWN, W. D.; BALL, R. C. Computer-Simulation of Chemically Limited Aggregation. **Journal of Physics A: Mathematical and General**, Bristol, v. 18, n. 9, p. L517-L521, 1985.

- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 143-151, 1998.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat- denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 383-390, 2000.
- CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.
- CAVALLIERI, A. L. F. **Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana**. 2003. 109 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- CAVALLIERI, A. L. F.; COSTA-NETTO, P.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. ICEF9- International Congress on Engineering and Food, 2004, Montpellier- France: 2004. p. 110-114.
- CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 388, n. 1-2, p. 143-153, 1999.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Aminoácidos, peptídeos y proteínas. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Química de los alimentos**: 2 ed. Zaragoza: 1996. Cap.5 p. 275-414.
- DALGLEISH, D. G.; SENARATNE, V.; FRANCOIS, S. Interactions between α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 9, p. 3459-3464, 1997.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**: 3 ed. New York, USA: 1996. Cap. 6 p. 321-429.
- DÀVILA, E.; PERÉS, D. Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 147-153, 2007.

- DE JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, "in press" Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/foodhyd>>. Acesso em: 25 jan. 2007.
- DE KRUIF, C. G. Skim milk acidification. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 185, n. 1, p. 19-25, 1997.
- DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.
- DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of Food Proteins with Polysaccharides I:properties upon Mixing. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 325-346, 1997.
- EDELMAN, M. W.; VAN DER LINDEN, E.; DE HOOG, E. H. A.; TROMP, R. H. Compatibility of gelatin and dextran in aqueous solution. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 4, p. 1148-1154, 2001.
- FAMILY, F.; MEAKIN, P.; VICSEK, T. Cluster Size Distribution in Chemically Controlled Cluster Cluster Aggregation. **Journal of Chemical Physics**, Woodbury, v. 83, n. 8, p. 4144-4150, 1985.
- FOEGEDING, E. A.; BOWLAND, E. L.; HARDIN, C. C. Factors that determined the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T.; NAKAMURA, K. Analysis of aggregate structure in food protein gels with the concept of fractal. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 10, p. 1663–1667, 1997a.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T. Fractal analysis of the elasticity of BSA and beta-Lactoglobulin gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3807-3812, 1997b.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; NAKAMURA, K. Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-36, 1998.

- HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Formation of new protein structures in heated mixtures of BSA and alpha-lactalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1548-1556, 2000.
- HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Characterization of heat-induced aggregates of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, Port chester, v. 68, n. 3, p. 483-497, 2001.
- HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of whey proteins: Comparison of cheese WPC with acid WPC and relevance of mineral composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 16, p. 4674-4681, 2002.
- HAYAKAWA, I.; KAJIHARA, J.; MORIKAWA, K.; ODA, M.; FUJIO, Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 2, p. 288-292, 1992.
- HONG, Y. H.; CREAMER, L. K. Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 345-359, 2002.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca²⁺-induced gelation of whey protein isolate: Effects of pre-heating. **Food Research International**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 135-139, 1996.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Effect of gelation temperature on Ca²⁺-induced gelation of whey protein isolate. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 30, n. 1, p. 45-49, 1997a.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Protein and salt effects on Ca²⁺-induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 382-385, 1997b.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca²⁺-induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. **Food Research International**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 523-527, 1997c.

- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Effects of N-ethylmaleimide and CaCl₂ on cold gelation of whey protein isolate. **Food Research International**, Amsterdam, v. 30, n. 6, p. 451-455, 1997d.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S.; MARANGONI, A. G. The structure of cold set whey protein isolate gels prepared with Ca⁺⁺. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 32, n. 4, p. 196-202, 1999.
- IKEDA, S.; FOEGEDING, E. A.; HAGIWARA, T. Rheological study on the fractal nature of the protein gel structure. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 25, p. 8584-8589, 1999.
- IUPAC. **GDL Hydrolysis**. Disponível em: <<http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/2carb/2C2gif/201C.GIF>>. Acesso em: 26 set. 2006.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3604-3608, 1998a.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 288-292, 1998b.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1830-1835, 1998c.
- JUNGBUNZLAUER. **Glucono-delta lactone JUNGBUNZLAUER**. Disponível em: <www.jungbunzlauer.com>. Acesso em: 12 dez. 2006.
- KATZBAUER, B. Properties and applications of Xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, v. 59, n. 1-3, p. 81-84, 1998.
- KAYE, B. H. **A random walk through fractal dimensions**. First Edition ed. Weinheim, Germany: VHC Verlagsgesellschaft, 1989. 421 p.
- KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. **Advanced Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 343-437, 1990.

- LEE, H. C.; BRANT, D. A. Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions: 3. Temperature dependence. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 4, p. 742-753, 2002.
- LIN, M. Y.; LINDSAY, H. M.; WEITZ, D. A.; KLEIN, R.; BALL, R. C.; MEAKIN, P. Universal reaction-limited colloid aggregation. **Physics Review A**, College PK, v. 41, n. 4, 2005-2020, p. 1990a.
- LIN, M. Y.; LINDSAY, H. M.; WEITZ, D. A.; KLEIN, R.; BALL, R. C.; MEAKIN, P. Universal diffusion-limited colloid aggregation. **Journal of Physics-Condensed Matter**, Bristol, v. 2, n. 13, p. 3093-3113, 1990b.
- LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1997.
- MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York: Freeman Press, 1983. 468 p.
- MANGINO, M. E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.
- MCCLEMENTS, D. J.; KEOGH, M. K. Physical-Properties of Cold-Setting Gels Formed from Heat- Denatured Whey-Protein Isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 69, n. 1, p. 7-14, 1995.
- MEAKIN, P. Diffusion-Limited Aggregation in 3 Dimensions - Results from a New Cluster Cluster Aggregation Model. **Journal of Colloid and Interface Science**, San diego, v. 102, n. 2, p. 491-504, 1984.
- MEAKIN, P.; VICSEK, T.; FAMILY, F. Dynamic Cluster-Size Distribution in Cluster-Cluster Aggregation - Effects of Cluster Diffusivity. **Physics Review B**, College pk, v. 31, n. 1, p. 564-569, 1985.
- MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical reviews in food science and nutritional**, Boca raton, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.
- MORRIS, V. J.; WILDE, P. J. Interactions of food biopolymers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 2, n.6, p. 567-572, 1997.

- MORRIS, V. J. Gelation of Polysaccharides. In: HILL, S. E.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. (Ed.). **Functional properties of food macromolecules**: 2 ed. Gaithersburg, Maryland: 1998. Vol. Cap. 4, p. 143-227.
- NEEDS, E. C.; CAPELLAS, M.; BLAND, A. P.; MANOJ, P.; MACDOUGAL, D.; PAUL, G. Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 67, n. 3, p. 329-348, 2000.
- OLSSON, C.; STADING, M.; HERMANSSON, A. M. Rheological influence of non-gelling amylopectins on beta-lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 473-483, 2000.
- PERMYAKOV, E. A.; BERLINER, L. J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 473, n. 3, p. 269-274, 2000.
- PUGNALONI, L. A.; MATIA-MERINO, L.; DICKINSON, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 42, n. 3-4, p. 211-217, 2005.
- PUYOL, P.; PEREZ, M. D.; HORNE, D. S. Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 233-237, 2001.
- REMONDETTO, G. E.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Cold gelation of β -lactoglobulin in the presence of iron. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 2, p. 586-595., 2002.
- ROEFS, S. P. F. M.; DE KRUIF, C. G. A model for the denaturation and aggregation of bovine β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 226, p. 883-889, 1994.
- ROJAS, S. A.; GOFF, H. D.; SENARATNE, V.; DALGLEISH, D. G.; FLORES, A. Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 79-85, 1997.

- SANCHEZ, C.; ZUNIGA-LOPEZ, R.; SCHMITT, C.; DESPOND, S.; HARDY, J. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 199-212, 2000.
- SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1482, n. 1-2, p. 136-148, 2000.
- SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J. B.; HOLT, C.; JAMESON, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRÍNOVÁ, S.; WU, S. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 299-310, 2002.
- SGARBIERI, V. C. Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Thechnology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.
- SHAEFER, D. A.; MARTIN, J. E.; WILTZIUS, P.; CANNELL, D. S. Fractal geometry of colloidal aggregates. **Physical Review Letters**, College PK, v. 52, n. 26, p. 2371-2374, 1984.
- SHIH, W. H.; SHIH, W. Y.; KIM, S. I.; LIU, J.; AKSAY, I. A. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. **Physical Review A**, College PK, v. 42, n. 8, p. 4772-4779, 1990.
- STADING, M.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A. M. Microstructure and rheological behaviour of particulate β -lactoglobulin gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 195–212, 1993.
- SWORN, G. Xanthan gum. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**: First ed. Boca Raton: 2000. Cap. 6, p. 121-134.
- SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, N. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 179-193, 1998.
- TAVARES, C.; SILVA, J. A. L. Rheology of galactomannan–whey protein mixed systems. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 699–706, 2003.
- TAVARES, C.; MONTEIRO, S. R.; MORENO, N.; SILVA, J. A. L. Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? **Colloids**

- and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 270-271, p. 213-219, 2005.
- TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 589-601, 2002.
- URLACHER, B.; NOBLE, O. Xanthan gum. In: IMENSON, A. (Ed.). **Thickening and gelling agents for foods**: Blackie Academic & Professional. London: 1997. Cap. 13, p. 285-311.
- VEERMAN, C.; BAPTIST, H.; SAGIS, L. M. C.; VAN DER LINDEN, E. A new multistep Ca²⁺-Induced cold gelation process for beta- lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 13, p. 3880-3885, 2003.
- VERHEUL, M.; ROEFS, S. P. F. M.; MELLEMA, J.; DE KRUIF, K. G. Power law behavior of structural properties of protein gels. **Langmuir**, Washington, v. 14, n. 9, p. 2263–2268, 1998.
- VERHEUL, M.; ROEFS, S. P. F. M. Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 17–24, 1998.
- VREEKER, R.; HOEKSTRA, L. L.; DEN BOER, D. C.; AGTEROF, W. G. M. Fractal aggregation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 423–435, 1992.
- WALSH, D. J.; FITZGERALD, R. J. Health-related functional value of dairy proteins and peptides. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in food processing**: CRC Press. Boca Raton, USA: 2000. Vol. Cap. 23, p. 681.
- WEITZ, D. A.; OLIVEIRA, M. Fractal Structures Formed by Kinetic Aggregation of Aqueous Gold Colloids. **Physical Review Letters**, College pk, v. 52, n. 16, p. 1433-1436, 1984.
- WEITZ, D. A.; HUANG, J. S.; LIN, M. Y.; SUNG, J. Limits of the Fractal Dimension for Irreversible Kinetic Aggregation of Gold Colloids. **Physical Review Letters**, College pk, v. 54, n. 13, p. 1416-1419, 1985.

WEITZ, D. A.; LIN, M. Y. Dynamic Scaling of Cluster-Mass Distributions in Kinetic Colloid Aggregation. **Physical Review Letters**, College pk, v. 57, n. 16, p. 2037-2040, 1986.

WIELINGA, W. C. Galactomannans. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**: First ed. Boca Raton: 2000. Cap. 8 p. 153-171.

WU, H.; MORBIDELLI, M. A model relating structure of colloidal gel to their elastic properties. **Langmuir**, Washington, v. 17, n. 4, p. 1030-1036, 2001.

CHAPTER 3

Evaluation of whey protein interactions in acidic cold set gels at different pH values

Ângelo Luiz Fazani Cavallieri; Antonio Paulino Costa-Netto, Marcelo Menossi, Rosiane Lopes da Cunha

**Le Lait – Dairy Science and Technology
(under review)**

**Evaluation of whey protein interactions in acidic cold set gels at different
pH values**

Angelo Luiz Fazani. CAVALLIERI^a; Antonio Paulino COSTA-NETTO^b; Marcelo. MENOSSI^b; Rosiane Lopes Da CUNHA^{a*}

^aDepartment of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, 13083-862 – Campinas, SP, Brazil.

^bBiology Institute and Centre for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6010, 13083-875 - Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55-19-35214047; fax: +55-19-35214027;

e-mail: rosiane@fea.unicamp.br

Abstract - Cold set whey protein isolate gels (7%w/w) were produced by the addition of different amounts of glucono- δ -lactone to thermally denatured protein solutions. After 48 h of incubation at 10°C, different final pH values were obtained (5.2 to 3.9). The gels were analysed by uniaxial compression measurements, water holding capacity and protein solubility. The water holding capacity of the gels decreased at pH values near the pI, this being associated with the lower protein solubility at this pH value. Whey protein dissociation from the network matrix was higher at the border pH values, leading to an improvement in the water holding properties, due to the enhanced hydrophilicity of the system. Protein solubility in the presence or absence of denaturing and reducing agents indicated that electrostatic interactions were responsible for the maintenance of the acidified gel structure at pH values from 5.2 to 4.6, but at pH 4.2, an important contribution of hydrophobic interactions to the gel network was also observed. Complementary PAGE assays showed that disulphide bonds were associated with internal stabilization of the protein aggregates formed during heat treatment. The mechanical properties of the gels were influenced by the final system pH value, showing that the strongest network was observed at pH 5.2. Such results allowed for the conclusion that β -lactoglobulin dissociation and aggregation at the pI played an important role in gel stabilization, strengthening the network structure at the same time as providing good water retention capacity

Whey proteins / glucono-delta-lactone / cold gelation / protein interactions / PAGE.

1. INTRODUCTION

Whey proteins (WP) are widely used as an ingredient in the food industry because of their excellent functional and nutritional properties. They are globular proteins with molecular masses ranging from 14 to 1000 kg.mol⁻¹ and are composed of 60% β -lactoglobulin (β -Lg), 22% α -lactoalbumin, (α -La), 5.5% bovine serum albumin (BSA) and 9% immunoglobulins (Ig). The iso-electric points of these proteins are 5.2 for β -Lg, from 4.2 to 4.5 for α -La, from 4.7 to 4.9 for BSA and between 5.5 and 6.8 for Ig [7, 26].

Heat-induced aggregation and gelation of whey proteins has been extensively studied and reported in the literature [21]. The combined control of thermal WP denaturation and the solvent quality can lead to a gelling process called “cold gelation” that can be used in a variety of products, such as surimi, mayonnaise and gelatine-like desserts [7]. This method of gelation consists of two steps. First a solution of native globular proteins is heated at neutral pH (well above the iso-electric point), at low ionic strength and a protein concentration lower than the gelation concentration. In this first step, unfolding of the native proteins is followed by aggregation into disulphide cross-linked aggregates. Under the conditions described, the proteins have a net surface charge and repulsive forces will prevent random aggregation, resulting in the formation of soluble aggregates. After cooling to room temperature it is obtained a stable dispersion of aggregates, which do not gel during a period of hours, depending on denaturation conditions [2, 19]. In the second step, a change in the quality of the solvent induces gelation. Turbid, particulate gels are formed after the addition of relatively large amounts of salt or after acidification in the

direction of the iso-electric point. Usually, acid-induced cold-set gels are stronger than salt-induced cold-set gels, at the same protein concentration [19].

Among the functional properties of proteins, solubility is of primary importance due to its significant influence on the other functional properties of proteins. A high solubility provides good emulsions, foam, gelation and whipping properties. Since most conventional food products contain more than 50% water, good water holding capacity is essential, because consumers tend to avoid products that show free water in the package [4]. Protein solubility is considered to be the result of surface-active properties such as hydrophobic (protein-protein) or hydrophilic (protein-solvent) interactions[8]. The balance of these forces of attraction and repulsion occurring between adjacent polypeptide chains will also interfere in gel formation [7]. The solubility of whey protein gels in different buffer media has been used to understand interactions between whey protein molecules [25]. Solubility in different buffer media was also used in an attempt to associate solubility properties with the network molecular interactions, which could be responsible for the rheological and water holding properties of the systems [22-25, 29]. The knowledge of system rheological or mechanical properties is of great importance, since texture attributes can be significantly correlated with these properties.

The objective of this study was to investigate the interactions between whey proteins under cold-set gelation conditions produced by heat treatment and by pH modifications in the direction of the WP pI. Acidification conditions were used in order to obtain gels with final pH values near the pI of the different fractions of WP, after 48 h of acidification at 10°C. Interactions between the WP fractions in the gel network were studied by protein solubility experiments followed by polyacrylamide gel electrophoresis. The

protein network structure formed was also evaluated by measurement of the water holding capacity and uniaxial compression.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material and chemicals

The whey protein isolate (WPI) Lactoprodan, was kindly donated by ARLA FOODS INGREDIENTS (Viby J, Denmark). According to SDS-PAGE experiments [20], this WPI is comprised mainly of β -Lg (56%), α -La (31%) and BSA (7%), other minor fractions and some denaturated proteins, as determined by densitometry (see section 3.1). The protein concentration in the powder was 92.4% and the lactose content 0.6%, as determined by the Kjeldahl procedure [3] and phenol sulphuric method [17], respectively. The total solids content was 94.3% (5.7% moisture, wet basis). The ions content of the WPI was determined by atomic absorption spectroscopy, showing the following composition (w/w %): 0.05 Ca^{2+} , 0.63 Na^{+} and 0.65 K^{+} . The ester GDL was purchased from Sigma Aldrich Corporation (St Louis-USA).

2.2. Gel preparation

7% (w/w) WPI solutions were prepared by dissolution of the powder in deionised distilled water, with magnetic stirring for 90 min at room temperature. During this period the pH was kept at 6.7. These solutions were then subjected to heat treatment at 80°C for 30 min in a stainless steel jacketed vessel. WPI solutions (0.3 L) were poured in a vessel of 0.75 L internal volume and the temperature was kept constant at 80°C by the fast water circulation in the inner part of the jacket, using a controlled temperature water bath (QUIMIS, São Paulo, Brazil). During heat treatment the WPI solutions were subjected to

gentle mechanical agitation. Accordingly temperature measurements in preliminary experiments WPI solutions achieved 80°C before 5 min after pouring solutions in the vessel. PAGE experiments [20] were performed on samples removed after this heating step to evaluate the extent of thermal WP denaturation. After heat treatment, the solutions were rapidly cooled to 10°C in an ice bath. GDL powder at different concentrations was then added to the cooled solutions and gently stirred for 1 minute. All the systems were stored at 10°C for 48 h and different final pH values were achieved.

Immediately after the addition of GDL, the thermally denatured protein solutions, a part of the systems was gently poured into small plastic tubes with internal diameters of 20 mm and 25 mm in height, and sealed in order to avoid evaporation during storage. Just before each analysis, the gels were gently removed from the plastic tubes and subjected to uniaxial compression measurements. Some gels were also cut with a sharp blade and a small piece from the centre subjected to the WHC experiment, or blended with water or buffers in the protein solubility experiment. The GDL concentration used to prepare the systems depended on the protein concentration and desired final pH, which was expressed as GDL/WPI (%w/w) ratio. WHC and protein solubility experiments were performed using GDL/WPI ratios of 0.084, 0.115, 0.135, 0.186, 0.220 and 0.350, which resulted in final pH values of 5.2, 4.9, 4.7, 4.6, 4.2 and 3.9 after 48 h of storage at 10°C, respectively. Some conditions were chosen due to their closeness to the iso-electric point of the main whey proteins: 5.2 for β -Lg, between 4.2 and 4.8 for α -La and BSA [26], but the pH value of 3.9 corresponded to a system condition of over acidification. The uniaxial compression tests were performed using GDL/WPI ratios between 0.084 and 0.220. At pH 3.9, the

mechanical properties were not determined because the gels were not self-supporting (were not able to maintain their form sufficiently for the compression experiments). In all studies, the fall in pH caused by GDL hydrolysis was measured using a Sentron 2001 pH meter (Sentron Inc., Gig Harbor/Washington, USA) equipped with an electrode calibrated at the reaction temperature, over the pH range from 7.0 to 4.0.

2.3. Mechanical properties

Uniaxial compression experiments were carried out using a TA-XTIIIi Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Godalming, UK) equipped with a lubricated acrylic cylindrical plate (40 mm diameter). The gels were compressed to 80% of their original height using a crosshead speed of 1 mm/s. All measurements were done with five replications at $10 \pm 1^\circ\text{C}$. The force and height data were transformed into Hencky stress (σ_H)–Hencky strain (ε_H) curves [30]. The rupture properties (stress and strain) were obtained from the maximum point of the stress–strain curve, while the Young’s modulus was the slope of the initial linear region of this curve.

2.4. Water holding capacity (WHC)

The WHC of the gels was determined by weighing the gel pieces before and immediately after centrifugation. The gels were wrapped in Whatmann 1 filter papers (Maidstone, UK) and gently placed in centrifuge tubes. The tubes were centrifuged at 120g for 5 min [23] at 10°C using an Allegra 25 R BECKMAN centrifuge (Fullerton-USA). The WHC was expressed according to equation 1:

$$WHC (\%) = 100 * \left[\left(\frac{water_{remaining} (g)}{water_{gel} (g)} \right) \right] \quad (1)$$

where $\text{water}_{\text{gel}}$ and $\text{water}_{\text{remaining}}$ represent the amounts of water in the gel before and after centrifugation, respectively.

2.5. Determination of protein solubility

The protein solubility of the WPI gels was determined in deionised distilled water at pH 6.0 (DW) and in four different buffer systems: a standard pH 8.0 buffer (0.086 M Tris, 0.09 M glycine, 4 mM Na₂EDTA) (B), the same standard buffer containing 0.1 % β -mercaptoethanol (BM), 6 M urea (BU) or 0.1 % β -mercaptoethanol plus 6 M urea (BUM). After the dissolution in water it was not observed higher modifications in pH values of the systems than 0.1 or 0.2 pH units. Gel dispersions were prepared adjusting the protein concentration of the dispersions to 0.1% (w/w). The solutions were homogenized at room temperature using an Ultra-Turrax IKA model T18 basic (Staufen, Germany) at 10000 rpm for 2 min. Homogenized solutions were then centrifuged at 20,000g for 15 min in an Allegra 64 R Beckman centrifuge (Fullerton- USA) and the dissolved protein determined in the supernatant fraction. The protein concentration in supernatant was determined immediately after centrifugation at 280 nm in a Beckman Du 70 Spectrophotometer (Fullerton-USA) using an apparent extinction coefficient ($E_{1\text{cm}}^{0.1\%}$) of 9.1. The extinction coefficient was obtained by measuring the absorbance at 280 nm of a 0.1 % whey protein solution, the concentration of which was determined by the Kjeldhal method. These soluble fractions were also subjected to PAGE analysis for the characterization of whey protein fractions in the supernatant.

2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The soluble fractions from the WP gels extracted in water and in Tris buffer (B or BM in the solubility experiments) were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using a vertical slab Mini Protean electrophoresis system (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). NATIVE-PAGE and sodium dodecyl sulphate SDS-PAGE (reducing and non-reducing conditions) analyses [20] were performed. The resolving and stacking gels contained 5% and 15% of acrylamide respectively, giving an effective separation range between 12 and 200 kg.mol⁻¹ [9]. After protein quantification for each protein solubility extraction, 10 µg of protein (except when specified in the results and discussion section) were diluted in equal volumes of 3 different loading buffers with the same base of 0.05M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol and 0.1 % bromophenol blue. This buffer was used for the NATIVE-PAGE runs (non-dissociating conditions). For the SDS-PAGE analyses, the samples were diluted in the same buffer, but with the addition of 2% SDS (dissociating non-reducing conditions) or with the addition of 2% SDS plus 0.1M β-mercaptoethanol (β-ME) (dissociating and reducing conditions). Under dissociating conditions, the proteins were completely dissociated by immersing in boiling water for 2 min. These samples were then loaded into polyacrylamide wells in the stacking gel. The gels were run at 200V and then stained with Coomassie Brilliant Blue in methanol: acetic acid: water (45:10:45 v/v) and diffusion-destained by repeated washing in a methanol: acetic acid: water solution (10:5:85 v/v). A pre-stained InvitrogenTM Bench Marker protein ladder (BIOAGENCY INTERNATIONAL CORP-Jacksonville-USA) and pure fractions of β-lactoglobulin, α-

lactalbumin, BSA and α , β , and κ -caseins Sigma Aldrich Corporation (St Louis-USA) were used as molecular mass markers.

Pictures of the gels were taken using an Eagle Eye video system (Stratagene, La Jolla, USA), which also allowed for the densitometric analysis of the bands using the software Stratagene Eagle Sight (Stratagene, La Jolla, USA). The band intensities were used to determine the protein composition of each WP fraction ($C_{WP\text{sup}}$) in the water-supernatant of the water solubility experiments. The data were analysed in relation to the total initial protein content (equation 2) or initial WP protein fraction content in the gel (equation 3).

$$C_{WP\text{sup}} (\%) = \frac{m_{WP}S}{m_{total} gel} * 100 \quad (2)$$

$$C_{WP\text{sup}} (\%) = \frac{m_{WP}S}{m_{WP} gel} * 100 \quad (3)$$

where $m_{WP}S$ is the mass composition of each WP water soluble fraction, $m_{total} gel$ is the initial total amount of protein and $m_{WP} gel$ is the initial WP protein fraction content in the gel. The precipitated fraction of WP (X_{WP}) was calculated by difference.

2.7. Protein electro-elution from the polyacrylamide gel

Protein aggregates observed in the NATIVE-PAGE of the water-soluble proteins were extracted from the polyacrylamide gels using a Bio-Rad Protein Electro-Eluter model 422 Module (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The stained bands were separated and cut off from at least 8 NATIVE-PAGE gels, and minced into small pieces. The gel slices were then loaded into an electro-eluter and the equipment filled with the running buffer. The running buffer used in the elution was the same running buffer used in

NATIVE PAGE and consisted of 25 mM Tris plus 192 mM glycine diluted in deionised distilled water. Elution was done at a constant current of 10 mA for 6 h against membrane caps with a 3.5 kg.mol⁻¹ cut off. At the end of elution a volume of about 0.6 mL was collected from the membrane caps, and a second elution carried out using the same sample for a further 6 h, under the same elution conditions. The eluted samples were then dialysed for 24 h against deionised distilled water with a 3.5 kg.mol⁻¹ cut off membrane. The water used for dialysis was changed twice with fresh distilled water. The sample was then collected and the volume reduced in an Eppendorf Vacufuge concentrator model 5301 (Westbury, USA) at room temperature. After concentration, the samples were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing conditions, as described above.

2.8. Statistical analysis

Significant differences ($p < 0.05$) between treatments were determined by the Tukey procedure. Statistical analyses were performed using the software STATISTICA 5.5 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Turbid gel formation was observed during acid gelation, with a gradual pH reduction. The formation of cold set whey protein gels take place at pHs values above and around the β -Lg pI [1] due to the formation of disulphide bonds occurs predominantly at these pH conditions. However, in this work we studied the gels produced at different values, specially at β -Lg pI, because we were interested in the evaluation of mechanical properties and consequently molecular interactions of cold set whey proteins formed at BSA and α -La pI. Previous results indicated that under slower acidification rates gels were

stronger, which was attributed to molecular rearrangements after the achievement of the final pH values (Chapter 4). According to this study, the whey protein gels showed a great intensity of pH change up to 500 min (8.3 h) and then steadily decreased. Gel with a final pH of 5.2 was achieved in 29 h whilst the gel with a pH of 4.2 was obtained in about 17 h. Since the systems showed no changes in pH after 48 h of acidification, the water holding capacity, protein solubility and mechanical properties of the gels were evaluated at this time.

3.1. Soluble whey protein aggregates

The protein composition and formation of the soluble protein aggregates due to heat treatment of initial whey protein solution were evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 1).

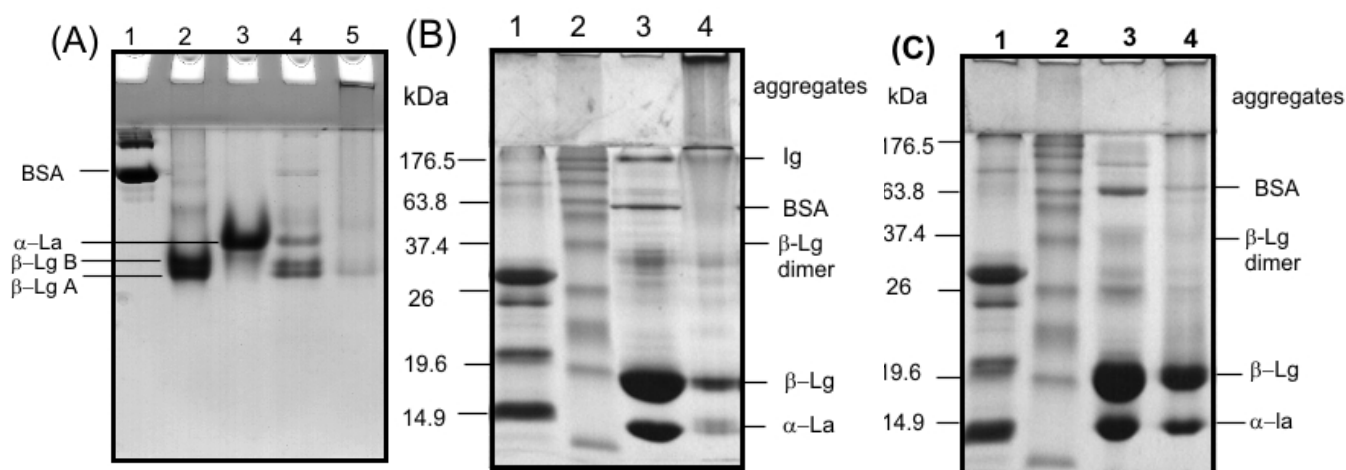


Figure 1: Heat-induced polymerisation of whey proteins: (A) Native PAGE, (B) SDS-PAGE under non-reducing conditions and (C) SDS-PAGE under reducing conditions. In (A) lanes 1, 2 and 3 are pure milk protein fractions. In (B) and (C) lane 1 = mixture of pure milk proteins, lane 2 = commercial molecular mass marker. The unheated WP solution was loaded into lane 4 in (A) and into lane 3 in (B) and (C). The heat-denatured WP solution (80°C/30 min) was loaded into lane 5 in (A) and into lane 4 in (B) and (C).

From the Native-PAGE gels (Figure 1 A) the initial characteristics of the WPI and the effect of heat treatment on whey protein was observed by comparing the unheated solutions (lane 4) with the heat denatured one (lane 5). The pure milk fractions were loaded in order to identify the main WP in the sample (lanes 1, 2 and 3). The initial whey protein solution (not heated) showed a smear band of aggregates in the top stacking gel and accordingly densitometry measurements such aggregates corresponded to almost 5 % of the initial whey protein composition. Such aggregates showed molecular mass greater than 200 kg.mol^{-1} , since they were unable to enter the 5% polyacrylamide stacking gel.

The bands of the main whey protein fractions (β -Lg A and B, α -La and BSA) can be visualized in unheated solution, but were almost absent in the heated solution. However, an aggregate can be visualized at the top of the gel (disulphide bonded material), corresponding to a high molecular mass protein aggregate formed during heating. In the denatured WPI solution such aggregate corresponded to approximately 80% of the proteins applied in Native PAGE (Figure 1, lane 5). Densitometry measurements also allowed to visualize that almost 100% of BSA and α -La were associated with large aggregates formation during heating, but a fraction of the initial amount of β -Lg (corresponding to approximately 30%) remained in solution and were not linked in the aggregates. Such results suggests that the majority of the whey protein fractions were involved in thermal aggregates formation.

Almost all of the bands seen in lane 4 had disappeared, indicating essentially complete denaturation and aggregation of the native whey proteins. Similar results of whey protein denaturation were observed in NATIVE PAGE for whey protein concentrate [13]

and WPI solutions of different protein concentration [31] under similar conditions of heating applied in this work.

In order to further characterize protein interactions involved in whey protein aggregates formation, SDS PAGE analysis was performed under non-reducing (Figure 1 B) and reducing conditions (Figure 1 C). Under non reducing conditions, the presence of SDS disrupts all non-covalent protein bonds, causing the macromolecules to unfold, and the addition of β -ME under reducing conditions, further denaturates the proteins aggregates, breaking them down in the disulphide bonds. In SDS PAGE under non-reducing conditions (Figure 1 B), the unheated solution showed pronounced bands of β -Lg monomers, α -La and BSA. The heated solution (lane 4) showed bands of β -Lg and α -La monomers with lower intensities than those observed in the unheated solution (lane 3) and faint BSA bands. In the $176.5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ region, a small and intense band can be observed in lane 3 and also in lane 4, but with weaker intensity. These bands could correspond to Ig fraction [26]. These proteins have high molecular mass and are extremely thermolabile in the presence of other WP, possibly leading to interactions with β -Lg and BSA via disulphide bond formation [26]. Other smeary bands can be visualized in gel region comprised between 26 and $37.4 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, which could correspond to β -Lg dimmers, as reported by some authors [13, 16, 18, 28]. An increase in intensity of bands corresponding to β -Lg and α -La can be observed in the heated WP solutions under non-reducing conditions, as compared to NATIVE PAGE (Figure 1 A and B, respectively). Such results indicate that the SDS disrupted the non-covalent interactions amongst the WP aggregates, probably hydrophobic interactions, but disulphide bonded material still remained on the top stacking gel. Such result confirmed

that when WPI solutions were heated majority of WP were denatured and aggregated and some of these were dissociable under SDS conditions (non-covalently bonded) whereas some were not (disulphide bonded) [13, 31].

In the SDS PAGE under reducing conditions (Figure 1 C), the high molecular mass aggregates showed weaker intensities at the top of the stacking gel compared under reducing and non-reducing conditions (Figure 1 B and C). Consequently the intensity of WP bands (β -Lg, α -La and BSA) was greater under reducing conditions, showing similar patterns between unheated and heated solutions. These results indicate that intermolecular disulphide bonds between WP fractions are also associated to WP aggregates stabilization, despite the occurrence of non-covalent interactions (Figure 1 B). In order to characterize the composition of whey proteins in the WPI used in this study, the densitometry analysis of the observed bands in non-heated WPI solution (lane 3 Figure 1 C) was performed. Such results indicated that among the observed bands 52% corresponded to β -Lg, 18% to α -La and 6 % to BSA. The others 24% corresponded to minor smear bands and aggregates still present between the top stacking and resolving gels.

The PAGE results in Figure 1 suggested that during the formation of whey protein soluble aggregates under the heating conditions applied in this work; non-covalent and covalent interactions were associated to proteins aggregates stabilization. Several models are proposed in the literature to explain the possible mechanisms for the polymerisation of proteins based on different electrophoretic techniques examination of intermediate protein aggregates formed during heating. These mechanisms were based mainly on heating experiments with pure whey protein solutions, giving a clue of more complex mechanisms

that may occur in protein isolate solutions, which is a mixture of whey proteins. In all these models the formation aggregates are based in disulphide bonds formations between protein molecules during heating, with little or no emphasis on the importance of non-covalent bonding. In these way, the soluble whey protein aggregates formed in the heating conditions applied in this work could be associated to interactions between β -Lg species [32], β -Lg and α -La [11, 18, 28] α -La and BSA [14] and also β -Lg and BSA [10].

3.2. Protein solubility in water and in different buffer systems

Figure 2 shows the results of protein solubility of 6 different WP cold-set gels (pH values of 3.9, 4.2, 4.6, 4.7, 4.9 and 5.2) dispersed in water and in different pH 8.0 buffers.

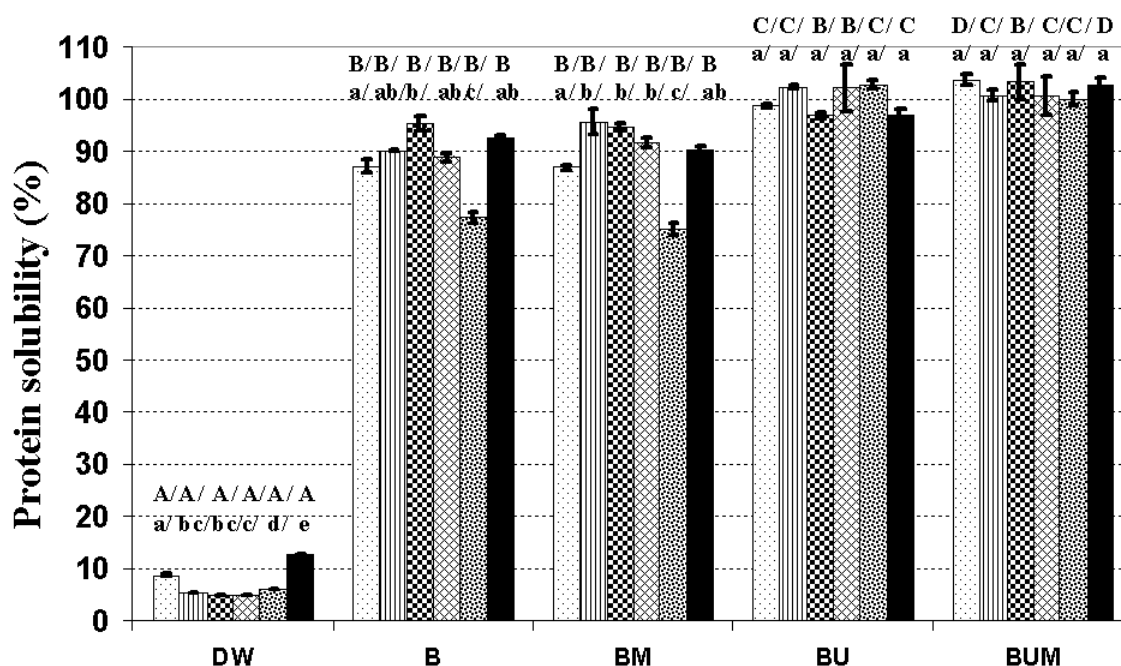


Figure 2: Solubility profile of 7% (w/w) WPI cold set gels acidified with GDL in water (DW) and in different buffers (B, BM, BU and BUM). System pH values after 48 h at 10°C: 5.2, 4.9, 4.7, 4.6, 4.2 and 3.9. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the pH values in each buffer system. Capital letters: differences amongst the buffer systems at each pH.

Comparing the values for protein solubility in DW one can observe that the WP gel with the highest protein solubility was obtained at pH 3.9 (far from the pI of the whey proteins). The lowest solubility values (5 %) were obtained at pH values between 4.2 and 4.9, close to the iso-electric point of α -La and BSA, while solubility was slightly higher (9%) near the pI of β -Lg. It was observed that WP gels were more soluble in all the pH 8.0 buffers than in water (Figure 2). The solubility values in the standard buffer (B) and in the same buffer with the addition of β -ME (BM) were between 75% and 90%, and the lowest solubility values (75 – 77%) were observed at pH 4.2. It was not observed significant differences in solubility values of gels dispersed in buffers B or BM for each gel final pH evaluated. However, when gels were dispersed in buffers containing urea (BU and BUM), the protein solubility was nearly 100% for all the gels studied.

The patterns obtained for gel protein solubility in water (U-shaped curves with minimal values around the pI) can be attributed to the characteristics of the protein interactions during gel formation. When the pH was lowered by GDL hydrolysis, the negative charge of the proteins was progressively neutralized, diminishing protein electrostatic repulsion and favouring protein-protein interaction. As a result, there was less water to interact with the protein molecules near the pI, favouring protein precipitation [33].

The higher solubility in pH 8.0 buffer (B) than in water (DW) suggests that the interactions amongst the acidified WP proteins were mainly electrostatic in nature for all the pH values studied [26]. Such behaviour could be explained by the fact that the solubility of the proteins increased at higher pH values far from the proteins pI (buffer pH 8.0). In

such a condition the proteins have predominance of negative charge leading to an increase in the electrostatic repulsion between protein molecules, causing protein dissolution and thereby increasing protein solubility [33].

No significant differences were found between the extractions made in the (B) and (BM) buffers, despite the formation of S-S bonds between the WP during the heating step, as attested by PAGE experiments (section 3.1). This fact could be attributed to the greater amount of electrostatic as compared to S-S bonds, making it difficult to identify and quantify these disulphide interactions.

The presence of urea (a denaturant agent) produced solubilization by disrupting non-covalent interaction such as hydrophobic and hydrogen bonding [27]. Such an increase in solubility would be related to hydrophobic and hydrogen bonding among whey protein aggregates in gel network contributing to stabilization of the gel. However, at pH 4.2 the differences among solubility in buffers BM and BU or BUM was greater than observed for other pH values, suggesting that under these acidification condition (final pH at α -La pI) hydrophobic and hydrogen bonding are present among whey protein aggregates in gel network in spite of at this pH β -Lg and BSA fractions are becoming far from its isoelectric point.

Figure 3 shows the water holding capacity properties of the systems studied.

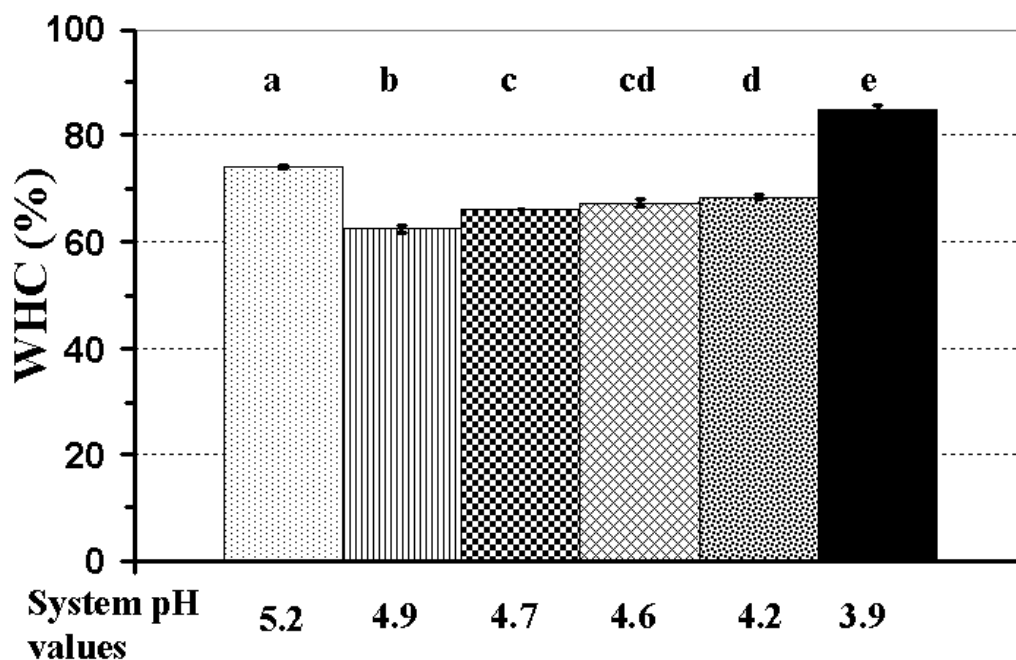








Figure 3. Water holding capacity of 7% (w/w) WPI cold set gels acidified with GDL. Gel pH values after 48 h at 10°C:  5.2,  4.9,  4.7,  4.6,  4.2 and  3.9. Small letters mean significant differences ($p < 0.05$) among the acidification conditions studied.

The results showed that cold set WP gels produced at the lowest and highest GDL/WPI ratios (pH values of 5.2 and 3.9) retained more water after centrifugation than gels with intermediate pH values. Systems with a final pH value of 5.2 showed WHC of 74%, and with a final pH of 3.9 (over acidification condition), the WHC was 84.80%. Gels with final pH values near the pI of BSA and α -La (4.9 to 4.2) exhibited WHC between 62 and 68%. WHC patterns were very similar to those observed for protein solubility in water (same U-shaped curves with minimal values around the pI) suggesting that protein interactions around the pI (mainly electrostatic) also reduced water retention amongst protein segments in the gel.

From the solubility patterns obtained in DW and in the different pH 8.0 buffers, 2 kinds of interaction in the protein network of the acidified gels can be distinguished: 1- interactions between part of the proteins with water, by hydrogen bonding, 2 – interactions amongst a great part of the proteins by electrostatic and hydrophobic interactions and even hydrogen bonding, the two former being more significant at pH 4.2. Disulphide bond interactions were probably responsible for keeping the protein aggregates formed during heat treatment, but they were not identified in the solubility experiments. Electrophoretic experiments were performed in order to evaluate the aggregates or individual WP fractions that were soluble in DW or in the pH 8.0 buffers.

3.3. PAGE of water-soluble protein fractions

Figure 4 shows the electrophoretic mobility patterns of the soluble protein extracted in water (DW) in NATIVE (A) and SDS-PAGE under non-reducing (B) and reducing conditions (C).

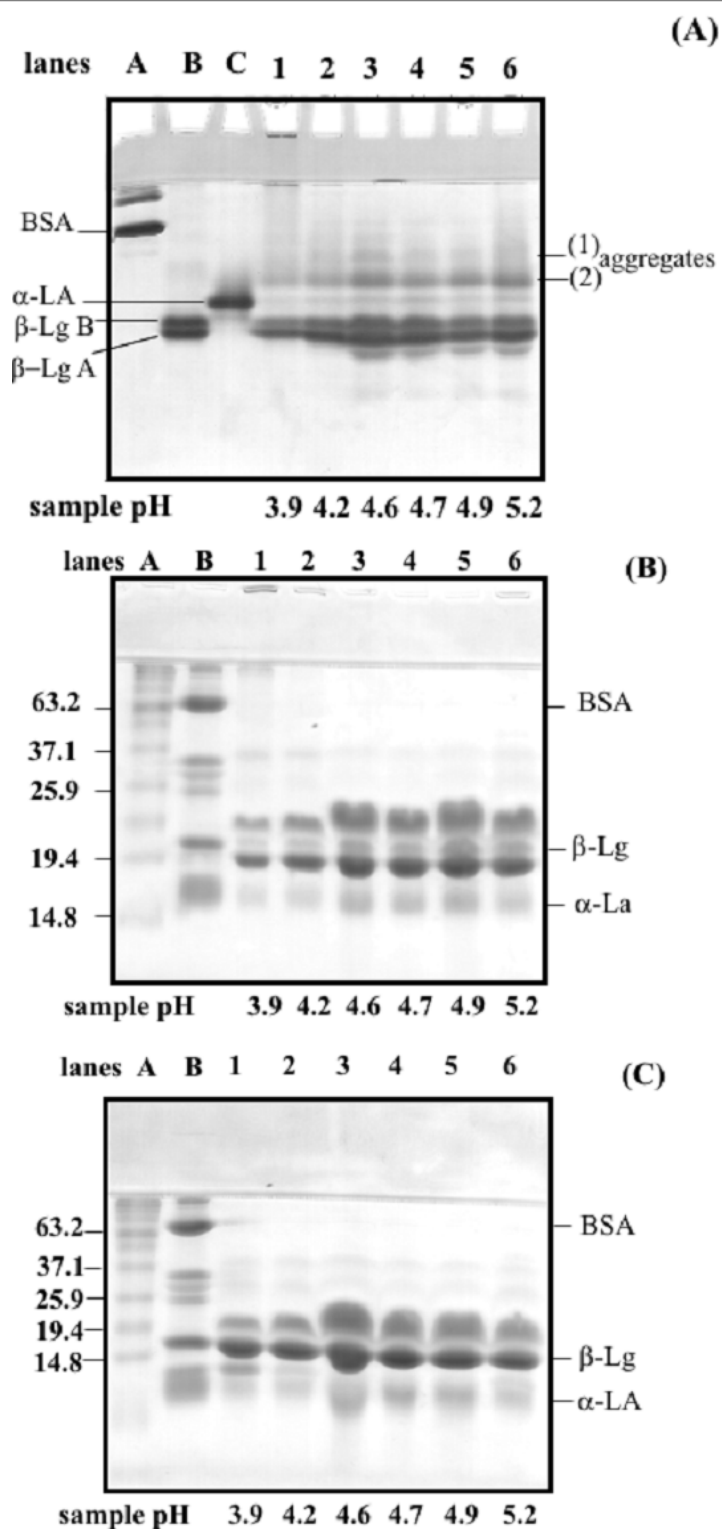


Figure 4: (A) NATIVE PAGE, (B) SDS-PAGE under non-reducing conditions and (C) SDS-PAGE under reducing conditions, of water-soluble protein fractions of WPI cold set gels. In (A) pure milk proteins were loaded as markers into the single lanes A, B and C. In (B) and (C) lanes A and B were the commercial molecular mass marker and the mixture of pure milk proteins, respectively.

Samples at pH values between 4.6 and 5.2 showed pronounced bands for β -Lg A and β -Lg B (particularly at pH 4.6), and weaker bands corresponding to α -La (Figure 4 A). Samples at pH 3.9 and 4.2 showed bands of lesser intensity for β -Lg (A and B) and α -La. Protein aggregates (marked as aggregates 1 and 2) can be seen in the resolving gel between α -La band and the stacking gels at all pH values, but almost no bands corresponding to BSA could be visualised.

The soluble protein in water that were observed in Figure 4-A participates in the gels network and were dissociated from the gel matrix during the solubilization procedure, probably due to disruption of weak electrostatic interaction (Figure 2). In order to evaluate the level of rearrangements induced by acidification conditions, the proteins soluble in water should be considered in relation to the whey protein fractions present just after the first heat treatment and not linked to the formed thermal whey protein aggregates. The total of BSA and α -La present in initial WPI were linked to the formed protein aggregates after initial heat treatment step, while the β -Lg was 70% linked to the aggregate (section 3.1). Such result suggest that the observed β -Lg fractions soluble in water after acidification (Figure 4 A) could come from the β -Lg not involved in whey protein soluble aggregates. However, the α -La, the lesser BSA fractions as well aggregates 1 and 2 (Figure 4A) could be dissociated from protein aggregates formed in the initial heating step due to possible rearrangements in such aggregates, which was induced by acidification conditions during the gelation step of the cold set gels formation.

The PAGE patterns observed in Figures 4 B and C were similar, showing intense bands for β -Lg and weaker bands for α -La in all samples, but bands for BSA were almost

not observed. Although the ideal sample load corresponds to 10 μg of protein, in these experiments the samples were overloaded (20 μg) in order to attempt better visualization of the α -La and BSA bands. The lack of bands for aggregates 1 and 2 in Figure 4 B could indicate that these aggregates were stabilized by non-covalent interactions, such as hydrophobic and electrostatic interactions. Moreover, the similar PAGE patterns found in Figures 4 B and C could indicate that disulphide bonds were not involved in the structure of these water-soluble aggregates.

Electro-elution experiments were performed for a qualitative analysis of the protein constituents of aggregates 1 and 2 observed in NATIVE PAGE (Figure 4 A). The bands extracted were then analysed by SDS-PAGE under reducing conditions and the results can be seen in Figure 5.

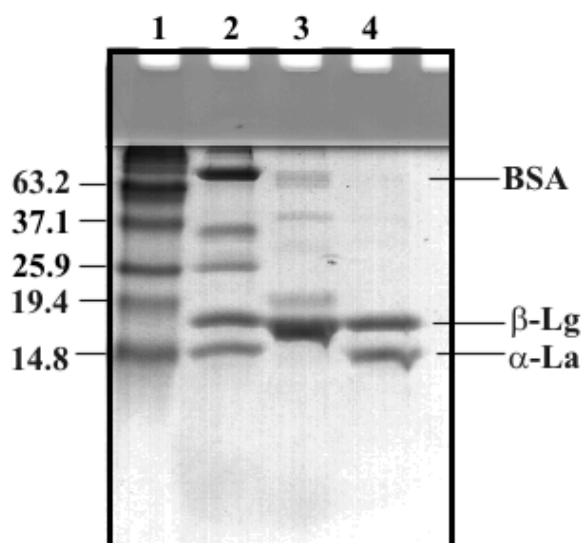


Figure 5: Reducing SDS-PAGE of the aggregates extracted from Native PAGE (Figure 4 A) by electro-elution. Lanes 1 and 2 are the commercial and pure milk proteins markers, respectively. Lane 3 corresponds to the aggregate 1 observed in Figure 4 (A), and lane 4 to aggregate 2.

An intense β -Lg band and very weak BSA bands can be observed in aggregate 1. However, aggregate 2 was constituted of β -Lg and α -La as can be visualized in lane 4. Although BSA bands were almost not observed in Figure 4 A, B and C, the electro-elution results suggested that BSA was present in aggregate 1. From these results it was assumed that BSA was mostly linked to another protein in the water-soluble fraction in the pH range from 3.9 to 5.2. In addition, the lower intensity of BSA in the PAGE results could be associated with the minor content of these proteins in relation to the other WP fractions.

Some considerations should be taken for the lower solubility of α -La and BSA in water: The weak intensity of the α -La bands in the water-soluble fraction as shown in Figure 4 (A, B and C), could be correlated with the following facts: 1) formation of large disulphide bonded polymers between the whey proteins due to first heating step [15], 2) possible hydrophobic interactions between α -La and BSA that can occur specially pH 4.2 [5], or 3) precipitation of α -La at pH values near its iso-electric point, due to conformational transition of the α -La structure, involving dissociation of the strongly bound calcium ion [5, 6]. On the other hand, BSA was almost absent in soluble water fractions because such protein is the most reactive protein under heating (previous heating for the formation of soluble whey protein aggregates), leading to a formation of disulphide bond polymers [12, 15]. It was previously observed that both β -Lg and BSA formed hydrophobically bonded aggregates and disulphide bonded polymers, while α -La aggregate rapidly when heated in the presence of β -Lg [12]. Previous studies also showed that when whey protein concentrate was heated, BSA forms disulphide-bonded strands ahead of other whey proteins aggregations, that could be β -Lg and α -La aggregation with β -Lg [15].

Quantification of each WP fraction in the DW supernatants was determined from the PAGE band densities (Figure 4), considering the amount of protein applied to the gel for each pH evaluated. Figure 6 A and B shows the WP composition in relation to the total protein in the gel (equation 2), and Figure 6 C shows the values calculated in relation to the initial amount of individual WP in the gel (equation 3). The data shown in Figure 6 A were obtained from the quantification of the NATIVE PAGE (Figure 4 A), while Figure 6 B and C show the composition after disruption of aggregates 1 and 2 by the addition of SDS and β -mercaptoethanol (PAGE loading buffer-Figure 4 C).

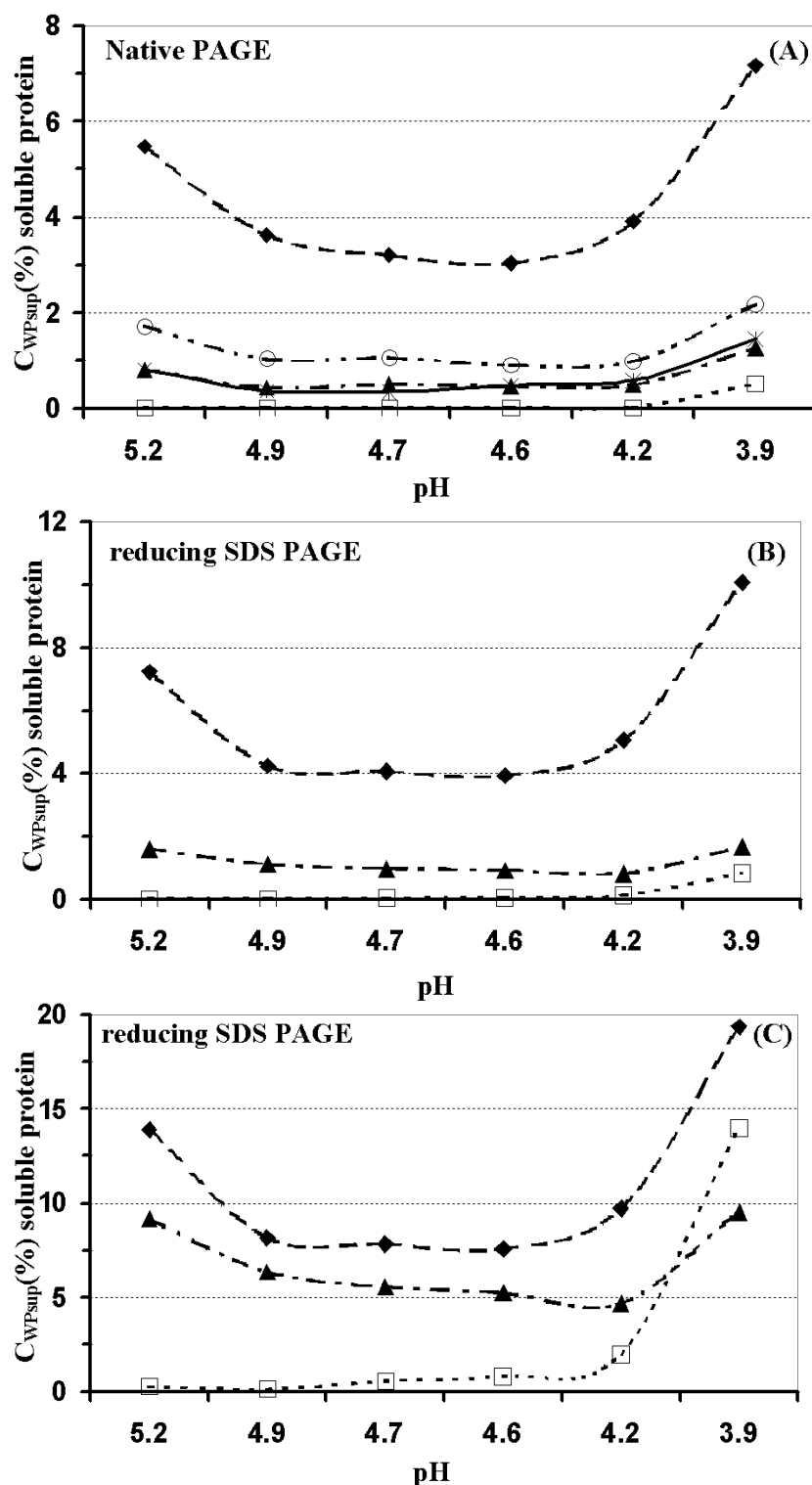


Figure 6: Whey protein composition of water supernatant in solubility experiments (C_{WPsup}). A and B are the protein composition in relation to the initial total protein in the gel. C is the protein composition in relation to the initial amount of each WP in the gel. Whey protein fractions: \blacklozenge β -Lg, \blacktriangle α -La, \square BSA, $*$ aggregate 1 and \odot aggregate 2 (the aggregates are those observed in Figure 4 A)

The composition of the majority of WP fractions in water (DW) showed the U shaped curve pattern as a function of pH, like the total soluble protein (Figure 1) and WHC (Figure 2), with minimal values between pH 4.9 and 4.2. Greater values for solubility were observed for all fractions between pH 5.2 and 3.9 as with WHC.

It was observed that β -Lg represented the greater part of the soluble protein (Figure 6 A) even before disruption of aggregates 1 and 2 (Figure 6 B). The α -La fraction was the second most soluble protein fraction, while BSA was the least soluble (Figure 6 A and B). It should be mentioned that when the composition was analysed with respect to the total protein of the gel (Figure 6 A), the sum of each WP fraction and amount of aggregate at each pH was always the total water-soluble protein at each pH (data in Figure 1). The difference from 100% corresponds to the amount of protein insoluble in water. When the composition was calculated in relation to individual WP, the values for the composition were relatively greater (Figure 6 C), but in this way it was possible to evaluate that β -Lg was the most soluble WP protein fraction.

Figure 7 shows the precipitated fractions of the main whey proteins. BSA was the most precipitated fraction, with maximum precipitation at pH values between 5.2 and 4.2. α -La was the second most precipitated fraction followed by β -Lg. These proteins showed maximum precipitation at pH values between 4.9 and 4.2.

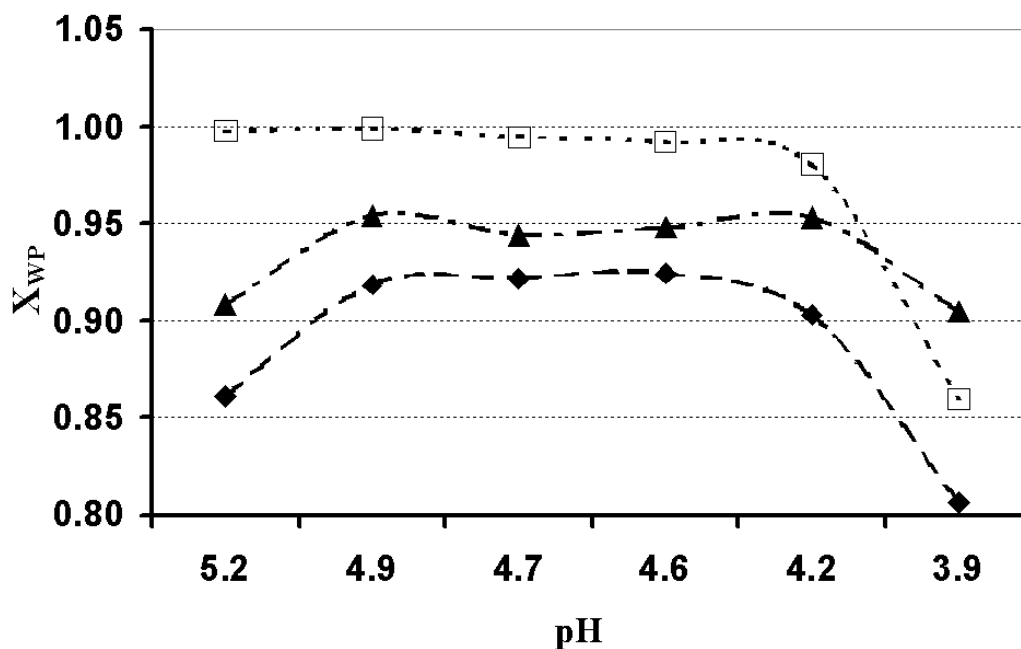


Figure 7: Precipitated fraction of each whey protein in water, calculated in relation to its initial amount. Whey protein fractions: \blacklozenge β -Lg, \blacktriangle α -La, and \square BSA.

The occurrence of minimal solubility near the iso-electric point is due primarily to the lack of electrostatic repulsion, which promotes aggregation and precipitation via hydrophobic interactions. In addition, more protein is dissociated at pH values lower than 4.0, due to the predominance of repulsive electrostatic charge. Under both conditions, dissociated WP from the gel network would be available to interact with water by hydrogen bonding, leading to the higher values of WHC at pH 5.2 and below 4.0.

3.4. PAGE of buffer soluble protein fractions

Figure 8 shows the PAGE patterns for soluble WP proteins extracted by the different pH 8.0 buffers, (B) and (BM). Figure 8 (A and C) are SDS-PAGE under non-reducing conditions and Figure 8 (B and D) are SDS-PAGE under reducing conditions.

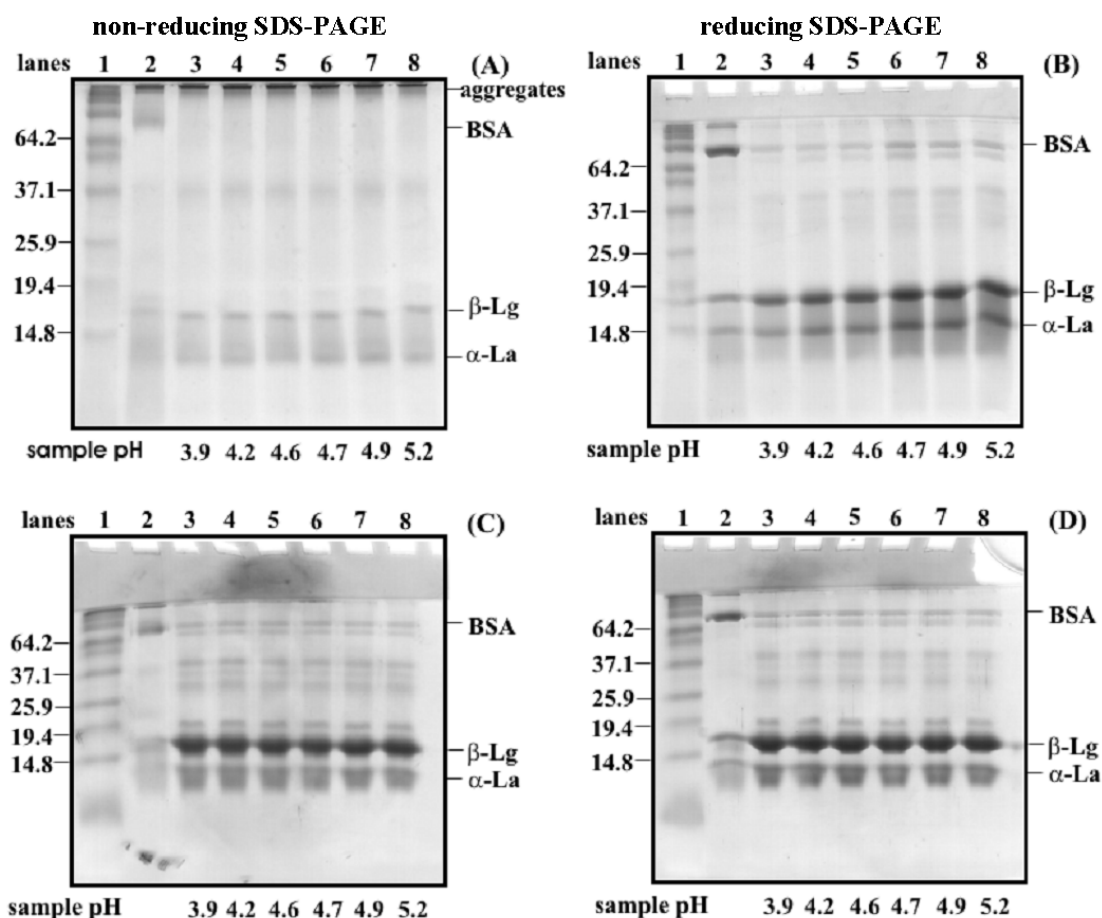


Figure 8: SDS-PAGE under non-reducing (A and C) and reducing (B and D) conditions for the soluble WP protein aggregates extracted in different pH 8.0 buffers. Extraction solutions: (Figures A and B) buffer pH 8.0 (B) and (Figures C and D) buffer pH 8.0 plus β -ME (BM). The commercial molecular weight marker was loaded into lane 1 and pure milk proteins into lane 2

Considering the soluble components extracted by buffer (B) and analysed by SDS-PAGE under non-reducing conditions (Figure 8 A), aggregates with molecular mass greater than $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ were visualized at the top of the resolving polyacrylamide gel. Under this condition, weaker bands of β -Lg and α -La were also visualized while BSA bands were not seen at any of the pH values studied. Thus, it was assumed that in buffer (B), large aggregates were separated from the protein matrix in the gel, and were probably

linked to each other mainly by electrostatic interactions, confirming the protein solubility results. However, under reducing conditions (Figure 8 B), the main WP bands were clearly marked, especially β -Lg and α -La. Therefore the large aggregates observed in Figure 8 A were probably maintained internally by S-S bonds formed between their WP constituents during the first heating step before gelation. The PAGE results were more accurate at determining the S-S bonds than the solubility experiments, and this difference between the methods could be related to the amount of electrostatic interaction in relation to the S-S bonding, showing that the combination of the two methods used was essential for an adequate analysis of the system interactions. This assumption was confirmed by the electrophoretic patterns obtained for the supernatants of the extracts obtained with (BM) under reducing and non-reducing conditions. Figure 8 (C and D) show that the main WP constituents were able to migrate in the resolving gel. Under both conditions intense bands for β -Lg and less intense bands for α -La were visualized, while weaker bands for BSA were observed. Such a result confirms the role of the S-S bonds in the stabilization of the WP aggregates, as observed in Figure 8 (A and B). The PAGE results for the (BUM) extracts were similar to those of the (BM) supernatants and were not shown.

3.5. Mechanical properties of the gels at equilibrium pH

The mechanical properties are shown in Figure 9.

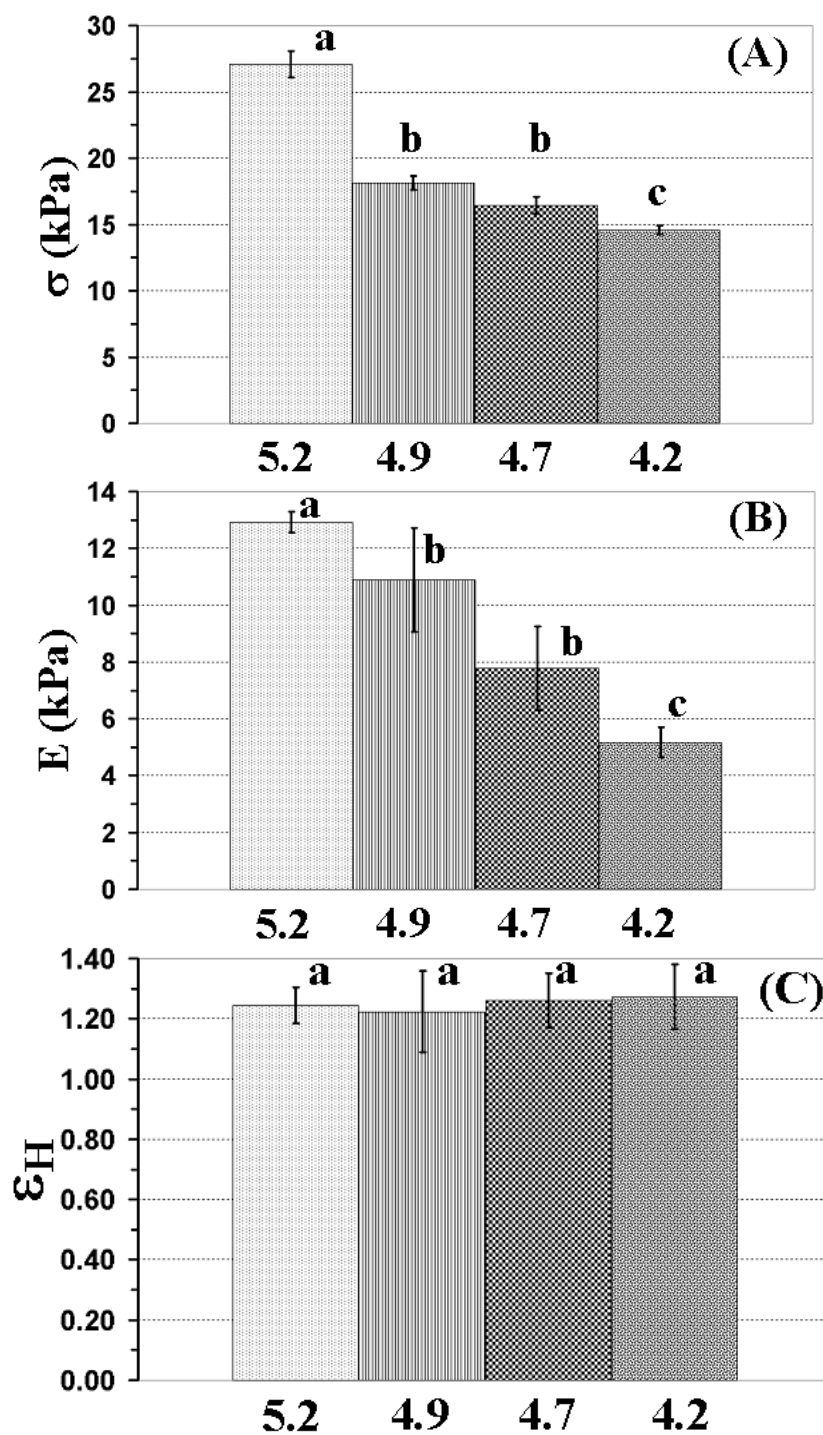


Figure 9: Mechanical properties of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios. (A) Stress at rupture, (B) elasticity modulus and (C) strain at rupture.

System pH values after 48 h at 10°C: 5.2, 4.9, 4.7 and 4.2. Small letters mean significant differences ($p < 0.05$) among the acidification conditions studied.

The values for stress at rupture (Figure 9 A) and elasticity modulus (Figure 9 B) exhibited a similar trend. At pH 5.2 (pI of β -Lg fraction) the gels showed greater values for stress at rupture and elasticity modulus, while at pH 4.9 and 4.7 (pI range of the BSA fraction) no significant differences were observed. At pH 4.2 (pI of α -La) the lowest values for stress at rupture and elasticity modulus were found. The different acidification conditions and final pH values did not influence the strain at rupture properties of the systems studied (Figure 9 C). This fact suggests that despite the different network strengths of the systems studied, the networks were similar with respect to their deformability properties.

The decreasing profile of stress at rupture and elasticity modulus in the pH range between 5.2 and 4.2 was similar to that observed for solubility and WHC in the same pH range (Figures 1 and 2 respectively). These similar trends suggest that the dissociated β -Lg (Figure 6) plays an important role in gel network stabilization, due to its ability to interact with proteins and aggregates close to its pI. Moreover, β -Lg provides water-holding capacity to the system due to its hydrophilic structure. However, at lower pH values, when the system is moving further away from the pI of the β -Lg, this leads to an increase in repulsive forces amongst the whey proteins and their aggregates weakening the gel structure, but still maintaining good water retention capacity.

4. CONCLUSIONS

Gel solubility in different buffer systems, in the presence or absence of denaturant agents, permitted the qualitative evaluation of the molecular interactions amongst the thermal WP aggregates in the gel network when the final equilibrium pH values were

achieved. Under the conditions studied, the interactions were mainly electrostatic, independent of the final pH, but hydrophobic and hydrogen bonds were present in minor intensity. However, it was observed that at pH 4.2 more hydrophobic interactions were present in relation to other gel final pHs, in spite of β -Lg and BSA becoming far from its pI. Complementary electrophoresis analyses of the soluble protein in each buffer system were important for further evaluation. It was verified that disulphide bonds were present on a minor scale, and were probably associated with internal stabilization of WP aggregates (formed in the first heating step), that interacted with each other by electrostatic, hydrophobic and also by hydrogen bonds in the gel network. A correlation was observed between the water holding capacity and protein water solubility of the gels. Such a correlation was attributed to which was more soluble in the pH range near the pI. In contrast, the α -La and BSA fractions were less soluble at their pI. The mechanical properties of the gels were influenced by the final system pH, especially at pH 5.2 and 4.2. The results suggested that although the interactions amongst the aggregates in the gel network were essentially the same at the pH values evaluated, the dissociated β -Lg within the protein network played an important role in gel stabilization, strengthening the structure at its pI and at the same time, providing good water retention capacity.

Acknowledgements: This research was supported by FAPESP (04108517-3) and CNPq (140506/2003-9) (Brazil) and by Arla Food Ingredients.

REFERENCES

- [1] Alting A.C., de Jongh H.H.J., Visschers R.W., Simons J., Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4682-4689.
- [2] Alting A.C., Hamer R.J., de Kruif C.G., Paques M., Visschers R.W., Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels, *Food Hydrocolloids.* 17 (2003) 469-479.
- [3] AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists, Patricia Cunniff, Gaithersburg, USA, 1997.
- [4] Barbut S., Determining water and fat holding, in: Hall G.M. (Ed.), *Methods of testing protein functionality*, Chapman & Hall, London, 1996, pp. 187-225.
- [5] Bramaud C., Aimar P., Daufin G., Thermal Isoelectric Precipitation of Alpha-Lactalbumin from a Whey-Protein Concentrate - Influence of Protein-Calcium Complexation, *Biotechnol. Bioeng.* 47 (1995) 121-130.
- [6] Bramaud C., Aimar P., Daufin G., Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of alpha-lactalbumin under gentle heat treatment, *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 391-397.
- [7] Bryant C.M., McClements D.J., Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey, *Trends Food Sci. Technol.* 9 (1998) 143-151.
- [8] Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D., Aminoacidos, peptidos y proteínas, in: Fennema O.R. (Ed.), *Química de los alimentos*, Editorial Acribia, Zaragoza, 1996, pp. 275-414.

- [9] Copeland R.A., Electrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity, in: Copeland R.A. (Ed.), *Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols*, Chapman & Hall, New York, USA, 1990, pp. 59-98.
- [10] Gezimati J., Creamer L.K., Singh H., Heat-induced interactions and gelation of mixtures of bovine β -lactoglobulin and serum albumin, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 804-810.
- [11] Gezimati J., Creamer L.K., Singh H., Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β -lactoglobulin and α -lactalbumin, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1130-1136.
- [12] Gezimati J., Singh H., Creamer L.K., Aggregation and gelation of bovine beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and serum albumin, in: *ACS Symposium Series* (Ed.), *Macromolecular Interactions in Food Technology*, Amer. Chemical Soc, Washington, 1996, pp. 113-123.
- [13] Havea P., Carr A.J., Creamer L.K., The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels, *J. Dairy Res.* 71 (2004) 330-339.
- [14] Havea P., Singh H., Creamer L.K., Formation of new protein structures in heated mixtures of BSA and α -lactalbumin., *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1548-1556.
- [15] Havea P., Singh H., Creamer L.K., Characterization of heat-induced aggregates of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment, *J. Dairy Res.* 68 (2001) 483-497.

- [16] Havea P., Singh H., Creamer L.K., Heat-induced aggregation of whey proteins: Comparison of cheese WPC with acid WPC and relevance of mineral composition, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4674-4681.
- [17] Hodge J.R., Hofreiter B.T., Determination of reducing sugar and carbohydrates: Phenol sulfuric test, in: Whistler R.L., Wolfrom M.L. (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, USA, 1962, pp. 380-394.
- [18] Hong Y.H., Creamer L.K., Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 345-359.
- [19] Ju Z.Y., Kilara A., Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3604-3608.
- [20] Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4, *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- [21] Livney Y.D., Corredig M., Dalgleish D.G., Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 359-364.
- [22] Lupano C.E., Effect of Heat-Treatments in Very Acidic Conditions on Whey-Protein Isolate Properties, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 2191-2198.
- [23] Lupano C.E., Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions, *Food Res. Int.* 33 (2000) 691-696.
- [24] Lupano C.E., Dumay E., Cheftel J.C., Gelling Properties of Whey-Protein Isolate - Influence of Calcium Removal by Dialysis or Diafiltration at Acid or Neutral Ph, *Int. J. Food Sci. Technol.* 27 (1992) 615-628.

- [25] Lupano C.E., Renzi L.A., Romera V., Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: Effect of pH, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3010-3014.
- [26] Morr C.V., Ha E.Y.W., Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33 (1993) 431-476.
- [27] Puppo M.C., Lupano C.E., Anon M.C., Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions - effect of pH and protein-concentration, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2356-2361.
- [28] Schokker E.P., Singh H., Creamer L.K., Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin, *Int. Dairy J.* 10 (2000) 843-853.
- [29] Shimada K., Cheftel J.C., Texture Characteristics, Protein Solubility, and Sulfhydryl-Group Disulfide Bond Contents of Heat-Induced Gels of Whey-Protein Isolate, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 1018-1025.
- [30] Steffe J.F., *Rheological methods in food process engineering*, Freeman Press, East Lansing, USA, 1996.
- [31] Vardhanabhuti B., Foegeding A., Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3649-3655.
- [32] Verheul M., Roefs S., de Kruif K.G., Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 896-903.
- [33] Vojdani J., Solubility, in: Hall G.M. (Ed.), *Methods of testing protein functionality*, Chapman & Hall, London, 1996, pp. 11-55.

CHAPTER 4

The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins

Ângelo Luiz Fazani Cavallieri; Rosiane Lopes da Cunha

Food Hydrocolloids (in press – available at
<http://www.elsevier.com/locate/foodhyd>)

The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins

Angelo Luiz Fazani Cavallieri; Rosiane Lopes da Cunha*

Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, 13083-862 – Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55-19-37884047; fax: +55-19-37884027;

e-mail: rosiane@fea.unicamp.br

Abstract

The gelation behaviour of 7% whey protein isolate (WPI) solutions under cold set conditions was studied. Gels were formed at 10°C after the addition of different amounts of glucono- δ -lactone (GDL) to thermally denatured (80°C/30 minutes) WPI solutions, leading to different acidification rates and final pH values. The rheological properties of the systems were analysed under shear at incipient gelation and under uniaxial compression throughout the entire gelation process until reaching the equilibrium conditions of pH and mechanical properties. Different rheological techniques allowed for the distinction of two stages involved in the gelation process: the initial setting up of the gel network up to the gel point and the subsequent structure development through bond strengthening and/or local rearrangements. The acidification rate did not affect the rheological properties at the beginning of gelation, but the acidification conditions had a significant effect on the strengthening of the protein network after the gel point. An evaluation of the mechanical properties at specific pH values during gelation and under the equilibrium conditions permitted a qualitative distinction amongst the effects of the acidification rate, pH and

structural organization on the gel properties. WPI cold set gelation induced by GDL hydrolysis showed a strong influence of the pH during acidification if low acidification rates were used, and when the final pH was achieved the properties remained stable. However, when the rate of acidification increased by adding larger amounts of GDL to the system, the effect of molecular rearrangements at the final pH was fundamental to network strengthening.

Keywords: Whey proteins, glucono-delta-lactone, cold gelation, mechanical properties, interactions.

1 Introduction

Whey proteins (WP) are widely used as ingredients in the food industry because of their excellent functional and nutritional properties. Whey proteins are globular proteins with molecular weights ranging from 14 to 1000 kDa. WP are composed of 60% β -lactoglobulin (β -Lg), 22% α -lactoalbumin, (α -La), 5.5% bovine serum albumin (BSA) and 9% immunoglobulins (Ig). The isoelectric points of these proteins are 5.2 for β -Lg, from 4.2 to 4.5 for α -La, from 4.7 to 4.9 for BSA and between 5.5 and 6.8 for Ig (Bryant & McClements, 1998, Morr & Ha, 1993).

Heat induced aggregation of whey proteins occurs at temperatures above 70°C, leading to an improvement in viscosity or gel formation (Livney, Corredig & Dalgleish, 2003). This process has been extensively studied and the mechanism of the interactions occurring between the WP fractions on heating has been well established (Hong & Creamer, 2002, Verheul, Roefs & de Kruif, 1998). The combined control of WP heat denaturation and the solvent quality can lead to a gelling process called “cold gelation”

(Bryant et al., 1998). Such a process consists of two consecutive steps. In the first step the solution of proteins is heated at neutral pH, low ionic strength and a protein concentration lower than the minimum required for gelation, leading to a loss of their native structure with partial unfolding and subsequent aggregation. Despite this aggregation, the proteins remain soluble after cooling and do not gel, due to predominant electrostatic repulsive forces amongst the aggregates formed. In the second step, changes in solvent quality induce gelation. The structure and properties of cold-set WP gels depend on the gelation kinetics, type of induction (salt or acidic) and the properties of the protein aggregates formed in the first heating step, as a consequence of the temperature and heating time (Ju & Kilara, 1998a).

Altering the solution pH in the direction of the isoelectric point (pI) of the proteins, leads to cold-set gelation by the reduction of electrostatic repulsion between the protein aggregates. Acid-induced gelation of thermal WP aggregates due to the addition of glucono- δ -lactone (GDL) to the system has been widely studied in recent years. In water, GDL slowly hydrolyses to gluconic acid with a resulting reduction in pH. This process is extremely dependent on the environmental temperature and protein concentration. The convenience of using GDL in protein acidification studies is attributed to the easy control of the acidification rate and the equilibrium pH, since both are a function of the amount of GDL added to the system (De Kruif, 1997).

The addition of large amounts of GDL to the system causes rapid acidification, and consequently a fast decrease in pH, which could reach values below the pI, resulting in weaker and brittle gels (Alting, Hamer, de Kruif & Visschers, 2000, Ju & Kilara, 1998b). In

contrast, gels formed near the pI or kept near this pH for longer times, show increased aggregate size and tend to be stronger and more deformable (Alting, Hamer, De Kruif, Paques & Visschers, 2003a). This increased exposure time under conditions in which repulsive electrostatic interactions are minimal (pI), intensifies the contact of free thiol groups at the surface of the aggregates, increasing the rate of disulphide bond formation between the aggregates and hence strengthening the gels (Alting et al., 2000, Alting, de Jongh, Visschers & Simons, 2002, Alting et al., 2003a).

A knowledge of the rheological properties of the protein gels can allow for comprehension of the cold gelation mechanism, which could lead to the development of new applications for WP as an industrial ingredient (Alting et al., 2003a, Alting, Hamer, De Kruif & Visschers, 2003b). Oscillatory rheology is a method widely used for studying the viscoelastic behaviour of food systems. The parameters measured in this test are very sensitive to the chemical composition and physical structure, so they are very useful in monitoring gel structure formation and the strengthening process. However, most applied functional properties of food gels are more closely related to large deformation and fracture properties than to small-deformation characteristics (Foegeding, Brown, Drake & Daubert, 2003). In addition, certain sensory texture attributes of foods are significantly correlated with fracture properties, suggesting that a fundamental understanding of food texture can be obtained by investigating the mechanisms responsible for fracture behaviour (Ikeda & Foegeding, 1999).

In this study our objective was to distinguish the magnitude of the simultaneous effects of the acidification rate, the final pH and ageing time occurring during the acidic

gelation of whey protein isolate subjected to cold set gelation conditions. Thus, different amounts of glucono- δ -lactone were added to thermally denatured whey protein isolate solutions. The rheological properties under shear and compression were measured during gelation until the equilibrium conditions of pH and mechanical properties were reached.

2 Material and methods

2.1 Materials and chemicals

The whey protein isolate (WPI) Lactoprodan was kindly donated by ARLA FOODS INGREDIENTS (Denmark). According to SDS-PAGE experiments (Laemmli, 1970), this WPI was comprised mainly of β -Lg (52%), α -La (18%) and BSA (6%) as determined by densitometry. The protein concentration of the powder was 92.4% and the lactose content 0.6%, as determined by the Kjeldahl procedure ($N \times 6.38$) (AOAC, 1996) and phenol sulphuric method (Hodge & Hofreiter, 1962), respectively. The total solids content was 94.3% (5.7% moisture wet basis). The ions content of the WPI was determined by atomic absorption spectroscopy, showing the following composition (% w/w): 0.05 Ca^{2+} , 0.63 Na^{+} and 0.65 K^{+} . The ester GDL was purchased from Sigma Aldrich Corporation (St Louis-USA).

2.2 Gel preparation

7% (w/w) WPI solutions were prepared by dissolution of the powder in deionised distilled water and stirring with a magnetic stirrer for 90 minutes at room temperature. During this period the pH was kept at 6.7. These solutions were then subjected to heat treatment at 80°C for 30 minutes in a stainless steel jacketed vessel with mechanical

agitation. PAGE experiments (Laemmli, 1970) were performed on samples removed after this heating step, in order to evaluate the extent of thermal denaturation of the WP and the results indicated the formation of protein aggregates with molecular mass greater than 200kDa (Cavallieri, Costa-Netto, Menossi & Cunha, 2004). After the heat treatment, the solutions were rapidly cooled to 10°C in an ice bath. GDL powder was then added to the cooled solutions and gently stirred for 1 minute. Immediately after the GDL addition, an aliquot of each sample was poured into a rheometer cup and the other part placed into small cylindrical plastic tubes (20 mm internal diameter and 25mm height), which were stored at 10°C. The rheological properties of the former were monitored at 10°C by oscillatory shear measurements up to the gel point, and the later were used for uniaxial compression tests (mechanical properties) for up to 5 days after the addition of GDL. The lowering of the pH caused by GDL hydrolysis was measured using a Sentron 2001 pH meter (Sentron Inc., Gig Harbor/Washington, USA) equipped with an electrode calibrated at the reaction temperature over the pH range from 7.0 to 4.0.

The GDL concentration used to prepare the systems depended on the protein concentration and on the desired final pH, and was expressed as the GDL/WPI (%w/w) ratio. To evaluate the gelation kinetics under shear, four solutions were prepared with GDL/WPI ratios corresponding to 0.084, 0.186, 0.350 and 0.764, resulting in different acidification rates. The higher acidification rate applied in oscillatory experiments was used in order to better visualize the effects of acidification rates. The uniaxial compression tests were performed using GDL/WPI ratios corresponding to 0.084, 0.115, 0.135 and 0.220, which resulted in different acidification rates and pH values of 5.1, 4.9, 4.7 and 4.2

respectively, after 48 hours of storage at 10°C. After addition of GDL to the WPI solutions the samples were continuously removed from the plastic tubes until a gel that maintained its form was achieved, permitting the uniaxial compression measurements. At this moment it was done the readings of t_{ss} and pH_{ss} , which were considered as the time and pH of the first self supported gel observed.

2.3 Rheological properties

2.3.1 Small amplitude oscillatory rheology

Gel formation was monitored in triplicate under isothermal conditions (10°C) by oscillatory measurements using a controlled stress rheometer (Carri-Med CSL² 500, TA Instruments, New Castle, USA). A double walled concentric cylinder consisting of an inner rotating acrylic cylinder (inner radius = 20.38 mm, outer radius = 21.96 mm) and an outer fixed stainless steel cup (inner radius = 20 mm, outer radius = 22.38 mm) was used for the measurements. Time sweeps were conducted at an oscillation frequency of 0.1 Hz and oscillatory stress of 0.1 Pa until the data acquisition was outside the linear viscoelastic domain, which was observed from an analysis of the Lissajous figures. This occurred at 0.46, 0.21, 0.06 and 0.03 hours from the gel point for GDL/WPI ratios of 0.084, 0.186, 0.35 and 0.764, respectively. The gel point was considered as the time when the G' and G'' crossover (t_g) occurred, since most studies of milk protein gelation have adopted this criterion (Curcio, Gabriele, Giordano, Calabro, de Cindio, & Iorio, 2001) or similar ones (Horne, 2003, Lucey, Van Vliet, Grolle, Geurts & Walstra, 1997).

2.3.2 Mechanical properties

Uniaxial compression experiments were carried out using a TA-XTIII Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Godalming, UK) equipped with a lubricated acrylic cylindrical plate (40 mm diameter). Just before the measurements, the gels were gently removed from the cylindrical plastic tubes and the mechanical properties of each gel determined. All measurements were done in triplicate at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ and performed throughout the gelation process for up to 5 days. Gels were compressed to 80% of their original height using a crosshead speed of 1 mm/s. The force and height values were transformed into Hencky stress (σ_H)–Hencky strain (ϵ_H) curves (Steffe, 1996). The rupture properties (stress and strain) were obtained from the maximum point of the stress–strain curve, while the Young’s modulus was the slope of the initial linear region of this curve.

The non-linear least square regression method was used to fit the raw mechanical properties data as a function of acidification time (equation 1) or pH lowering during acidification (equation 2). The pH lowering data were also fitted as a function of acidification time using equation 1.

$$X = X_{ss} + C \exp(-k t) \quad (1) \quad X = C \exp(-k \text{ pH}) \quad (2)$$

where X is the property measured, X_{ss} is the steady-state value, k is the process rate, t is the time after GDL addition, pH is the pH value during acidification and C is a fitting parameter. Equilibrium values (pH or stress at rupture) were considered as the steady properties obtained from the equation (1) first derivative in relation to time near to zero ($<$

0.001 pH/H or kPa/H). The first point that was observed the steady state of pH or rupture stress was taken as the time necessary for the gel to reach the equilibrium properties.

2.4 Statistical analysis

Results reported from small amplitude rheology represent the mean of 3 repetitions of each treatment. Values reported for mechanical properties (stress at rupture, elasticity modulus and strain at rupture) represent the mean of three replications obtained for at least 2 repetitions of each treatment (acidification conditions), and the error bars represent standard deviation. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and significant differences ($p < 0.05$) between treatments were determined by Tukey procedure. Statistical analysis were performed using software STATISTICA 5.5 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

3 Results

3.1 pH Kinetics.

Figure 1 shows the changes in pH as a function of acidification time for 7% whey protein solutions acidified with GDL. GDL hydrolysis to gluconic acid resulted in a rapid pH reduction during the first 8.3 hours, after which the pH decreased steadily. Increasing amounts of GDL in the solution led to increasing rates of pH lowering (k_{pH}), and lower final gel pH values (pH_{eq}) after 5 days of acidification at 10°C (Table 1). The system acidified with a GDL/WPI ratio of 0.084 reached final pH values of 5.1 (pI of β -Lg fraction of WP) in 29 hours, while the higher acidification condition showed pH_{eq} values of 4.2 (pI of α -La fraction of WP) before 22 hours. Moreover, the steady state pH values were achieved in 26 and 24 hours for 0.115 and 0.135 GDL/WPI ratio, respectively.

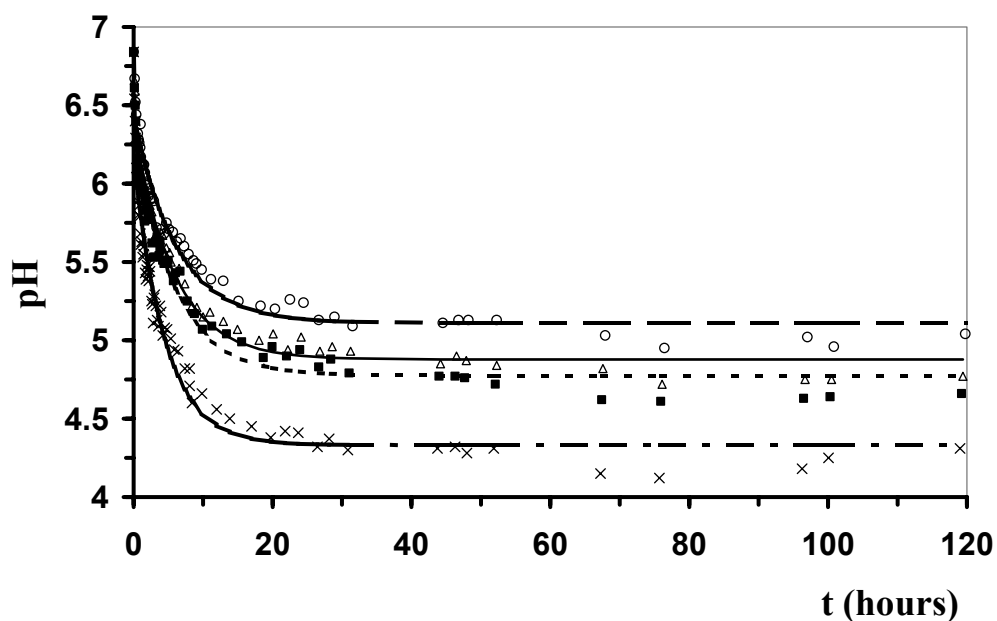


Figure 1. Changes in the pH of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios: 0.084 (\circ , - - -), 0.115 (\triangle , ———), 0.135 (\blacksquare , - . - .) and 0.220 (\times , - - - -). The lines represent the model best fitted to the experimental data.

Table 1: Fitting parameters for the pH kinetics

GDL/WPI ratio (%w/w)	pH kinetics		
	pH_{eq}	$k_{\text{pH}} \times (10^{-3})$ (min^{-1})	R^2
0.084	5.1	2.69	0.96
0.115	4.9	2.86	0.97
0.135	4.7	2.88	0.97
0.220	4.2	3.72	0.90

The data was fitted to a first order kinetics equation (De Kruif, 1997), showing a satisfactory determination coefficient (R^2). Although this model considered an equilibrium value as a function of time (pH_{eq}), the results indicated that after 48 hours there was a slight

decrease in pH. This means that the GDL hydrolysis reached a pseudo-equilibrium situation expressed by the pH_{eq} values, but nevertheless it seems that the reaction continued at a low rate or some other event took place, resulting in a further lowering of the pH between 2 and 5 days after the addition of the GDL.

3.2 Gelation Kinetics: Measurements up to the gel point (t_g).

The gelation process was studied using oscillatory rheological measurements for GDL/WPI ratios of 0.084, 0.186, 0.350, and 0.764, which resulted in different acidification rates. The pH was also monitored during acid gelation and a turbid gel formation was observed together with the gradual lowering of the pH.

The variation in the complex shear modulus (G^*) was plotted against t/t_g , shifting the data along the horizontal axis to eliminate the effect of the GDL hydrolysis kinetics (Figure 2). The presentation of G^* as a function of the reduced time (t/t_g) allowed the visualization of structure differences among the acidification conditions at the beginning of the aggregation process.

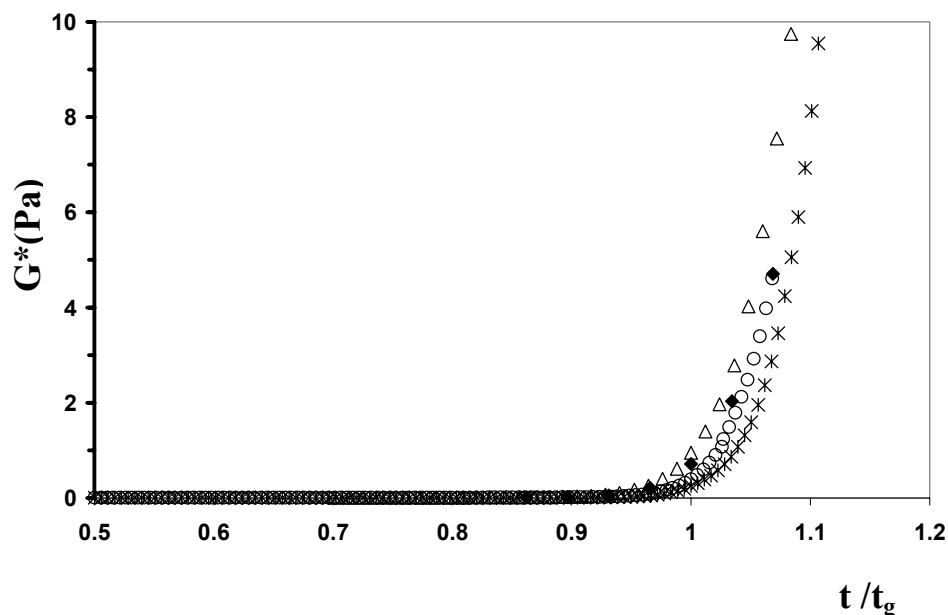


Figure 2. Time dependence of the complex modulus G^* (at 0.1 Hz) for 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios: 0.084 \circ , 0.35 \triangle , 0.186 \times and 0.764 \blacklozenge .

The data for t_g with the corresponding pH, G^* and $dG^*/d(t/t_g)$ are shown in Table 2. The rate of increase in G^* relative to the reduced time (t/t_g) was determined as the $dG^*/d(t/t_g)$ and higher values were observed at higher acidification rates (Table 2), which could lead to lower gelation times. Indeed it can be observed that increasing the GDL/WPI ratio from 0.084 to 0.764 resulted in a significant decrease in gelation time, from 6.1 hours to 0.2 hours (Table 2). It could be attributed to the increase in the rate of pH modification since greater values of dpH/dt were observed for 0.764 GDL/WPI ratio at t_g . However, no significant differences were observed in G^* and the corresponding pH at this point for any of the GDL/WPI ratios studied. Such results indicated that the gel network was similar at the incipient gelation point despite the fact that a higher acidification rate decreased the gelation time. At the start of gelation (t_g), the increase in G^* probably reflected the

increased contact between the whey protein aggregates formed in the heating step mediated by aggregate fusion, and subsequent rearrangements of large clusters that can occur even before gel formation, as observed elsewhere for casein rennet induced gels (Mellema, Walstra, van Opheusden & van Vliet, 2002).

Table 2: Gel point (t_g), corresponding pH, complex modulus (G^*) and its derivative ($dG^*/d(t/t_g)$) for the WPI systems as a function of the different GDL/WPI ratios. $|dpH/dt|$ at t_g means the pH first derivative in relation to acidification time around t_g , t_{ss} and pH_{ss} are the time and corresponding pH of the first self-supported gel observed. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between results in the same column.

GDL/WPI ratio	$\left. \frac{dpH}{dt} \right _{t=t_g}$ (pH/H)	t_g (hours)	pH at t_g	G^* at t_g (Pa)	$\left(\frac{dpH}{d(t/t_g)} \right)_{t=t_g}$ (Pa)	t_{ss} (hours)	pH_{ss}
0.084	0.05±0.008 (a)	6.1±0.2 (a)	5.8 (a)	0.40±0.01 (a)	19.71±1.59 (a)	6.2	5.63
0.135		-	-	-	-	3.0	5.53
0.186	0.19±0.017 (b)	1.6±0.2 (b)	5.8 (a)	0.44±0.26 (a)	15.03±7.13 (a)	-	-
0.220		-	-	-	-	1.7	5.43
0.35	0.62±0.152 (c)	0.6±0.0 (c)	5.7 (a)	0.99±0.06 (a)	48.99±2.02 (b)	-	-
0.764	1.90±0.095 (d)	0.2±0.0 (d)	5.6 (a)	0.86±0.20 (a)	70.86±10.03 (b)	-	-

3.3 Gelation kinetics from gel point to final pH value.

The mechanical properties under uniaxial compression (Figure 3 and 4) were evaluated from the first self-supported gel (the requirement for uniaxial compression tests) up to 5 days after GDL addition. GDL/WPI ratios of 0.084, 0.115, 0.135 and 0.220 were chosen since such acidification conditions led to final pH values of 5.1, 4.9, 4.7 and 4.2,

respectively, corresponding to values near the isoelectric point of the main WP. The time (t_{ss}) and corresponding pH (pH_{ss}) of the first self-supported gel observed are presented in Table 2.

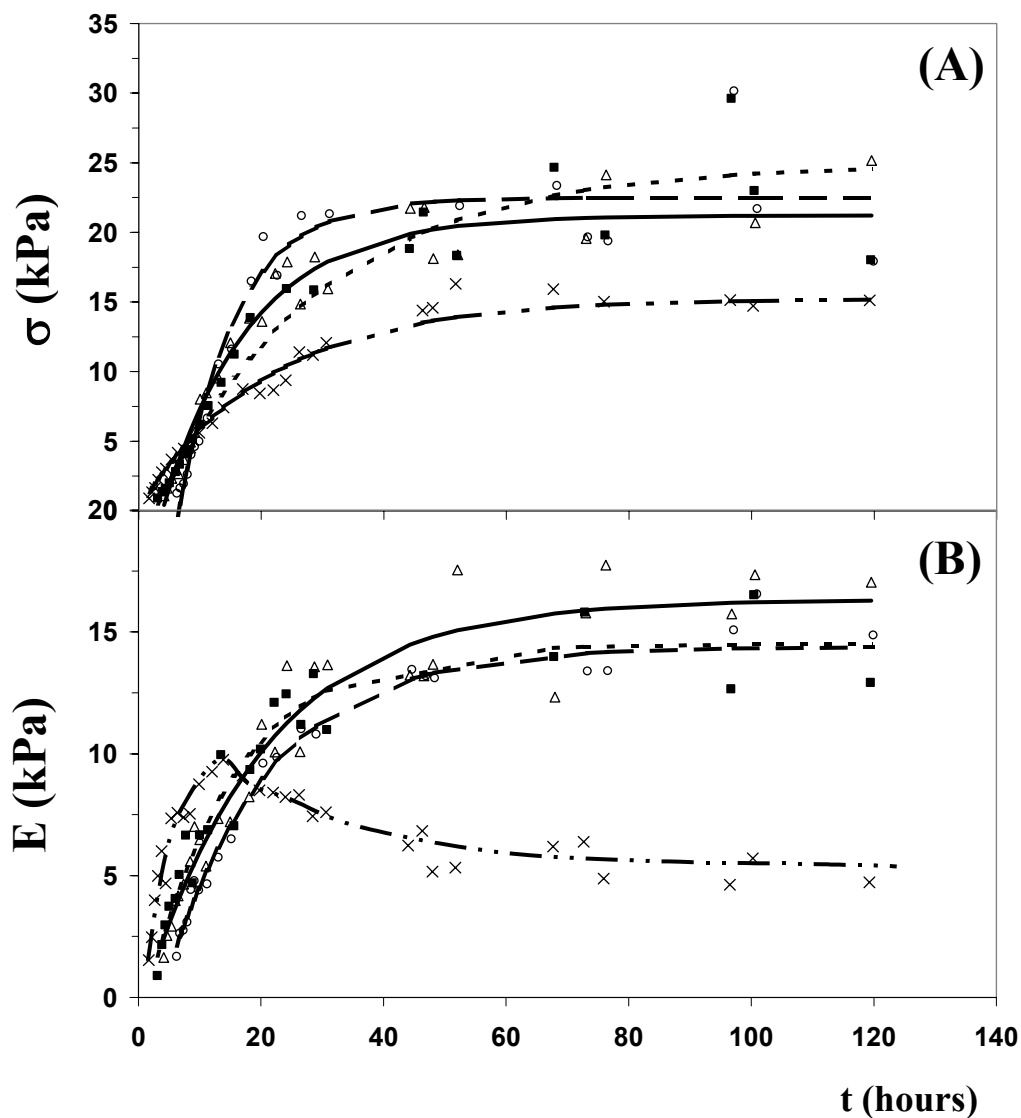


Figure 3. Stress at rupture (A) and elasticity modulus (B) of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with the following different GDL/WPI ratios: (\circ , - - -) 0.084, (\triangle , —) 0.115, (\blacksquare , - - - ·) 0.135 and (\times , - · - -) 0.220. The lines represent the model best fitted to the experimental data, except for 0.220 GDL/WPI ratio in (B).

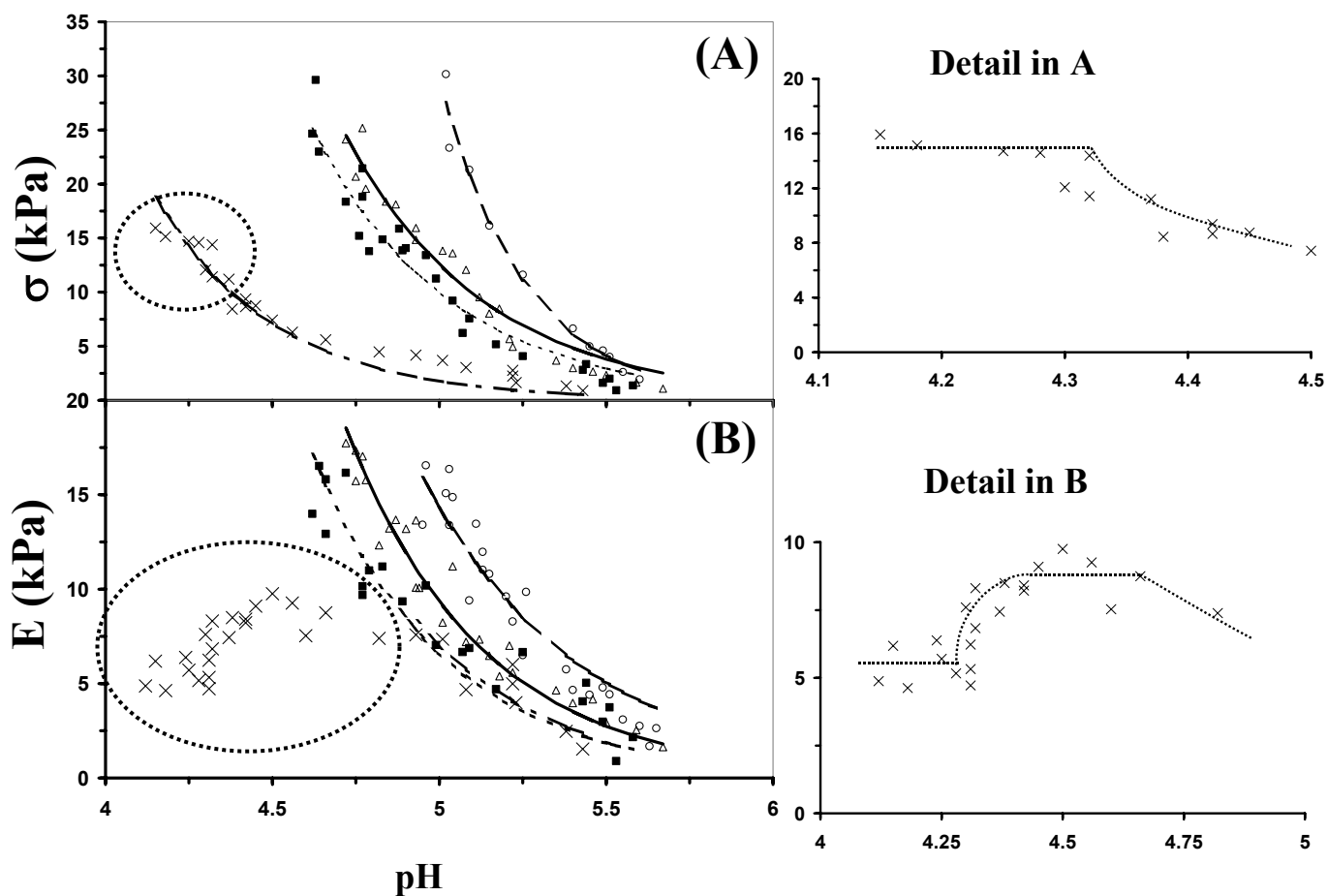


Figure 4. (A) Rupture stress and (B) elasticity modulus of 7% (w/w) heat-denatured WPI solutions with different GDL/WPI ratios as a function of pH lowering. GDL/WPI ratios: (\circ , - - -) 0.084, (\triangle , ———) 0.115, (\blacksquare , - · - ·) 0.135 and (\times , - - - -) 0.220. The lines represent the model best fitted to the experimental data.

Solutions acidified with a GDL/WPI ratio of 0.084 showed the first self-supported gel in 6.21 hours, which was very close to t_g (Table 2). The other GDL/WPI ratios evaluated under compression were different to those used in the shear measurements, but gels with GDL/WPI ratios of 0.186 and 0.220 showed, respectively, t_g and t_{ss} values close to 1.6 hours. Such results indicate that the crossover time is near the time taken to obtain the first self-supported gel. At this point, the system pH was near 5.5 for all acidification rates, similar to that observed for the pH at t_g (Table 2).

The stress at rupture (Figure 3 A) and elasticity modulus (Figure 3 B) values of the gels increased quickly up to approximately 30 hours of acidification and then the properties increased steadily until the systems reached their different steady state properties (σ_{eq} and E_{eq}). In a general way, these mechanical properties showed similar behaviour and values, except for the 0.220 GDL/WPI ratio, which exhibited the lowest values. The large variation observed for stress at rupture and the elasticity modulus around the equilibrium values (obtained from the fitted kinetics equation), can be associated with rearrangements occurring at the final pH rather than with deviations in the measurements. Figure 4 (A and B) shows the increase in rupture stress and elasticity modulus as a function of the lowering of the pH during acidification. In a general way pH lowering led to an exponential increase in stress at rupture and elasticity modulus values (Figure 4 A and B). Lower acidification rates promoted the formation of firmer and harder gels at a fixed pH. It can be observed that gels with a GDL/WPI ratio of 0.084 showed higher values for the mechanical properties up to the achievement of a pH value of 5.1, which corresponded to the final pH for this GDL concentration. Gels produced with GDL/WPI ratios of 0.115 and 0.135 showed a similar

behaviour, but the former showed a strong increase in the mechanical properties between pH 4.7 and 4.9, while for the later this occurred between pH 4.7 and 4.5.

Differently, gels with a GDL/WPI ratio of 0.220 showed an increase in stress at rupture up to pH 4.3 (Figure 4 A) with no further change in this property up to the final pH (see detail in Figure 4 A). With respect to the elasticity modulus, 0.220 GDL/WPI gels showed an even more pronounced difference in behaviour when compared to the other acidification rates (Figure 4 B). An increase in the elasticity modulus was observed up to pH 4.7, this property then remaining almost constant with values of about 7 to 10 kPa until the pH reached a value of 4.5, then decreasing to 5.0 kPa at pH 4.3 and again remaining constant until reaching the final pH (see detail in Figure 4 B). During acidification, the extent of the interactions amongst the exposed hydrophobic groups increases, with their subsequent aggregation near the pI, this being responsible for the network strength (Denis Renard, Fred van de Velde & Visschers, 2006, Totosaus, Montejano, Salazar & Guerrero, 2002) and can be considered as a two-step process. However, the singular behaviour of the mechanical properties as a function of pH, observed for the 0.220 GDL/WPI ratio shows that not only the pH value is relevant for the gel strength properties, but also the acidification rate. The highest acidification rate promoted the formation of weaker gels, which can be attributed to a lack of time to complete this two-step gelation process. The delayed behaviour between the elasticity modulus and stress at rupture (Figures 4 A and B) observed for the highest acidification condition, could be associated with the fact that these parameters were obtained under different deformation conditions, showing that the former would be more adequate to identify small differences amongst the mechanical properties of

the gels. The lowest final stress at rupture was obtained for the system acidified at the highest rate, and this could also be attributed to the fact that under such conditions the final pH value was already rather distant from the main WP pI value, with a consequent increase in the repulsive forces amongst the whey proteins and a weakened network.

The strain results shown in Figure 5 are associated with network deformability up to the rupture point, and these results showed a different trend than that observed for stress at rupture and elasticity modulus.

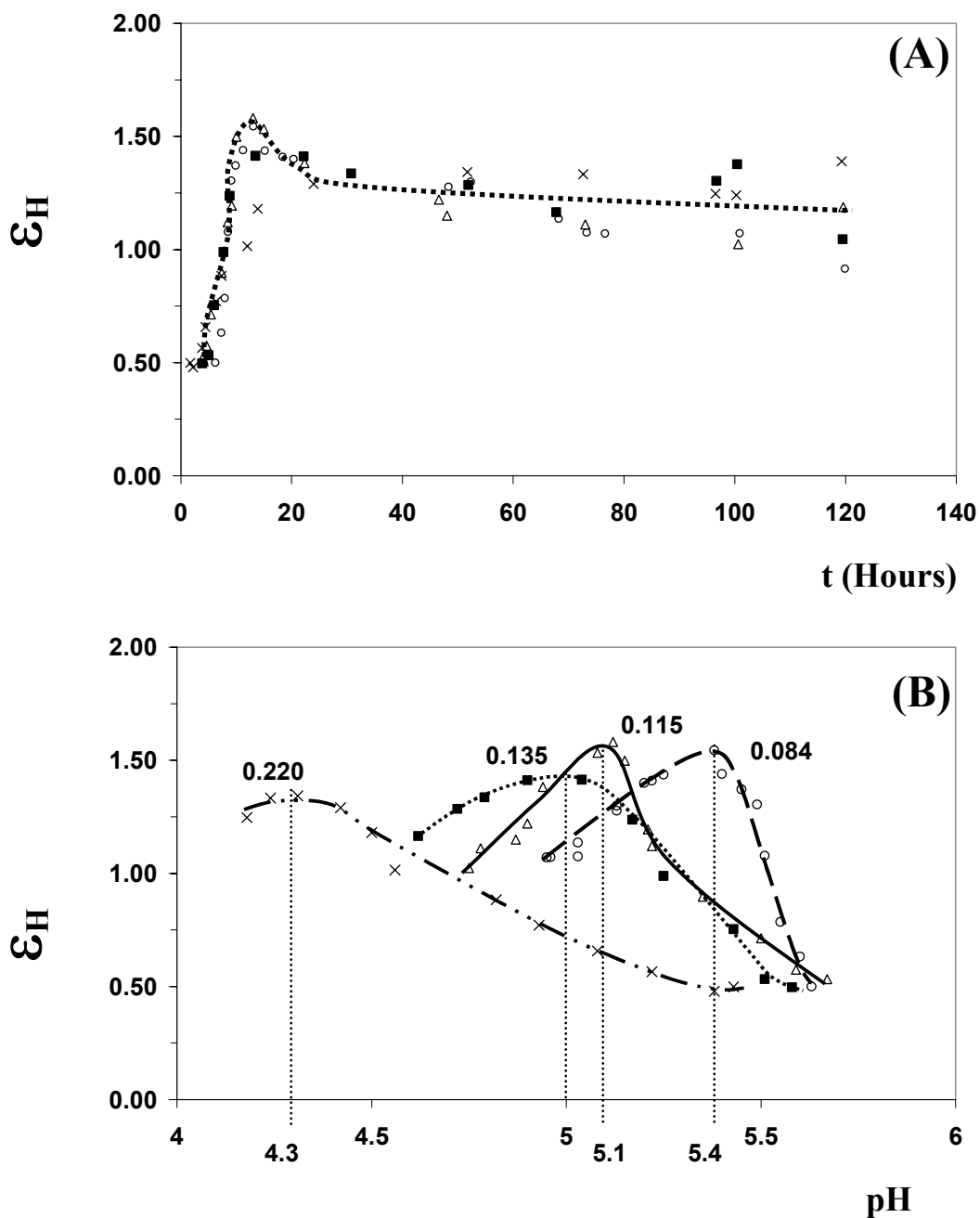


Figure 5: Strain at rupture (ϵ_H) of 7% (w/w) heat-denatured WPI gels as a function of the time of acidification (A) and pH (B), with different GDL/WPI ratios: (\circ) 0.084, (\triangle) 0.115, (\blacksquare) 0.135 and (\times) 0.220.

The strain at fracture for all the systems studied increased up to approximately 16.6 hours of acidification and after that decreased steadily (Figure 5 A). It was also visualized that for gels produced with a GDL/WPI ratio of 0.22, the increase in strain at fracture was less pronounced than for the other acidification rates. Moreover, gels acidified with ratios of 0.084, 0.115 and 0.135 showed similar maximum values for strain at rupture (around 1.4 - 1.5) at pH values of 5.4, 5.1 and 5.0, respectively (Figure 5 B), which was near the β -Lg pI. GDL/WPI ratios of 0.220 showed maximum values for strain at rupture at pH 4.3, coinciding with the beginning of stress at rupture stabilization and decrease in elasticity modulus, as shown in Figure 4. However, since strain at rupture under this condition exhibited a steady increase as a function of the decrease in pH, this suggests an elastic protein structure formation, deformable but softer and weaker. Such a result suggests that network deformability was strongly dependent on the acidification rate, more than on the pH system. Therefore, the different trends exhibited amongst the mechanical properties shows the need for an evaluation of the different mechanical properties, in order to evaluate and understand the interactions associated with network strengthening during acidification.

From these results, it appears that three different simultaneous effects are probably taking place when different GDL amounts are employed in WP cold set gelation: 1 – acidification rate, 2- pH and 3 – ageing time at equilibrium pH. Ageing time could be associated with molecular rearrangements within the structure since gels networks are in a metastable state from a thermodynamic point of view, and consequently the gels are not always static (Denis Renard, et al., 2006). Such ageing phenomena are spontaneous in the sense that they do not result from mechanical disturbance such as shear-induced bond

breaking (Mellema, Walstra, et al., 2002). Ageing commonly involves a gradual coarsening of the structure and a change in firmness (Denis Renard, et al., 2006), which was only observed for the highest GDL/WPI ratio.

A comparative analysis of stress at rupture and the elasticity modulus values at different points of the gelation kinetics was performed, in order to separate these three effects (Figures 6 and 7). Comparing the stress at rupture or elasticity modulus under different acidification conditions, but at specific pH values, it was possible to evaluate the effects of the acidification rate and pH (Figure 6). Four pH values near the isoelectric point of the main WP fractions were chosen to make such comparisons (5.2 to 4.7). The properties at pH 4.2 were also evaluated for a GDL/WPI ratio of 0.220.

In general, the reduction in pH led to an increase in stress under each acidification rate condition (Figure 6 A). For GDL/WPI ratios of 0.084 and 0.115, a decrease in pH from 5.2 to 5.0 led to an approximately two or three times increase in the stress at rupture values, respectively, and a similar result was observed for the 0.135 GDL/WPI condition with a pH decrease from 5.2 to 4.9. Under this latter acidification condition, a further decrease in pH did not cause any significant increase in the stress at rupture values. For the GDL/WPI ratio of 0.220, the pH decrease from 5.2 to 4.7 did not cause any important increase in the stress at rupture values, but at pH 4.2 this property was significantly higher than at the other pH values. The effect of pH (for each acidification condition) on elasticity modulus showed a similar trend to that observed for stress at rupture, but with less pronounced differences between neighbouring pHs (Figure 6 B).

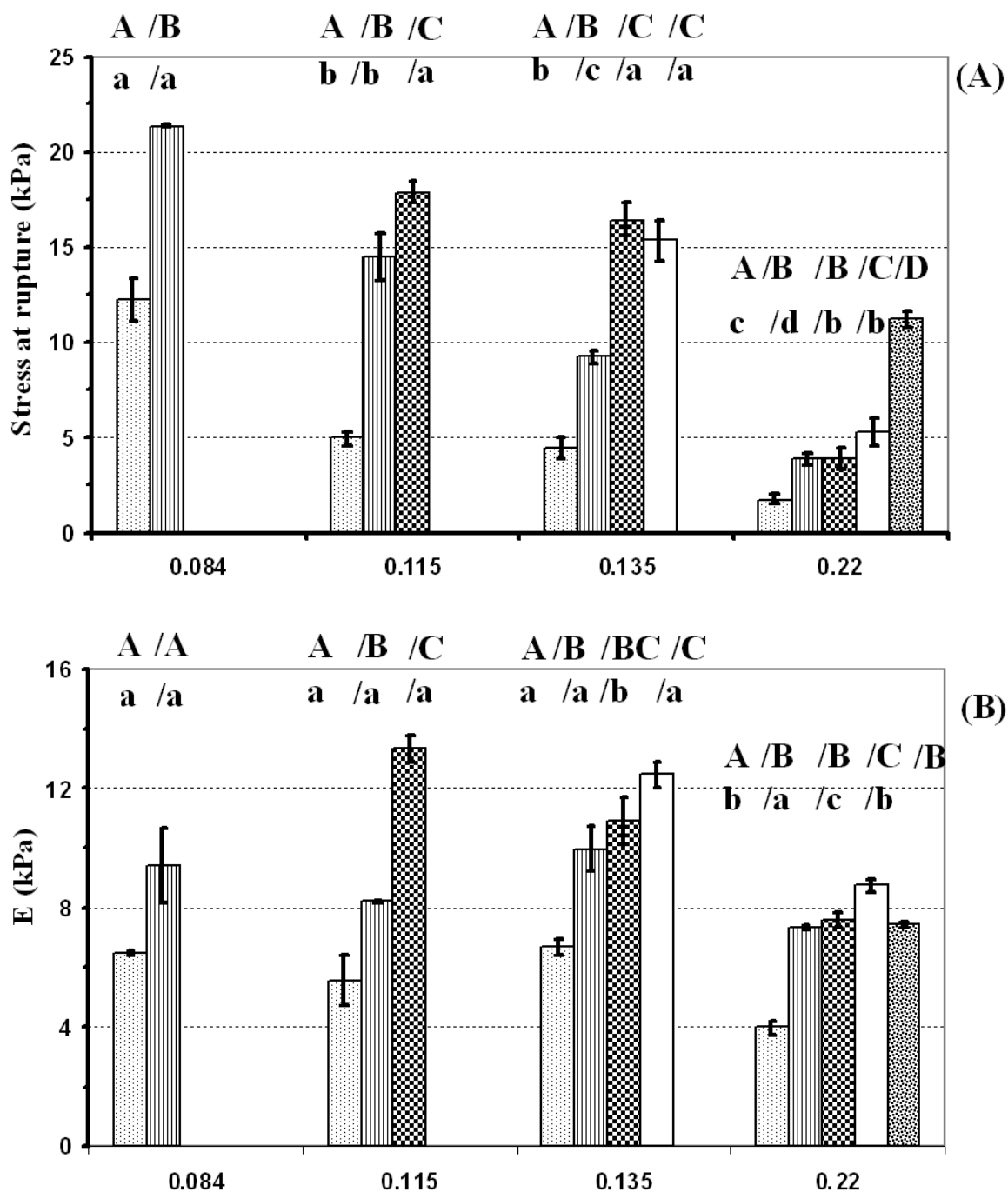


Figure 6. (A) Stress at rupture and (B) elasticity modulus obtained at the same pH but with different acidification rates. pH values: \square 5.2, \square 5.0, \square 4.9, \square 4.7 and \square 4.2. Small letters mean significant differences (σ_{rup} or E) ($p < 0.05$) amongst the acidification conditions studied at each pH while capital letters mean significant differences (σ_{rup} or E) ($p < 0.05$) amongst the pH values under each acidification condition.

Comparing each acidification rate at the same pH value, we can observe that with GDL/WPI ratios of 0.084, the gels were significantly harder than for the other acidification conditions. In contrast 0.220 GDL/WPI gels were significantly softer than for other acidification conditions (Figure 6 A). With respect to the elasticity modulus, the effect of acidification (at each pH) was slightly different. No significant differences were observed between the elasticity modulus of gels acidified at different rates up to pH 5.0, different to that occurring with the stress at rupture values (higher dependence on the acidification rate). Up to pH 5.0 the elasticity modulus values were not significantly ($p < 0.05$) different amongst the acidification rates, and such behaviour was very similar to that observed for the complex modulus at the gel point (Table 2). This similarity could suggest that there is a correlation between both properties up to pH 5.0, which could be attributed to the small deformation conditions of these measurements. From pH 4.9 to lower pH values, a different trend was observed, that is, an increase in the elasticity modulus with decrease in acidification rate, as observed for the stress at rupture at all pH values. These results suggest that, besides the differences between elasticity modulus and stress at rupture, the intensity of the changes in the mechanical properties was higher at greater acidification rates; moreover at lower acidification rates the structure was stronger, probably due to a more organized and interconnected structure formed during the slower acidification process.

Figure 7 (A) shows the time necessary for each system reach the equilibrium pH_{eq} and the stress at rupture equilibrium (σ_{eq}). It was observed that the equilibrium pH was achieved well before the stress at rupture equilibrium. For a GDL/WPI ratio of 0.084 the

differences in time for the pH and stress at rupture equilibrium conditions corresponded to 39 hours while for a GDL/WPI ratio of 0.220 it was around 75 hours.

Figure 7 (B) shows the values for stress at rupture at the moment when the equilibrium values for pH and stress at rupture (σ_{eq}) under each acidification condition, were reached. When the equilibrium pH was achieved, no differences were observed (different capital letters in Figure 7 B) for the GDL/WPI ratios of 0.115 and 0.135, the general tendency being for the formation of harder gels with decreasing acidification rate. Considering the equilibrium stress at rupture, greater values for σ_{eq} were observed for GDL/WPI ratios between 0.084 and 0.135, while significantly lower values were observed for a ratio of 0.220 (small letters in Figure 7B).

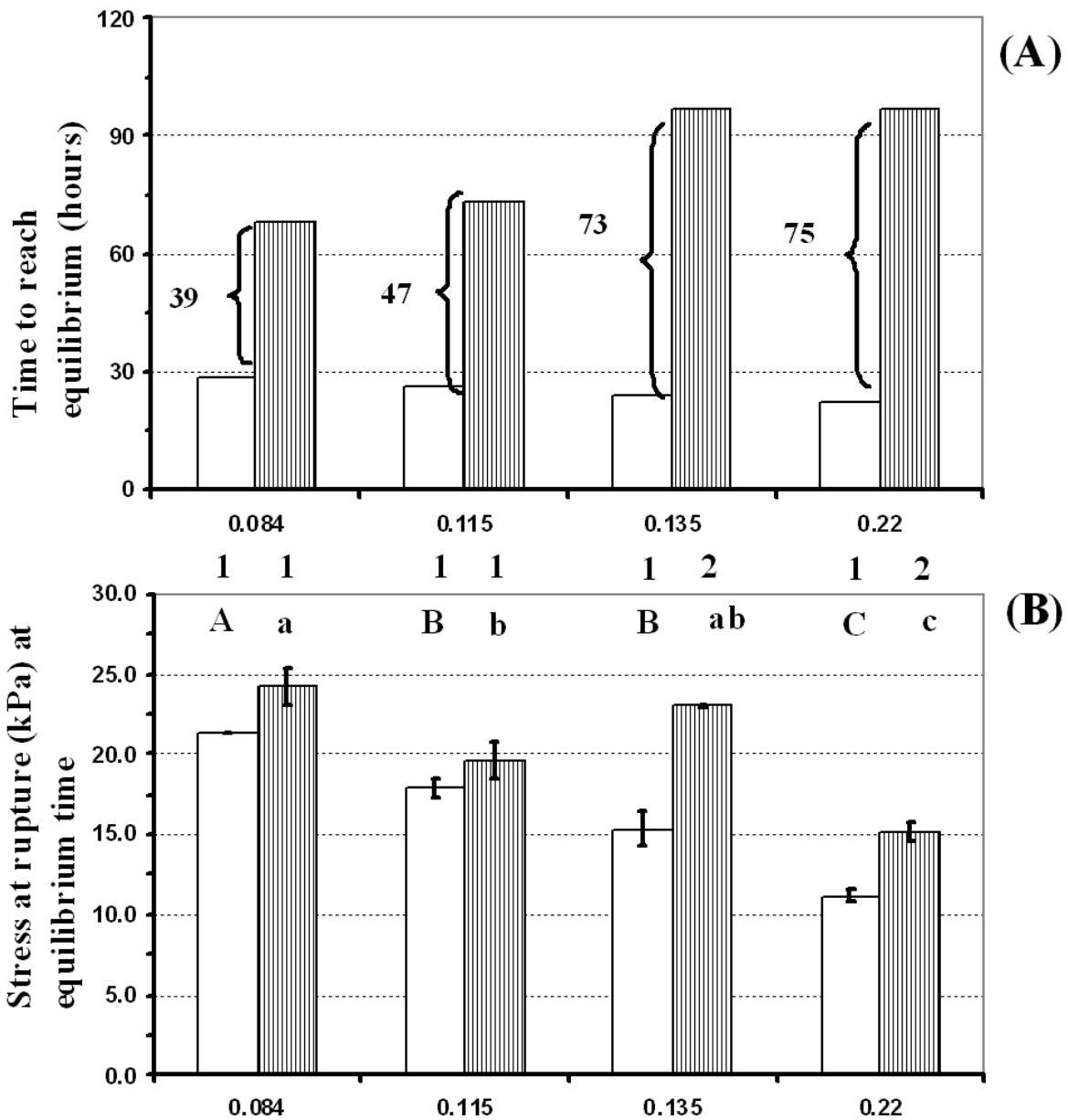


Figure 7. (A) Time to reach the equilibrium pH \square and equilibrium rupture stress (σ_{eq}) \blacksquare , differences in hours to reach both equilibrium conditions are marked after brackets. (B) Stress at rupture at the moment of reaching equilibrium pH \square and equilibrium rupture stress (σ_{eq}) \blacksquare . Different numbers indicate significant differences ($p < 0.05$) between the initial and final values of stress at rupture at equilibrium pH for each acidification rate. Capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the initial properties at equilibrium pH amongst the acidification rates. Small letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the final properties at equilibrium pH amongst the acidification rates.

The initial and final values for stress at rupture at equilibrium pH for each GDL/WPI ratio were statistically different (different numbers in Figure 7 B) for 0.135 and 0.220. Such a difference could be attributed to a greater number of molecular rearrangements in these systems after the equilibrium pH had been achieved. Such rearrangements probably also occurred for lower ratios, but the slower acidification conditions provided the necessary time for network organization, which thus occurred before the equilibrium pH was reached, during the kinetics process. Therefore the results obtained suggest that the acidification rate exerted a major role on the structural development of acid whey protein gels near the pI. In the slower processes a great effect of pH on the mechanical properties was observed (Figure 6) during the pH lowering of the system. On the other hand, in the faster processes the time that the system was maintained at the final or equilibrium pH exerted a great effect on the mechanical properties (Figure 7), due to structural rearrangements at this final pH value. This can be explained by the fact that the mechanical properties required more time to reach equilibrium at the higher acidification rates. In our study, the first case could be correlated with the GDL/WPI ratios of 0.084 and 0.115 and the second with GDL/WPI ratios of 0.135 and even more so, 0.220.

During slow acidification conditions the molecular interactions (associated with structural strengthening or molecular rearrangements) were occurring simultaneously with the pH lowering and had enough time to interact and consequently organize the structure. Under the fast acidification conditions such interactions were delayed and only occurred after the final pH was achieved, since the system did not have enough time to interact during the pH lowering.

4 Conclusions

The results of this study show that an adequate interpretation of the dynamics of whey protein network development requires the use of different techniques, especially considering the different system properties up to the gel point and after this to achieve the final pH value. Different mechanical properties should be taken into account in order to characterize the systems, since each property (stress and strain at rupture, elasticity modulus) reported different aspects of the system network. Moreover the effect of the GDL/WPI ratio depended on the time scale of the analysis. Two distinct stages were involved in the gelation process promoted by GDL: the first stage corresponded to an initial setting up of the gel network up to the gel point, t_g , and the subsequent stage corresponded to a structural development through bond strengthening and/or local rearrangements, which was time and pH dependent. The acidification rate did not influence the rheological properties obtained under shear at incipient gelation, but affected the rate of change in the mechanical properties after the gel point. An evaluation of the mechanical properties during gelation and after reaching equilibrium, permitted a qualitative distinction of the effects of the rate, pH and ageing time on the structural organization, and consequently on gel strength. Cold set gelation induced by GDL hydrolysis with a low acidification rate showed a strong influence of pH during acidification and when the final pH was achieved the properties did not change any more. However, when the rate of acidification was increased by the addition of a greater amount of GDL to the system, the effect of molecular rearrangements at the final pH was fundamental to network strengthening.

6. Acknowledgements

This research was supported by FAPESP (04/08517-8), CNPq, (140506/2003-9) and Arla Foods Ingredients.

References

Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, G. G. & Visschers, R. W. (2000). Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5001-5007.

Alting, A. C., de Jongh, H. H. J., Visschers, R. W. & Simons, J. (2002). Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4682-4689.

Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., Paques, M. & Visschers, R. W. (2003a). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 469–479.

Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G. & Visschers, R. W. (2003b). Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3150-3156.

AOAC (1996). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC:

Bryant, C. M. & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 143-151.

Cavallieri, A. L. F., Costa-Netto, P., Menossi, M. & Cunha, R. L. (2004). Extensional viscosity of acidified whey proteins isolated gels. In: Proceedings of IX International Congress on Engineering and Food, 1 (pp. 110–114).

Curcio, S., Gabriele, D., Giordano, V., Calabro, V., de Cindio, B. & Iorio, G. (2001). A rheological approach to the study of concentrated milk clotting. *Rheologica Acta*, 40, 154-161.

De Kruif, C. G. (1997). Skim milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185, 19-25.

Denis Renard, Fred van de Velde & Visschers, R. W. (2006). The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, 20, 423-431.

Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M. & Daubert, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585-591.

Hodge, J. R. & Hofreiter, B. T. (1962). Phenol sulphuric test. In *Methods in Carbohydrate Chemistry* Vol. 1: (1st ed.) (pp. 380-394). New York: Academic Press.

Hong, Y. H. & Creamer, L. K. (2002). Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, 12, 345-359.

Horne, D. S. (2003). Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 213, 255-263.

Ikeda, S. & Foegeding, E. A. (1999). Effects of lecithin on thermally induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 13, 239-244.

Ju, Z. Y. & Kilara, A. (1998a). Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1830-1835.

Ju, Z. Y. & Kilara, A. (1998b). Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *Journal of Food Science*, 63, 288-292.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4, *Nature*, 227, 680-685.

Livney, Y. D., Corredig, M. & Dalgleish, D. G. (2003). Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8, 359-364.

Lucey, J. A., Van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. & Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7, 381-388.

Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J. H. J. & van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98, 25-50.

Morr, C. V. & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.

Steffe, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. East Lansing, USA: Freeman Press.

Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A. & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 589-601.

Verheul, M., Roefs, S. & de Kruif, K. G. (1998). Kinetics of heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 896-903.

CHAPTER 5

Analysis of the structure of cold set whey protein gels with addition of polysaccharides

Ângelo Luiz Fazani Cavallieri and Rosiane Lopes da Cunha

To be submitted for publication at Journal of Agricultural and Food Chemistry

Analysis of the microstructure of cold set whey protein gels with addition of polysaccharides

Angelo Luiz Fazani Cavallieri; Rosiane Lopes da Cunha*

Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, 13083-862 – Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55-19-35214047; fax: +55-19-35214027;

e-mail: rosiane@fea.unicamp.br

Abstract

Cold set whey protein (WP) gels (5% w/w) with or without addition of xanthan or guar (0.1, 0.3 and 0.5% w/w) were evaluated by mechanical properties and SEM microscopy. Gels were formed after the addition of different amounts of glucono- δ -lactone to thermally denatured (80°C/30 minutes) solutions. After 48 hours of incubation at 10°C, different final pH values were obtained in the range of WP pI (5.2, 4.7 and 4.2). In general the addition of polysaccharides before acidification caused the formation of more discontinuous structures as compared to pure whey protein gels. Such a behavior was a result of a competition of simultaneously phase separation and gelation phenomena during the acidification process. Gels produced at lower acidification rates showed a more discontinuous structure, weaker and less elastic network, which was attributed to a predominance of phase separation due to slower gelation kinetics. In contrast, at higher acidification rates gelation was prevailing, favoring the formation of less porous structures, which resulted in stronger and more elastic gels. The effect of biopolymer concentration on gel properties was dependent on polysaccharide kind. At pH 5.2, 0.1% xanthan formed composite gels, but at higher xanthan

content gels were homogeneous. Guar systems were homogeneous at all conditions but did not form self supported gels at the higher concentrations. An image analysis was done on SEM micrographs in order to evaluate the fractal dimension (D_f) and the lacunarity of the structure that described differences in aggregation and cavities distribution on the structure, respectively. The D_f values ranged from 1.85 to 1.55 showing high degree of systems complexity. In general guar concentration increase entailed in D_f reduction and lacunarity increase, while the increase in xanthan concentration resulted in higher D_f and lower lacunarity.

Keywords: Whey proteins, glucono-delta-lactone, cold gelation, image analysis, fractal, lacunarity, SEM, microstructure.

1. Introduction

Heating a globular protein solution causes aggregation of protein molecules by mechanisms such as hydrophobic interaction, disulfide bond formation, or electrostatic interaction, and a gel can be formed if the protein concentration is sufficiently high (1). However, the combined control of globular protein heat denaturation and the solvent quality can also lead to a gelling process called “cold gelation” (2). The advantages of cold gelation process is induction of gelation of globular protein at lower protein concentration and lower temperatures allowing the addition of termolabile compounds in the gel matrix. The cold gelation process consists of two consecutive steps. In the first step the solution of proteins is heated at neutral pH, low ionic strength and a protein concentration lower than the minimum required for thermal gelation, leading to a loss of their native structure with partial unfolding and subsequent aggregation. Despite this aggregation, the proteins remain soluble after cooling and do not gel, due to predominant electrostatic repulsive forces

amongst the aggregates formed. In the second step, changes in solvent quality induce gelation, by promoting electrostatic interactions among the protein aggregates. Such modifications can be achieved by addition of salts or systems acidification towards the proteins pI. The structure and properties of cold-set protein gels depend on the gelation kinetics, type of induction (salt or acidic) and the properties of the protein aggregates formed in the first heating step, as a consequence of the temperature and heating time (3). Whey proteins (WP) are widely used as ingredients in the food industry because of their excellent functional and nutritional properties. Whey proteins are globular proteins with molecular weights ranging from 14 to 1000 kDa. WP are composed of 60% β -lactoglobulin (β -Lg), 22% α -lactoalbumin, (α -La), 5.5% bovine serum albumin (BSA) and 9% immunoglobulins (Ig). The isoelectric points of these proteins are 5.2 for β -Lg, from 4.2 to 4.5 for α -La, from 4.7 to 4.9 for BSA and between 5.5 and 6.8 for Ig (2, 4).

Besides much effort has been done in order to understand the cold gelation of pure protein systems (5-7), very few studies deal with cold gelation of mixed protein-polysaccharide systems. However, the addition of polysaccharides can also interfere in the microscopic structure of the protein gels due to specific interactions between these two biopolymers. The microstructure of acid skim milk with or without locust beam gum and or xanthan was evaluated (8). The cold set gelation of whey protein isolate with addition of different net charge polysaccharides, including xanthan and galactomannans was also recently performed (9). These works revealed that addition of polysaccharides led the formation of protein rich zones in gel microstructure with a depleted polysaccharide zones. The increase in polysaccharides concentration also influenced the systems large

deformation properties due to increase in protein network discontinuity caused by depletion effects between protein and polysaccharides. It was also observed that polysaccharides with different charge density influenced differently on protein aggregation during gel formation (9).

To our knowledge it was not reported in the literature the formation of mixed whey protein polysaccharide gels at different acidification rates and final pH. De Jong et al. (9) studied the cold set gelation of WPI with polysaccharides at a fixed acid precursor concentration that led to protein gels at a final pH value around 4.8 after 20 hours of gels incubation at 25°C. We previously observed that the whey protein gels produced at slower acidification rates produced stronger gels than gels formed at faster acidification conditions (Chapter 4). For this reason it is important to evaluate the effects of acidification condition on microstructure properties of mixed whey protein polysaccharide systems.

Xanthan is a high molecular weight anionic polysaccharide commonly used as a stabilizer and thickener in food products. This polymer consists of a linear (1-4)- β -D glucose backbone with a charged trisaccharide side chain on each second glucose residue. The galactomannans are neutral polysaccharides widely used in the food industry as thickening agents. Its molecular structure generally consists in chains of mannose residues with randomly attached galactose units as side chains. Guar gum is the most widely used galactomannan due to their ability, at relatively low concentrations, to form very viscous solutions that are only slightly affected by pH, added ions, and heat processing.

In solution, the proteins can show attraction or repulsion with the polysaccharides depending on their origin, concentration, system pH, ionic strength and temperature (10). In

these systems, three possible situations may occur: 1) incompatibility, when occur a segregation of the biopolymers in two different aqueous immiscible phases; 2) complex coacervation that arises due to a strong attraction between two different charged biopolymers forming an immiscible biopolymer complex that exudates the solvent to another phase; 3) miscibility, when the biopolymers are homogeneously dispersed through the system (10).

The protein aggregates structure and how they are organized in the gel network influence its macroscopic physical properties. However, the structure of the aggregates in protein gels is difficult to characterize due to their disordered shape. Fractal analysis has been attracting attention as a quantitative analytical method that can characterize many kinds of disordered shapes (11). A fractal is a self-similar structure that can be characterized by a non-integer dimension, the fractal dimension (D_f) (11, 12). Studies on the fractal structure of BSA or BSA/ β -Lg gels formed by heating aggregation have been performed (13, 14). In these works the mechanical properties were related to a scaling theory where the structure of colloidal gels was considered as a network of packed fractals flocs (15). The relation between the elastic properties and fractal structure was confirmed by the analysis of the micrographs of the formed gels (13, 14). Such procedure was also used to characterize plasma proteins gels (16), in addition with the lacunarity analysis (11), which was used as a complementary measure of structure discontinuity, or an analytic description of “gapness” distribution along the structure. In the previous works the values of the fractal dimensions obtained from the rheological measurements agreed with those

from the image analysis, indicating that the elastic behavior of BSA or plasma proteins gels reflected the fractal structure of the aggregates.

Microstructures of gels are commonly studied using conventional and confocal light microscopy. For structures smaller than 1 μm , however, scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy is used. SEM is a good technique for imaging three dimensional objects (17), most widely regarding as 2.5 dimensional images. This allows depicting morphological (i.e. number and size) and topographical features with a very good spatial resolution, which are mainly used to visualize or verify structural differences between samples. In order to compare different microstructures, it is often useful to transform image information into parameters that can be handled mathematically or statistically providing a manner to retain objectivity. There are several reports of image analysis based on binary images, i.e. biasing or filtering of the images (18-22). However, it is critical to choose an optimal method for feature extracting from the images, which do not omit information available in the micrographs. In image analysis of food microstructures very complex mathematical methods are often applied. However, one simple approach method for feature extraction makes use of the reasoning behind classical 'fractal analysis' based on the box-counting method (23). For several systems food materials, it has been shown that the micrographs can be adjusted to fit fractal models (24-27). In spite of scaling theories fail to correlate rheological properties do fractal characteristics in phase separated protein polysaccharide gels, the box count algorithm could be used to quantify the patterns of gel network observed in SEM micrographs.

In this study our objective was to evaluate the microstructure of cold set whey protein gels at different final pH values with addition of two different charge density polysaccharides (guar and xanthan). The microstructure was evaluated by SEM micrographs, which were related to the gels mechanical properties. Image analysis of the gels SEM micrographs permitted the characterization of the structure of the different gels.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The whey protein isolate (WPI) Lactoprodan was obtained from ARLA FOODS INGREDIENTS (Denmark). Xanthan and glucono- δ -lactone (GDL) were obtained from Sigma Aldrich Corporation (St Louis-USA) and guar HIGUM 55 was obtained from Rhodia Food (Brazil). According to SDS-PAGE experiments (28), the WPI comprised mainly β -Lg (52%), α -La (18%) and BSA (6%) as determined by densitometry. The lactose content in WPI powder was 0.6%, as determined by phenol sulphuric method (29). The WPI, xanthan and guar powders were characterized by atomic absorption spectroscopy in the Institute of Chemistry at UNICAMP (Brazil), and the following composition of ions was obtained: Na^+ 0.63%, Ca^{2+} 0.05% and K^+ 0.65% for WPI, Na^+ 2.60%, Ca^{2+} 0.40% and K^+ 4% for xanthan and Na^+ 0.051%, Ca^{2+} 0.038% and K^+ 0.131% for guar. The protein (30) (N x 6.38) and moisture content (w/w wet basis) were 92.4% and 5.7% for of the WPI powder, 0.65% and 8.7% for xanthan and 4.38% and 2.3% for guar.

2.2 Preparation of biopolymers stock solutions

WPI stock solutions were prepared (10% w/w) by dissolution of the powder in deionised distilled water (pH 6.7) under a magnetic stirring for 90 minutes at room

temperature. This solution was kept overnight at 10°C to promote complete protein solubilization. The WPI stock solutions were then subjected to a heat treatment at 80°C for 30 minutes in a stainless steel jacket vessel with mild mechanical agitation. Thermal denatured whey protein stock solution was then rapidly cooled to 10°C in an ice bath prior to mix with the polysaccharide stock solution. SDS-PAGE experiments was performed and results indicated the formation of protein aggregates with molecular mass superior than 200 kDa (31).

Xanthan and guar stock solutions (1.5% w/w) were prepared by dissolution of the powder in deionised distilled water, using a strong mechanical agitation for 90 minutes at room temperature (25°C). After this step, guar stock solution was also heated at 80°C for 30 minutes to promote complete polysaccharide solubilization. The pHs of polysaccharides stock solutions were measured and provided the following results: 4.73 for xanthan and 6.7 for guar. Such solutions were used in the mixed systems preparation without pH adjustment. These polysaccharides stock solutions were then rapidly cooled to 10°C in an ice bath and kept overnight at this temperature prior to mix with the protein solution.

2.3 Preparation of the gels: GDL-induced acidification

The mixed solutions were prepared in a fixed 5% (w/w) WPI content and varied polysaccharides content (% w/w): 0 (no polysaccharide addition), 0.1, 0.3 and 0.5. The stock solutions aliquots were mixed and homogenized by a magnetic stirrer for at least 2 hours before the addition of the dilution water. GDL powder was pre-dissolved in this dilution water at 10°C, just before to be added to the mixtures, which were gently stirred for an additional 1 minute. The GDL used in each formulation was related to the protein concentration in the mixtures (GDL/WPI - w/w% ratio, R_{GDL}) (31), which were determined

in preliminary experiments in order to obtain the desired pH values after 48 hours of system storage at 10°C (Table 1).

Table 1: GDL/WPI ratio (R_{GDL}) for each correspondent pH after 48 hours of storage at 10°C.

pH after 48 hours at 10°C	R_{GDL}		
	WPI pure gels	WPI/xanthan mixed gels	WPI/guar mixed gels
5.2	0.084	0.084	0.084
4.7	0.135	0.135	0.135
4.2	0.220	0.350	0.228

Just after the addition of GDL to the protein/polysaccharide mixtures, a part of the solutions were gently poured in small plastic tubes of dimensions of 20 mm internal diameter and 25 mm height that were sealed in order to avoid evaporation during storage. Another part was poured in thin layers in sealed small Petri dishes. In both cases the solutions were rapidly cooled at 10°C after GDL addition and were stored at the same temperature during 48 hours. The obtained gels were removed from plastic tubes and used in compression experiments (section 2.4) or were gently removed from Petri dishes and small pieces were then cut (10 mm x 3 mm x 1 mm) using a sharp blade. These small pieces were then fixed in the buffers for SEM experiments (section 2.5). Phase separated 0.1% xanthan gels at pH 5.2 were removed from plastic tubes and cut in order to separate the two gel phases. After that small pieces were cut from each phase and fixed in SEM buffers for the microscopy experiments.

2.4 Rheological properties: Mechanical Properties

Rheological properties were studied using a TA-XTIII Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey England) with a 25 kg load cell. The cylindrical gels were compressed in order to determine mechanical properties under uniaxial compression. Gels were compressed with an acrylic cylindrical plate of 45 mm diameter previously lubricated with silicon oil to avoid friction between surfaces in contact. Mechanical properties at rupture were determined at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ by compressing the gels to 80% of their initial height using a crosshead speed of 1mm/s. The force and height values obtained were transformed into true stress (σ_H) - true strain (ϵ_H) curves (32). The rupture properties were associated with the maximum point of the stress-strain curve and the Young modulus (E) was the slope of the first linear interval in the stress-strain curve and the maximum limit considered was 5% of deformation from initial sample height.

2.5 Scanning electron microscopy

Samples (10 mm x 3 mm x 1 mm) of gels were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) overnight. After rinsing two times in cacodylate buffer, the samples were fractured under liquid nitrogen and post fixed in 1% buffered osmium tetroxide for 2.5 hours. The fixed samples were rinsed again three times with cacodylate buffer. The fractured gels were then dehydrated in a graded ethanol series (30, 50, 70 and 90%). Dehydration was continued in 100% ethanol (three changes over 1 h) followed by critical point drying (Critical Point Dryer CPD03 Balzers, Alzenau, Germany). The dried samples were mounted on aluminum stubs and coated with gold in a Sputter Coater SCD 050-Balzers (Alzenau, Germany). At least two images of typical structures at a

magnification of 500x were obtained. Images were captured using a JEOL JSM 5800 LV (Tokyo, Japan) operated at 10 kV.

2.6. Evaluation of fractal dimension (D_f) from the SEM images.

The microscopy images were analyzed with the public domain software ImageJ v1.36b (33) and the FracLac v2.4d plugin for ImageJ (34). Micrographs were transformed into 8-bit grey scale binary images of 640-480 pixels and were then thresholded. The grey level used for thresholding was the median of the grey level histogram of each image (35). After that, D_f values of the structures aggregates were calculated using the box counting method (12). The basis of the box counting method is the placement of several grids of decreasing size over an image and the number of boxes containing pixels (foreground pixels) is counted for each grid. The D_f is based on the calculation of the scaling rule, given by equation (1):

$$D = -\log N_\varepsilon / \log \varepsilon \quad (1)$$

N_ε being the number of boxes at a certain scale containing part of the image (foreground pixels) and ε the corresponding scale (in pixels).

2.7. Evaluation of lacunarity (Λ) from the SEM images

Lacunarity (Λ) was calculated as the variation in the number of pixels at each grid placed in the image during a standard box counting, following the equation 2.

$$\Lambda_\varepsilon = \left(\frac{\sigma}{\mu} \right)^2 \quad (2)$$

where Λ_ε is the lacunarity for the grid of size ε (in pixels). It depends on the square of the pixels coefficient of variation, σ being the standard deviation of the pixels count among all

boxes of size ε , and μ the average number of pixels for the same grid size. Lacunarity (Λ) can be understood as the “gapiness” or “visual texture” variation of an image during a standard box count procedure (11, 34), a measure of heterogeneity of an image and it supplements the fractal dimension information by describing the “gappiness” among the fractals in the structure (34). The higher the lacunarity, the greater is the variation on how the pixels are distributed within an image, indicating heterogeneity of the structure. A coefficient of variation (σ/μ) of 0.5 means that the number of pixels per box varies an average of 50% from the mean. A lacunarity greater than 1 means that the standard deviation of the pixels count (σ relative to all positions of boxes in a grid of size ε) exceeds the mean (μ) (34).

2.8 Statistical analysis

Values reported for mechanical properties (stress at rupture, elasticity modulus and strain at rupture) represent the mean of 7 replications obtained for at least 2 repetitions of each treatment (acidification condition, type and concentration of polysaccharide), and the error bars represent standard deviation. The SEM images represent the obtained typical structures obtained from at least 2 replications obtained for at least 2 repetitions of each treatment. Significant differences ($p < 0.05$) between gels properties were determined by one way ANOVA and the comparisons between the mean values were evaluated by the Tukey procedure. Statistical analyses were performed using the software STATISTICA 5.5 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

3 Results and discussion

3.1 Visual appearance of the mixed WPI-polysaccharides cold set gels.

Lowering the pH of heated whey protein solutions caused the formation of cold-set gels. The gels were studied in pH range between 5.2 and 4.2, corresponding to the isoelectric point of the main whey proteins (5.2 for β -Lg, 4.7 for BSA and 4.2 for α -La). Accordingly to previous studies with pure whey protein gels, under these acidification conditions the systems showed great variation in pH values until 500 minutes (8.3 hours) and then decreased steadily (Chapter 4). The structure development of mixed whey protein polysaccharides systems may be different from pure whey protein systems concerning the time of the achievement of equilibrium mechanical properties, but probably follows the same pattern of structure rearrangements only at greater acidification conditions (Chapter 4). However, the mixed whey protein polysaccharide systems did not show significant changes in pH values between 48 and 72 hours, therefore the properties of such systems were evaluated at 48 hours.

Pure whey protein gels formed homogeneous and self supported gels (maintained the form when removed from the plastic tubes) with the pH decrease and had a white opaque appearance. Addition of polysaccharides to the WPI solution prior to acidification process led to the formation of gels with different appearance than the observed for pure WPI gels (Table 2).

Table 2: Visual appearance of the obtained gels at final pH values after 48 hours of storage at 10°C .

Polysaccharide concentration (% w/w)	Xanthan						Guar					
	5.2		4.7		4.2		5.2		4.7		4.2	
	H	SS	H	SS	H	SS	H	SS	H	SS	H	SS
0.1		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
0.3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
0.5	•	•	•	•	•	•			•		•	

H = homogeneous, one phase gels
 SS = self-supported gels

Mixed WPI-xanthan gels containing 0.1% polysaccharide formed two phases gel at final pH 5.2. The top phase was turbid while the bottom phase was white and opaque. At pH 4.7 and 4.2 the 0.1% xanthan gels were completely opaque. WPI gels with addition of 0.3 or 0.5% of xanthan were completely homogeneous and opaque for all final pH values. The gels composed with guar were homogeneous and opaque in 0.1 and 0.3% formulations in all studied pHs, but in 0.5% of guar content the gels did not form self supported gels.

3.2 Microstructure visualization by SEM microscopy

Figure 1 shows the SEM micrographs of pure 5% WPI gels. It is possible to see that a porous and homogenous structure resembling to a sponge constituted the pure whey protein gels. This structure was more homogenous with small pores at pH 5.2 (Figure 1 A) and 4.7 (Figure 1 B), while at pH 4.2 (Figure 1 C) bigger pores were randomly distributed along the gel network.

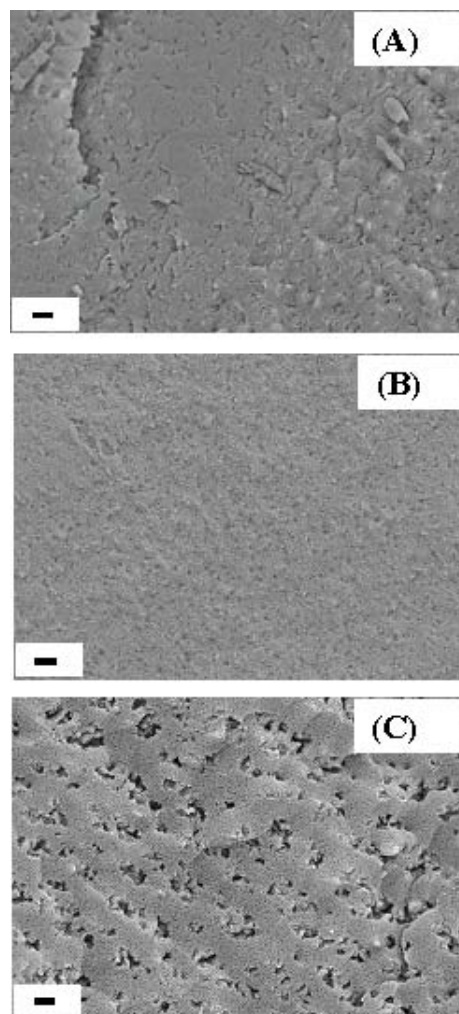


Figure 1: SEM micrographs of pure 5% WPI acidic cold set gels. (A) pH 5.2, (B) pH 4.7 and (C) pH 4.2. Scale bar corresponds to 10 μm .

Figure 2 shows the obtained microstructure of macroscopic phase separated 0.1% xanthan gels at pH 5.2. In Figure 2 is also possible to observe an example of the 8-bit (binary gray scale image) transformations of SEM pictures during image analysis, which was necessary to determine the fractal dimension and lacunarity of gels (section 3.4).

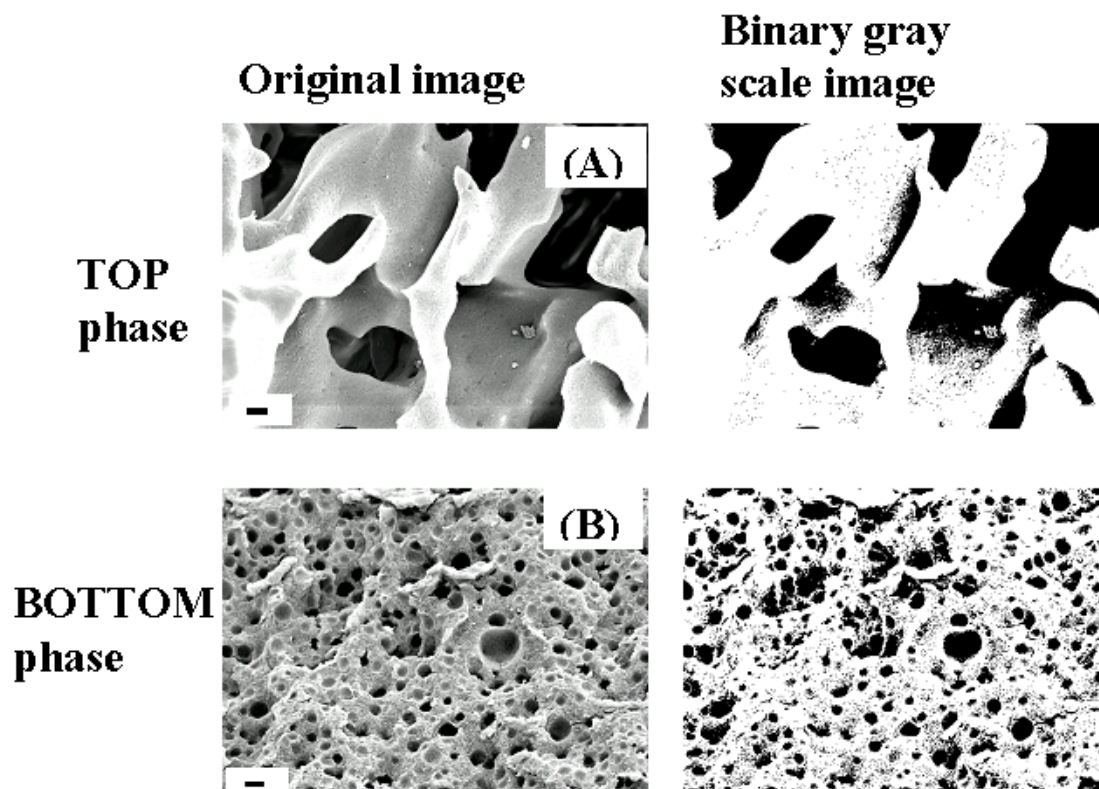


Figure 2: SEM micrographs (left) and corresponding binary gray scale images (right) of macroscopic phase separated gels of 5% WPI 0.1% xanthan at pH 5.2. (A) Top and (B) bottom phase are outlined. Scale bar corresponds to 10 μm .

The top phase showed big void spaces, within a three-dimensional branched structure (Figure 2 A). The bottom phase showed swallow spherical voids of several diameters distributed along the structure (Figure 2 B). In both cases the voids were significantly marked in the binary images, allowing to outline each void (grey scale image in Figure 2). In all evaluated gels the cavities among clusters were pictured as black regions, permitting to set the structures as foreground (white pixels) and cavities as background (black pixels). The binary images of each gel were used for the box count method (section 3.4).

Figure 3 shows the 0.1% xanthan gels at pH 4.2 and 4.7 that did not exhibit macroscopic phase separation. A compact and interconnected swallow network was observed, forming branched structures, but with large voids randomly distributed. At pH 4.2, a second structure network of small-interconnected spheres was observed inside the voids, filling the spaces and forming chains and clusters (Figure 3 B).

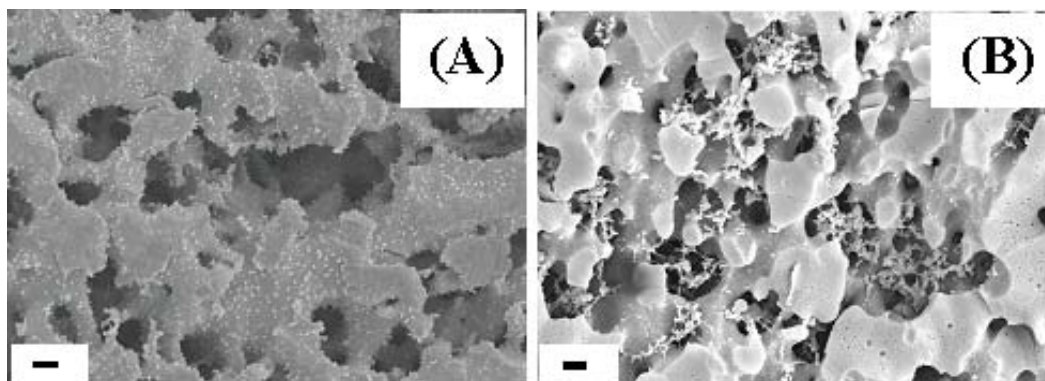


Figure 3: SEM micrographs of 5% WPI-0.1% xanthan cold set gels at final pH values (A) 4.7 and (B) 4.2. Scale bar corresponds to 10 μm .

The 0.3% xanthan gels at pH 5.2 showed coarse structure constituted by a network of interconnected branched fibers (Figure 4 A). It was similar to the top phase of 0.1% xanthan gels but the voids were significantly smaller. At pH 4.7 (Figure 4 B) the structure was much more closed and at pH 4.2 (Figure 4 C) it was more compacted, with spherical voids randomly distributed. 0.5% xanthan gels were more homogeneous than at lower concentration, showing a structure apparently more open at pH 5.2 (Figure 4 D) than at pHs 4.7 and 4.2 (Figure 4 E and F, respectively).

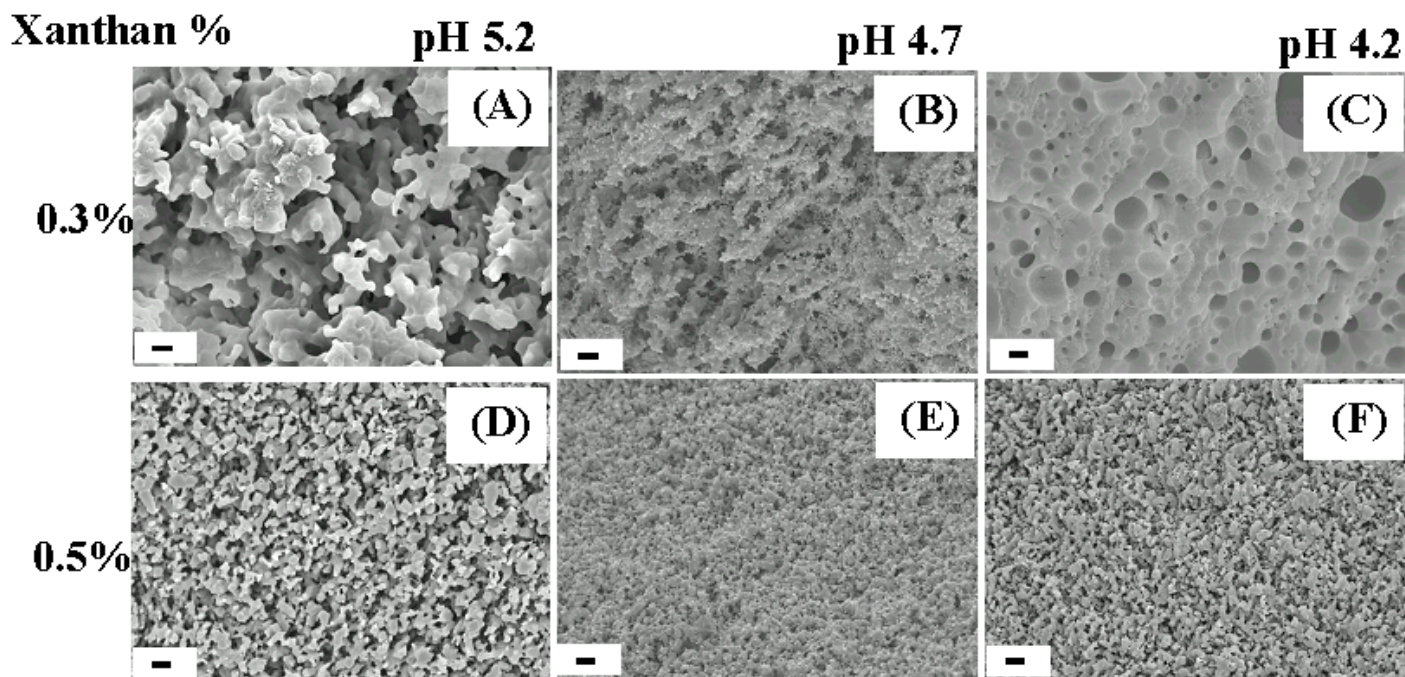


Figure 4: SEM micrographs of cold set gels with 5% WPI-xanthan (0.3% -top row and 0.5% - bottom row). Final pH values: (A, D) 5.2, (B, E) 4.7 and (C, F) 4.2. Scale bars correspond to 10 μm .

Guar gels showed even more different structure patterns (Figure 5). The 0.1% guar gels were very similar at the different pHs, with spherical porous randomly distributed (Figures 5 A, B and C). Moreover, there were more and smaller holes at pH 4.2 (Figure 5 C). Addition of larger amount of guar in the systems caused an increase of the voids size and a clear formation of two structures at final pHs 4.7 and 4.2. A relatively closed structure was visualized at 0.3 % guar and pH 5.2 (Figure 5 D). At 0.5% of guar content, the structure was widely open, which could explain the formation of non-self supported gels (Figure 5 G to I).

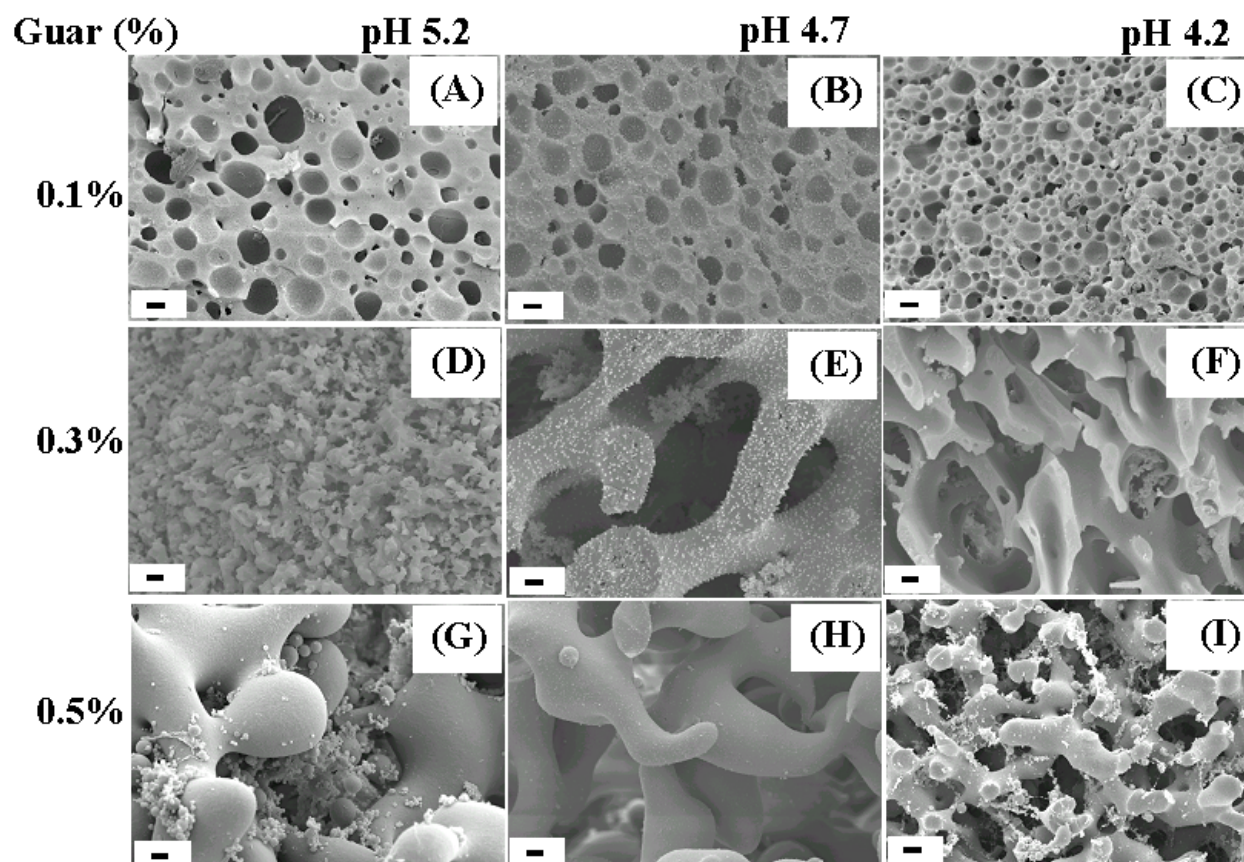


Figure 5: SEM micrographs of 5% WPI cold set gels with addition of guar (top row are 0.1%, middle row are 0.3% and bottom row are 0.5% of guar). Final pH values: (A, D, G) 5.2, (B, E, H) 4.7 and (C, F, I) 4.2. Scale bars correspond to 10 μ m.

Different behaviors on microstructure formation of WPI-polysaccharide homogeneous gels (Table 2) were observed depending on the polysaccharide type, concentration and the final pH of gels (which in turns depends on the acidification condition). For WPI-xanthan mixed gel the increase in xanthan concentration and reduction in gel final pH led to an apparent closed and more continuous structure. In contrast, for WPI-guar mixed gels it was observed an apparent opposite influence of guar concentration and gel final pH. The increase in guar concentration led to gels with more open

microstructure. Moreover, the reduction in gel final pH to values 4.2 led to a slight reduction in gel discontinuity when compared to gel final pH 5.2.

The formed microstructure probably depended on specific interactions among WP thermal aggregates and each polysaccharide during the process of gel formation. The increase in structure porosity can be attributed to an obstruction of protein-protein interaction by the polysaccharide. In the case of xanthan the protein-polysaccharide interaction is associative at pHs below pI. The pH reduction caused the conversion of protein from negative to positive charge; favoring the biopolymers interaction of WP aggregates with the anionic xanthan, specially at the lower pHs. However, for the WPI-guar mixed gels the more open microstructure would be a consequence of excluded volume effects between these biopolymers. In both cases the result was probably the formation of protein rich and protein depleted zones in microstructure, or polysaccharide rich zones. These effects were visualized by Sanchez et al. (8) in skim milk acidified gels with addition of locust bean gum and/or xanthan. These authors related the formation of discontinuous microstructure due to depletion enrichment of protein and polysaccharide zones on gel microstructure. As a consequence the gel porosity was increased in the presence of polysaccharides. The increase in system porosity was related to a condensation and localized increase in casein network density in regions of gels microstructure. de Jong et al., (9) studied the microstructure of WPI cold set gels with addition of galactomannans or xanthan at a fixed acidification rate. They used confocal laser microscopy to demonstrate that the polysaccharides (specially the galactomannan) led to a condensation of the protein network leading to an increase in system porosity.

In the present work, the different acidification conditions used also exerted a clear influence on system microstructure by the competition between gelation and biopolymers incompatibility (phase separation) mainly at the initial phase of acidification. It could be considered 3 factors associated to the gel formation process: 1) the initial step, which was close to neutral pH and/or above the WP pI, 2) the rate of pH decrease, and 3) the value of the gel final pH. At the beginning of acidification it would be observed thermodynamic incompatibility between the biopolymers. In the case of xanthan such incompatibility is in great part related to the charge equivalence of xanthan and WP thermal aggregates at neutral pH (36). For the neutral guar gum the incompatibility is strongly related to the mutual exclusion of accessible volume of mass of biopolymers, which is known as exclusion volume effects (37, 38).

The period that the systems are kept at $\text{pH} > \text{pI}$ is longer for systems formed at lower acidification rates (Chapter 4). In such a condition (final pH value correspondent to 5.2). Thus, the thermodynamic incompatibility was favored among the biopolymers during acidification and also in the final pH, where α -La and BSA (almost 20% of WP in WPI) are still negatively charged, resulting in a more discontinuous microstructure.

The effect of macroscopic phase separation on 0.1% xanthan gels at pH 5.2, could be attributed to a faster phase separation kinetics as compared to the gelation one. The low initial viscosity of such systems also played a fundamental role in favor of the phase separation (36, 39). This hypothesis is corroborated by the fact that no macroscopic phase separation was observed at higher polysaccharide content.

At higher GDL ratio, there isn't enough time for protein aggregation close to the β -Lg and BSA pIs. Protein-protein rearrangements occur mainly after the equilibrium pH had been reached (Chapter 4). By adding xanthan, the protein-protein interactions were probably even lower due to a decrease in system mobility. On the other hand, at pH 4.2 some WP (β -Lg and BSA) had positive charge. Then, protein-polysaccharide interactions were favored. In that situation, the acidification kinetics was faster than the phase-separation one. However, the more continuous network seems to be also a result of the protein-polysaccharide interactions that occurred at pH 4.2.

It is expected that for the WPI-guar mixed gels the excluded volume effects were intense at higher guar contents, which resulted in gels microstructure discontinuity and in non self supported gels formation (Table 2). The system microstructure have great influence on gels rheological properties and in this way the mechanical properties of mixed WPI-polysaccharide gels were analyzed and compared to the properties of pure WPI cold set gels.

3.3 Mechanical properties

Figure 6 to 8 shows the mechanical properties of pure WPI gels and WPI-polysaccharides mixed gels.

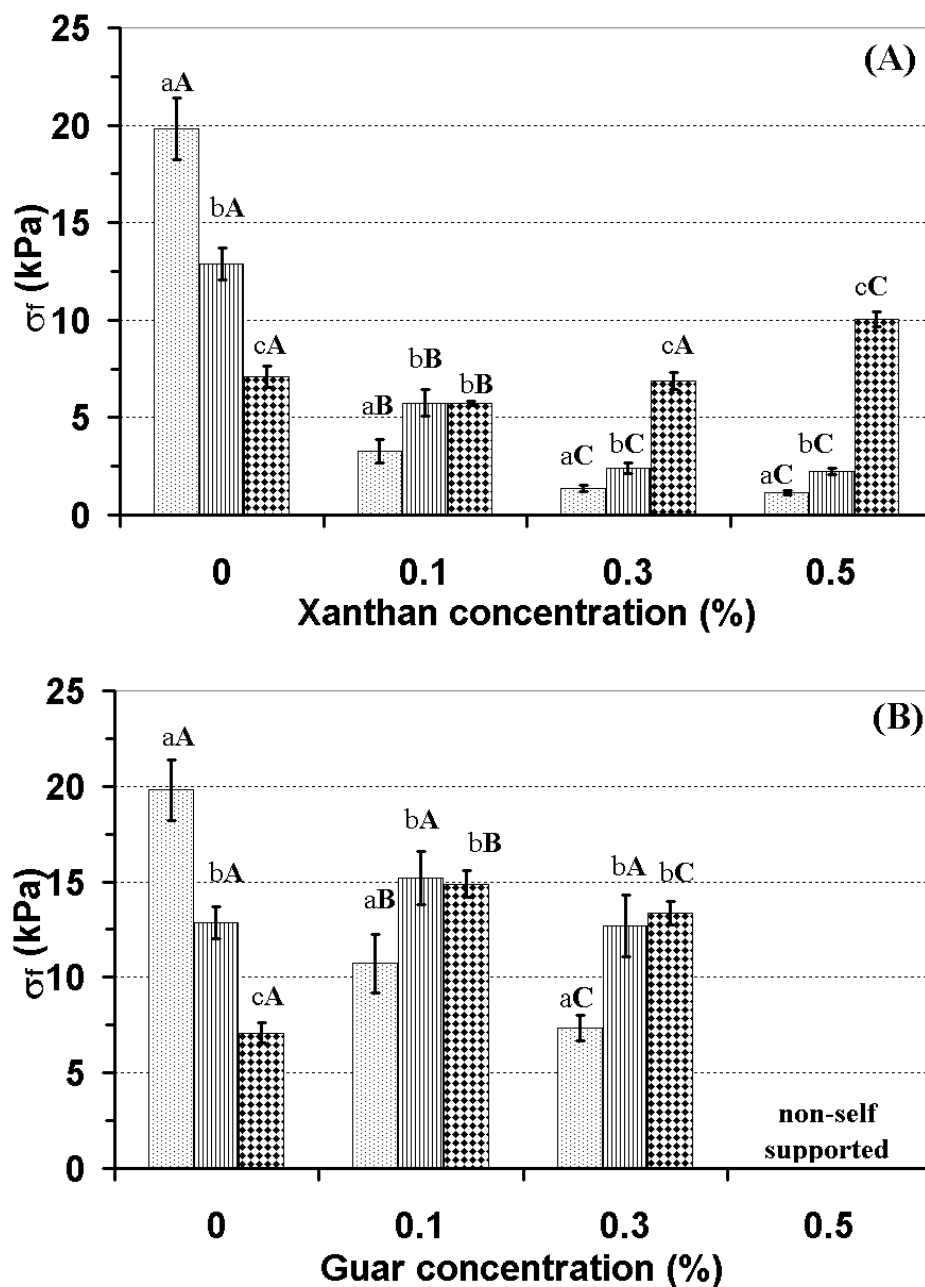





Figure 6: Stress at rupture (kPa) of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides: (A) xanthan, (B) guar. Gels pH:  pH 5.2,  pH 4.7 and  pH 4.2. Bars represent standard deviation among replications. Different letters means significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the pH gels in each formulation. Capital letters: differences amongst formulations in each pH.

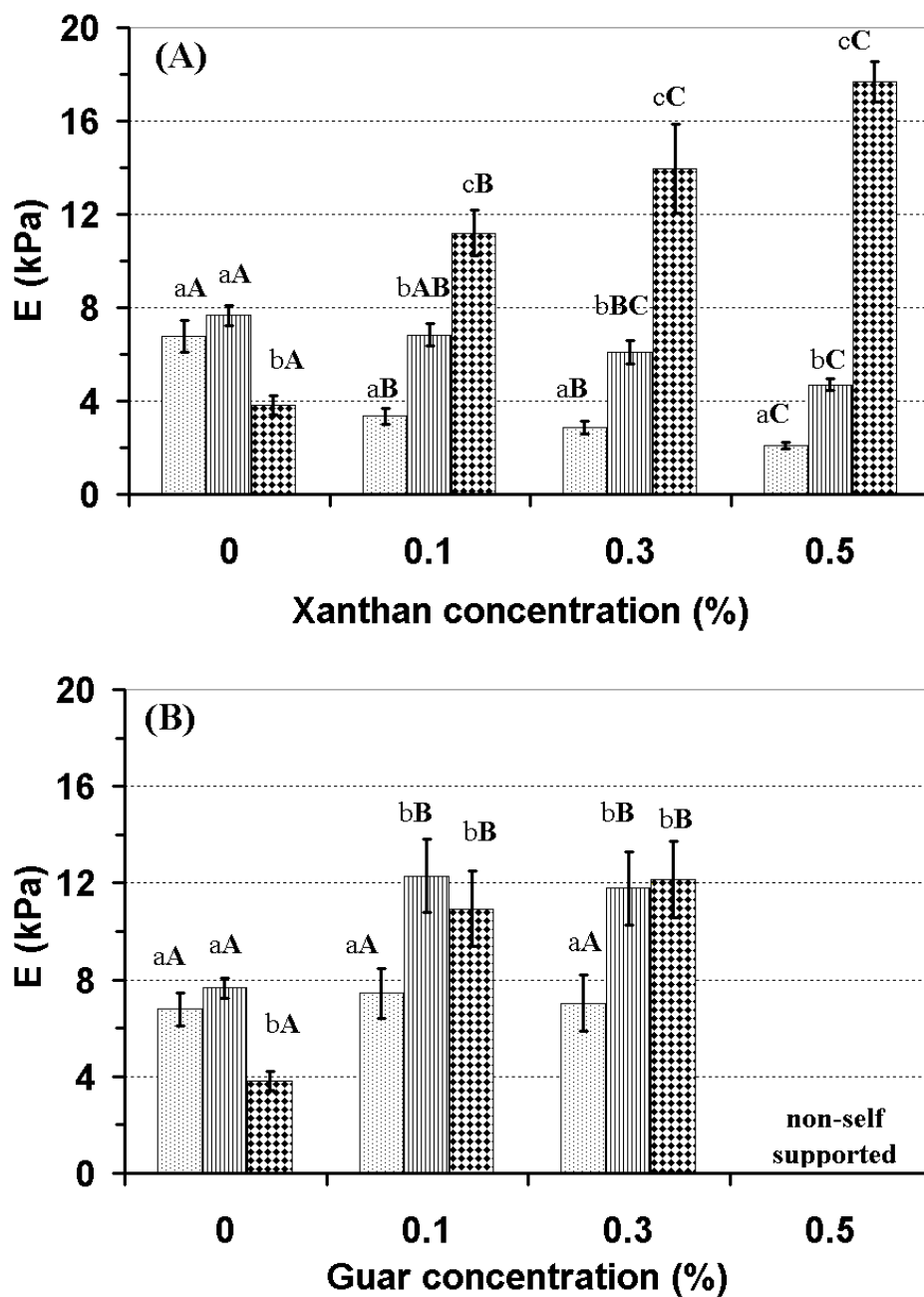





Figure 7: Elasticity modulus of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides. (A) xanthan, (B) guar. Gels pH:  pH 5.2,  pH 4.7 and  pH 4.2. Bars represent standard deviation among replications. Different letters means significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the pH gels in each formulation. Capital letters: differences amongst formulations in each pH.

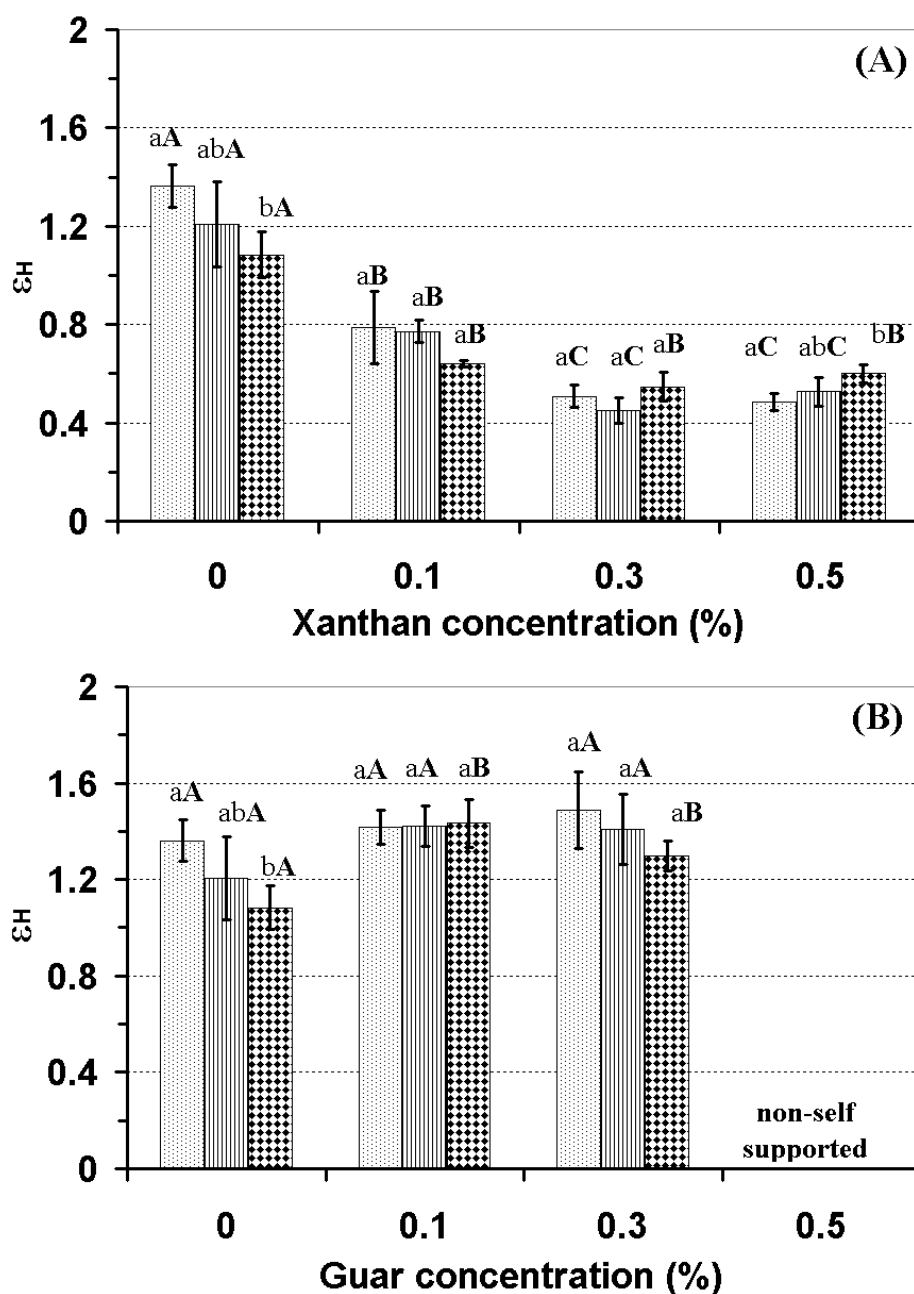





Figure 8: Strain at rupture of 5% WPI cold set gels with addition of polysaccharides. (A) xanthan, (B) guar. Gels pH:  pH 5.2,  pH 4.7 and  pH 4.2. Bars represent standard deviation among replications. Different letters means significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the pH gels in each formulation. Capital letters: differences amongst formulations in each pH.

The increase in network discontinuity of pure WPI gels at lower final pH values (Figure 1) is probably related to the lower stress at rupture (Figure 6) and elasticity modulus (Figure 7) values. These results are in agreement with the mechanical properties of 7% WPI pure cold set gels produced under different acidification conditions (Chapter 4).

Besides the formation of two layers gel, the 0.1% xanthan gel at pH 5.2 was subjected to compression experiments because they were self-supported. In all cases the expressed values were obtained in the first rupture point of the gels. It was observed that xanthan addition caused a decrease in stress at rupture at pHs 5.2 and 4.7 (more pronounced decrease at pH 5.2), but in contrast, at pH 4.2 the xanthan addition caused a slight increase in stress at rupture values (Figure 6 A). The trends observed in elasticity modulus for the mixed xanthan-WPI gels (Figure 7A) were similar to those observed for stress at rupture (Figure 6 A), but the increase in elasticity modulus of xanthan gels at pH 4.2 was more sharp, as well the decrease at lower pHs was less pronounced than the pattern observed for stress at rupture (Figure 7 A).

It was also noticed that at pH 5.2 guar gels showed a slight decrease in stress at rupture (Figure 6 B) in relation to pure whey protein gels at pH 4.7 similar values and at pH 4.2 it was observed a slight increase in stress at rupture values. In general, guar addition led to stronger WPI gels than xanthan, but at 0.5% content self-supported gels were not formed with the neutral polysaccharide. The elasticity modulus of pure whey protein gels was not changed with guar addition at pH 5.2 but it was observed an increase in those values for guar gels at pHs 4.7 and 4.2 (Figure 7 B).

In a general way, the strain at rupture (Figure 8) was not affected by system pH in each formulation, but addition of 0.1% xanthan caused a pronounced decrease in the strain

values in relation to the pure whey protein gels (Figure 8 A). The strain at rupture values of 0.3 and 0.5% xanthan-WPI gels were very similar, showing that the deformability of these gels was independent of system pH and xanthan addition. In contrast guar gels were always more deformable than xanthan (Figure 8 B) but very similar to pure whey protein gels.

In general, the increment of xanthan concentration led to more compact microstructure formation (Figure 4). However, only at final pH 4.2 the increment in polysaccharide concentration in WPI-xanthan gels led to an increase in values of stress at rupture and elasticity modulus. At the pH 4.2 the gels were also less deformable (Figure 8 A). Such a fact could be attributed to an obstruction of a protein-protein interaction until the achievement of pH values 5.2 and 4.7 due to the repulsion between the biopolymers negatively charged. In addition, the increase in system viscosity could be associated to a lower mobility of proteins, which impeded the network stabilization. However, the reduction on gel final pH to 4.2 value led to an increase in electrostatic interactions among protein and xanthan, resulting in an increase in the stress at rupture and elasticity modulus values (Figure 7A). These increased mechanical properties results at pH 4.2 are in agreement with the structure observed for these gels, which were more compact and less discontinuous with xanthan concentration increment.

The mixed WPI-guar gels were self-supported until 0.3% of guar concentration, which could be associated to a condensation of the protein network due to excluded volume effects (9). In this way the protein-protein interactions would be favored resulting in gels with increased values of stress at rupture (Figure 6B). This is in agreement with the increased values of elasticity modulus values observed at final pH values 4.7 and 4.2 as compared to pH 5.2 (Figure 7B). At lower pHs, the protein-protein interactions are favored,

but at higher concentration of guar (0.5%) seems to be a phase inversion with a prevailing polysaccharide presence obstructing the protein network formation. This phase inversion was previously observed elsewhere by confocal laser scanning microscopy (9). In order to quantify the polysaccharide interference on system aggregation, image analyses were performed in SEM micrographs making possible the characterization of fractal dimension and lacunarity of gels.

3.4 Morphology of the SEM images evaluated by fractal dimension and lacunarity

Figure 9 displays an example of the results after applying the box count method to SEM binary images. Data was well fitted to a power law model ($R^2=0.99$) from which the slope could be deduced (D_f values of the 2D binary images accordingly Equations 1). Average fractal dimensions among 30 image scans (grid positions) for the different systems are showed in Figure 10.

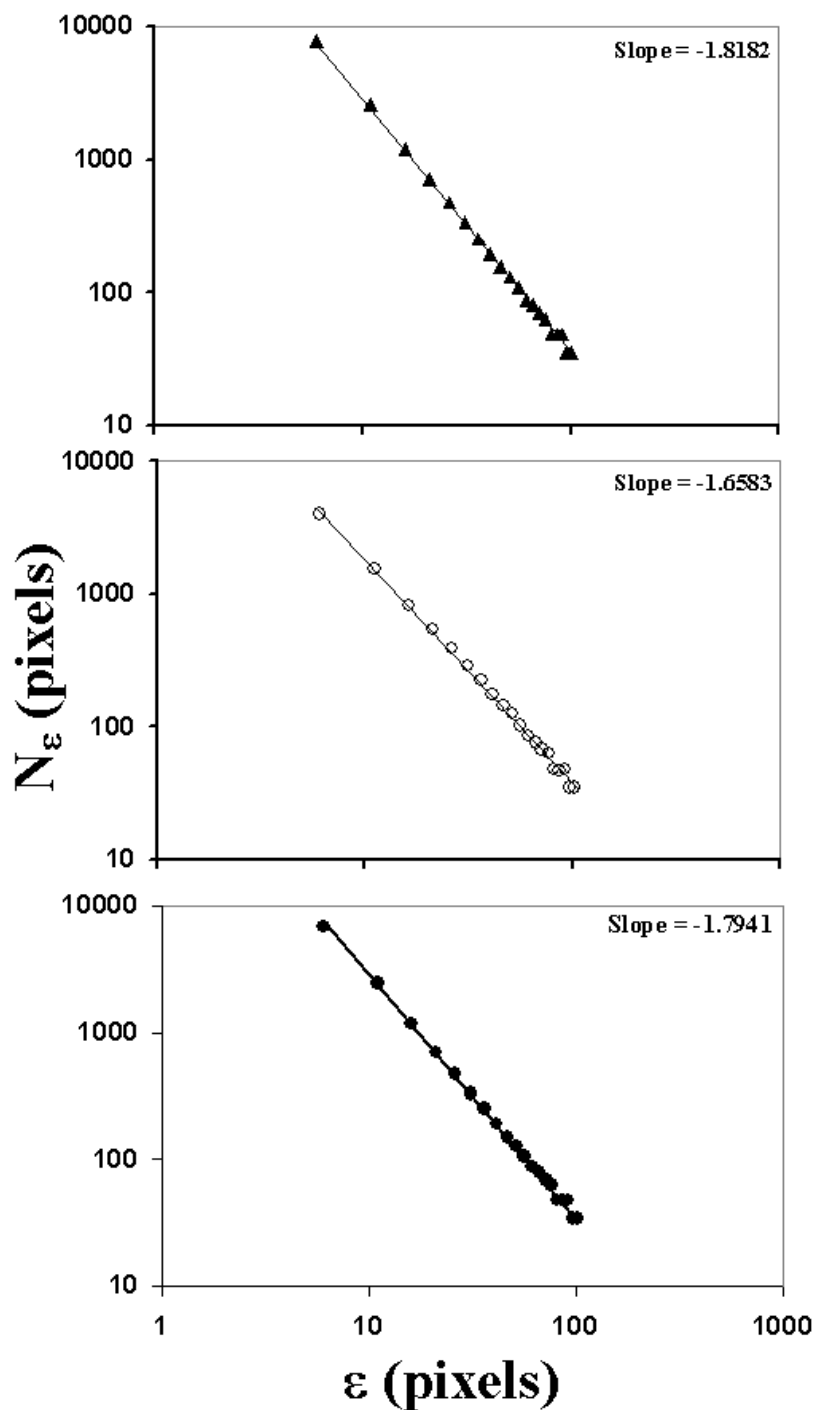


Figure 9: Examples of box count plots for the determination of D_f from SEM 8-bit binary images of pH 5.2 cold set whey protein gels: \blacktriangle pure 5% whey protein, \circ 0.1% xanthan top phase and \bullet 0.1% xanthan bottom phase

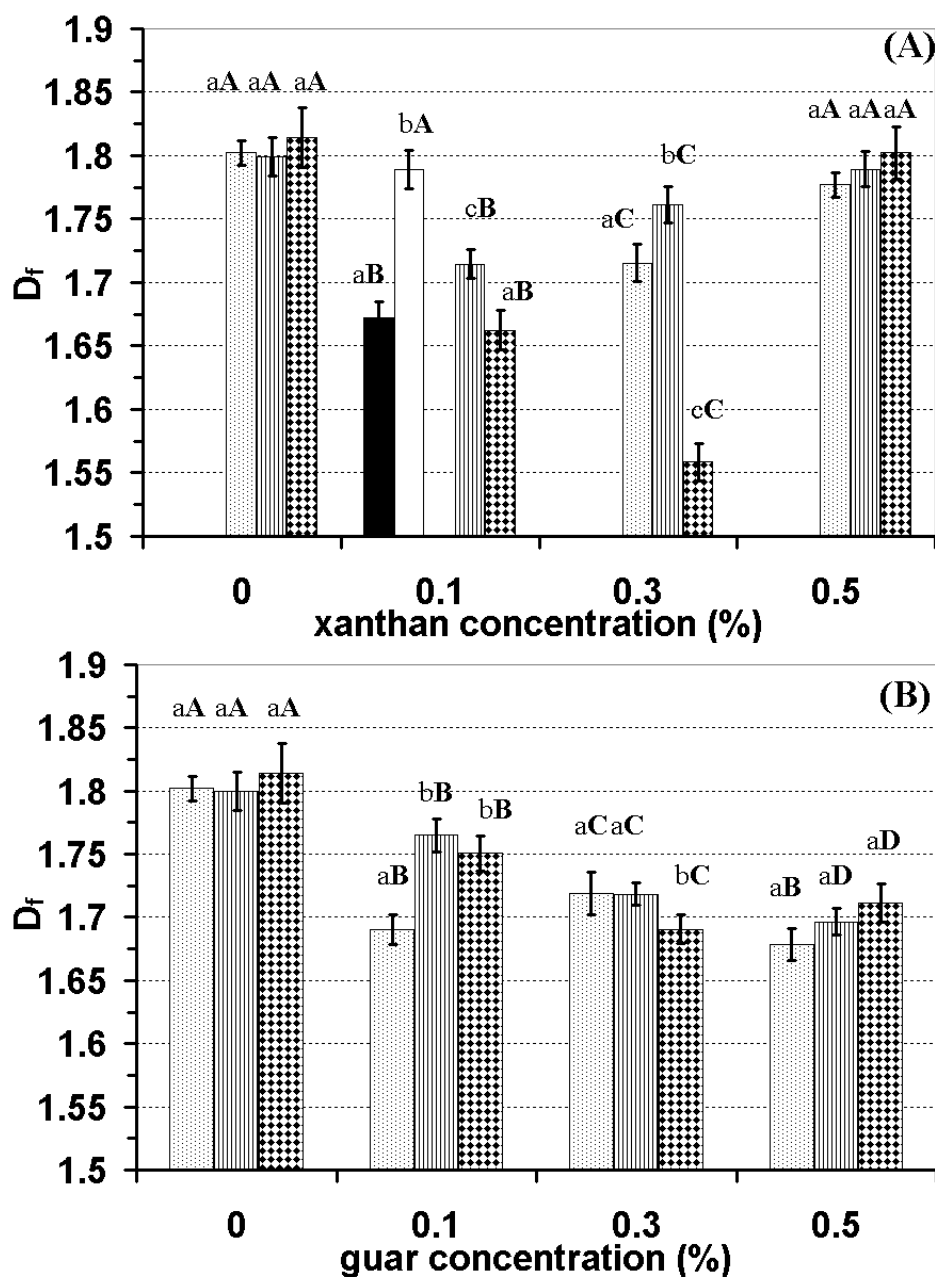







Figure 10: Fractal dimension of (A) WPI-xanthan and (B) WPI-guar gels. Gels pH:  5.2,  4.7 and  4.2. In (A) the 0.1% xanthan phase separated gels at pH 5.2:  top phase and  bottom phase. Bars represent standard deviation from scanning each image in 4 grids position. Different letters means significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the pH gels in each formulation. Capital letters: differences amongst formulations in each pH.

Fractal dimensions values of the gels varied between 1.85 to 1.55, which indicate a high degree of fractal complexity in all cases. This means that the contour lengths of the gel network in binary gray scale images exhibit high degree of ruggedness and very tortuous silhouette (27). Pure whey protein gels were not influenced by system pH showing similar values ($p < 0.05$) of D_f . At pH 5.2 and 0.1% xanthan the D_f values of top and bottom macroscopic separated phases were quite different each other. Top phase showed quite smaller D_f than pure whey protein gels at pH 5.2. In contrast, the D_f of bottom phase gels was very similar to those for pure whey protein gels at the same pH value (Figures 10 A), showing that the latter corresponded to a protein rich phase.

The homogeneous xanthan gels (Table 2) with a concentration up to 0.3% of polysaccharide showed in general a reduction on D_f values in relation to pure WPI gels (Figure 10A). The further increase in xanthan concentration (0.3 to 0.5%) led to an increase on D_f values, which were similar than the observed for pure WPI gels. Such D_f variation was less pronounced at final pH values 4.7. The addition of guar also caused a reduction on D_f values in relation to pure WPI gels. This trend was more pronounced at final pH 5.2 while for pHs 4.7 and 4.2 a significant decrease on D_f values was observed for higher polysaccharide concentration (Figure 10 B).

The obtained results suggest that the network structure was influenced by system pH and polysaccharide addition. For homogeneous xanthan gels (0.1 and 0.3%), the reduction in pH led to smaller values of D_f , which indicates smooth contour shape of the structure. Such a fact suggests that the network ruggedness was reduced by the increase of electrostatic interactions among whey proteins and xanthan. However, the increment in xanthan concentration led to very rugged and irregular gel network, which could be

attributed to the decrease of biopolymers mobility due to the high system viscosity. For the guar gels the D_f values were more influenced by guar content than the system pH. In such a case, guar addition caused the formation of gel network with smoother surfaces and less rugged. Such a fact could be attributed to the guar-protein excluded volume effects that led to protein condensation in large and smooth fibers, when forming the gels.

Figure 11 shows the lacunarity distribution of pure whey protein gels and mixed WPI-xanthan gels at final pH 5.2 as a function of box size. For the other systems the lacunarity plot followed a similar trend (data not shown).

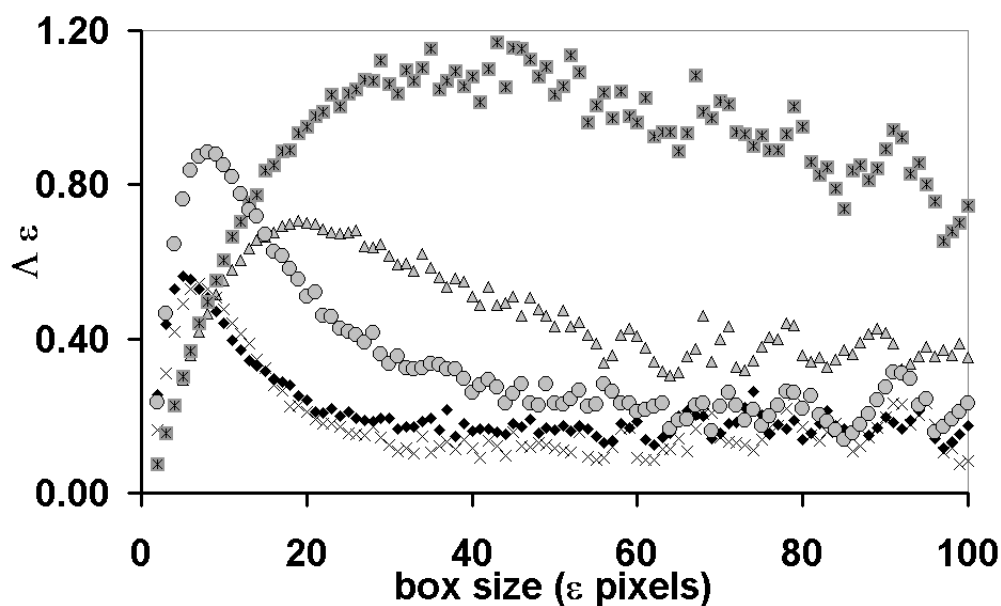


Figure 11: Example of typical lacunarity plot from SEM binary images of the cold set gels at pH 5.2. \blacklozenge pure WPI, WPI-xanthan gels: \boxtimes 0.1% top phase, \bullet 0.1% bottom phase, \blacktriangle 0.3 % and \times 0.5%.

In general, heterogeneity in pixels distribution increases with the scale until reach a box size of 10-20 pixels. After that the heterogeneity reduced until the achievement of

steady values. Considering image fragments smaller than 10 pixels (an average area fraction of 0.05% of original image size) all gels showed similar lacunarity values (Figure 11). However the effect of polysaccharide addition on microstructure discontinuity could be visualized in a reference scale of 100 pixels (an average area fraction of 3.25% of original image size). Such results can be visualized in Figure 12.

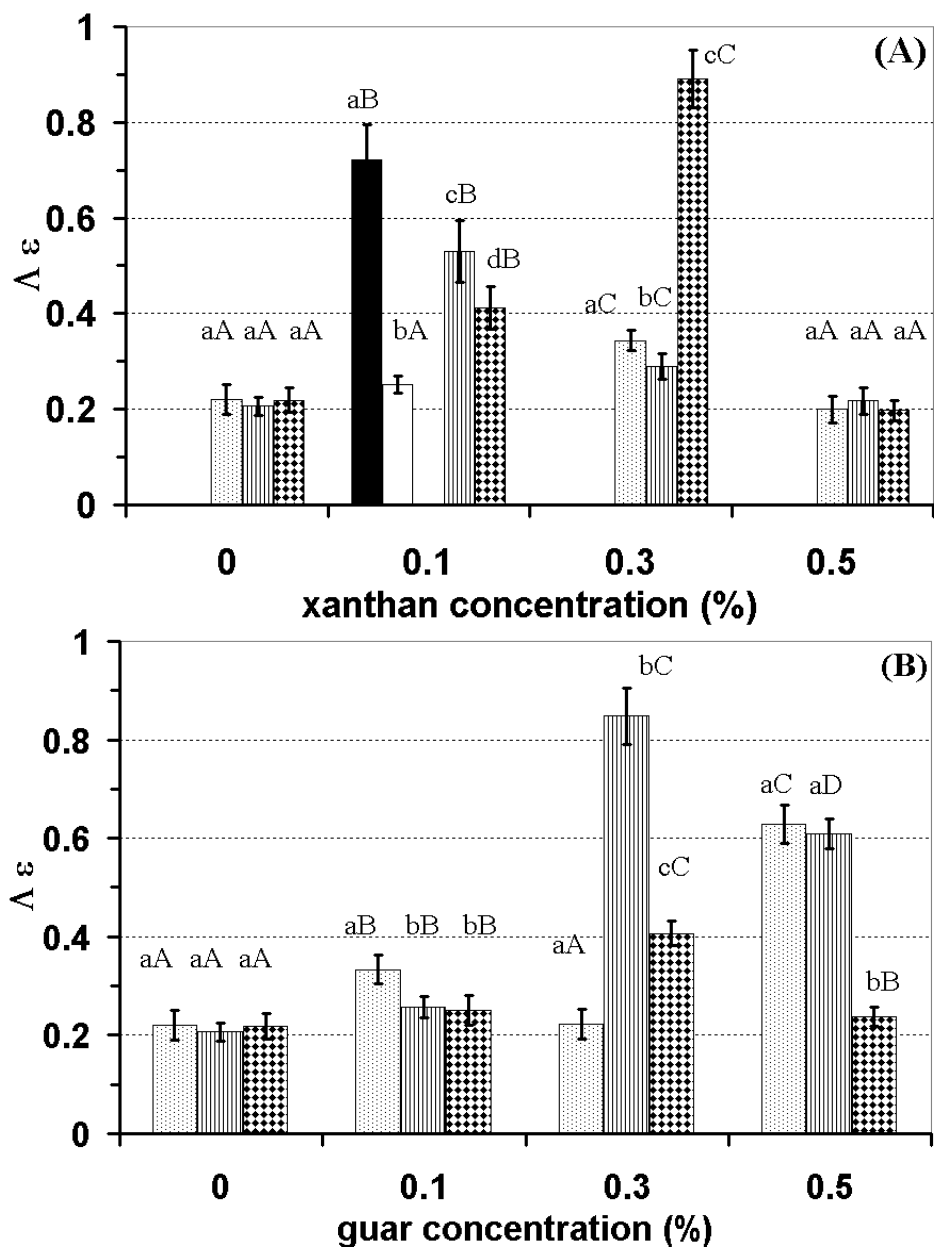







Figure 12: Lacunarity ($\Delta\varepsilon$) obtained during a box count procedure, at a reference box of 100 pixels. (A) are WPI-xanthan cold set gels and (B) WPI-guar cold set gels. Gels pH:  pH 5.2,  pH 4.7 and  pH 4.2. 0.1% xanthan phase separated gels at pH 5.2:  top phase and  bottom phase. Bars represent standard deviation from scanning each image in 4 grids position. Different letters means significant differences ($p < 0.05$). Small letters: differences amongst the gels pH in each formulation. Capital letters: differences amongst formulations in each pH.

The pure WPI cold set gels showed very similar lacunarity independent of pH in the same way of fractal dimension (Figure 12). The heterogeneous 0.1% xanthan gels at final pH 5.2 showed higher lacunarity values at top phase. In contrast, the bottom phase was comparable to pure WPI gels (Figure 12 A). The homogeneous xanthan gels exhibited at final pH 4.7 an increase in lacunarity with addition of small amounts of xanthan (0.1% w/w) followed by a decrease to similar values for pure WPI gels at higher xanthan concentrations. At final pH 4.2 it was observed a similar behavior but the increase in lacunarity occurred with addition of 0.3% xanthan, followed to the decrease at 0.5% (w/w). Mixed guar-WPI gels exhibited higher values of lacunarity with the increase in polysaccharide concentration at pH 5.2 and 4.7 (Figure 12 B). In contrast, at pH 4.2 the lacunarity values showed lower variation with increase in guar concentration than at other pH values. These results might be a consequence of the gelation kinetics. At lower acidification rates, the systems stays more time at pH >pI. At this situation the phase separation phenomena overcomes the gelation one, leading to a more open and heterogeneous structure as compared to the fast acidification case.

The similar D_f and lacunarity values of pure WPI gels could be associated to a similar aggregation of the denatured whey proteins. In spite of these results, mechanical properties values depended on acidification rate and final pH. In general, at lower acidification rates and higher pHs stronger and more brittle gels were observed (Chapter 4), which was not possible to discern in the lacunarity analysis.

The reduction on D_f values with xanthan addition at intermediate concentrations was In contrast, at pH 4.2 the lacunarity values were not significantly different as compared to pure WPI gels probably related to an increase in protein-polysaccharide interactions and

a decrease of protein aggregation, which in turn resulted in higher lacunarity and greater network discontinuity. The protein network condensation in local zones of the structure formed smoother networks (Figures 2 to 5) resulting in decreased complexity of fractal dimension (27). However, a further increase in xanthan concentration (0.5% w/w) led to a recovery on D_f values to similar values observed for pure WPI gels, which could be correlated to an enhanced of protein-xanthan interactions, forming a more continuous network, as observed in the increase of elasticity modulus at final pH 4.2 (Figure 7 A). Similar behavior was observed for lacunarity values. However, these structural differences were not observed in the mechanical properties results. The lower lacunarity of mixed guar-WPI gels at final pH 4.2 would be associated to an increase in protein-protein interactions due to the higher acidification conditions resulting in stronger gels if compared to xanthan-WPI gels. In contrast, the higher lacunarity of mixed guar-WPI gels at final pH 5.2 would be associated to a decrease in such interactions due to depletion volume effects. In fact such gels exhibited lower elasticity modulus (Figure 7 B). However, the increase in guar addition led to an increase in lacunarity, probably associated to a continuous phase inversion from protein to polysaccharide (9), resulting in formation of non-self supported gels.

4 Conclusion

The results obtained in this studied showed that addition of xanthan or guar to whey protein solutions before the system acidification led to a great modification on properties of whey protein isolate cold set gels. Such modifications depended strongly on polysaccharide type, polysaccharide concentration, acidification condition and final pH of the gel. Despite the specific differences of biopolymer interactions of each polysaccharide used, the results

suggest that in both types of mixed gels the final properties were a result of a competition among three phenomena that occurred simultaneously during the acidification process; 1) segregative phase separation at initial step of acidification, 2) gelation resultant from the reduction of pH towards the pI of the main WP, 3) aggregative interactions between the positive charged protein and negative charged polysaccharide at $\text{pHs} < \text{pI}$. At lower acidification rates and higher final pH phase separation phenomena was favored due to an increased time of system permanence at higher pH values and the end of the process at a pH value higher than the BSA and α -La pI, resulting in an increase of microstructure discontinuity. In such case, the gels were weaker and less elastic. In contrast, at higher acidification conditions and lower final pHs gelation phenomena was predominant, favoring the structure formation with lower. As a result, it was produced mixed gels with stronger and more elastic structure. The image analyses were important to quantitatively describe the great variety of microstructure attributes in terms of the fractal dimension and system lacunarity. The fractal dimension analysis allowed to describe the differences in aggregation or structure complexity, while lacunarity was a parameter that quantified the microstructure discontinuity. Fractal dimensions values ranged between 1.55 and 1.85 and were dependent on pH and xanthan concentration while for WPI-guar gels they were more influenced by the polysaccharide concentration. However, lacunarity values could be related to mechanical properties and would be a good quantitative measurement of microstructure that reflects its mechanical strength.

6. Acknowledgements

This research was supported by FAPESP (04/08517-8) and CNPq, (140506/2003-9).

References

- (1) Clark, A. H.; Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B., Globular protein gelation - theory and experiment. *Food Hydrocolloids* **2001**, 15, 383-400.
- (2) Bryant, C. M.; McClements, D. J., Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, 9, 143-151.
- (3) Ju, Z. Y.; Kilara, A., Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1830-1835.
- (4) Morr, C. V.; Ha, E. Y. W., Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, 33, 431-476.
- (5) Alting, A. C.; de Jongh, H. H. J.; Visschers, R. W.; Simons, J., Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4682-4689.
- (6) Alting, A. C.; Hamer, R. J.; De Kruif, C. G.; Paques, M.; Visschers, R. W., Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids* **2003**, 17, 469-479.
- (7) Alting, A. C.; Hamer, R. J.; De Kruif, C. G.; Visschers, R. W., Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3150-3156.
- (8) Sanchez, C.; Zuniga-Lopez, R.; Schmitt, C.; Despond, S.; Hardy, J., Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *Int. Dairy J.* **2000**, 10, 199-212.
- (9) de Jong, S.; van de Velde, F., Charge density of polysaccharides controls microstructure and large deformation properties of mixed gels *Food Hydrocolloids* "in press". **2007**.

- (10) Syrbe, A.; Bauer, W. J.; Klostermeyer, N., Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 179-193.
- (11) Mandelbrot, B., *The fractal geometry of nature*. Freeman Press, New York, 1983; p.468.
- (12) Kaye, B. H., *A random walk through fractal dimensions*. First ed.; VHC Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, 1989; p.421.
- (13) Hagiwara, T.; Kumagai, H.; Matsunaga, T., Fractal analysis of the elasticity of BSA and beta-Lactoglobulin gels. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3807-3812.
- (14) Hagiwara, T.; Kumagai, H.; Nakamura, K., Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. *Food Hydrocolloids*. **1998**, 12, 29-36.
- (15) Shih, W. H.; Shih, W. Y.; Kim, S. I.; Liu, J.; Aksay, I. A., Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. *Phys. Rev. A* **1990**, 42, 4772-4779.
- (16) Dàvila, E.; Perés, D., Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis. *Food Hydrocolloids* **2007**, 21, 147-153.
- (17) Kalab, M., Practical aspects of electron-microscopy in dairy research. *Food Structure* **1993**, 12, 95-114.
- (18) Olsson, C.; Langton, M.; Hermansson, A. M., Microstructures of beta-lactoglobulin/amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids* **2002**, 16, 111–126.
- (19) Langton, M.; Hermansson, A. M., Image analysis of particulate whey protein gels. *Food Hydrocolloids* **1996**, 10, 179-191.

- (20) Loren, N.; Langton, M.; Hermansson, A. M., Confocal laser scanning microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/maltodextrin gels. *Food Hydrocolloids* **1999**, *13*, 185–198.
- (21) Martens, H. J.; Thybo, A. K., An integrated microstructural, sensory and instrumental approach to describe potato texture. *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.* **2000**, *33*, 471-482.
- (22) Hansen, P. H. F.; Rodner, S.; Bergstrom, L., Structural characterization of dense colloidal films using a modified pair distribution function and Delaunay triangulation. *Langmuir* **2001**, *17*, 4867-4875.
- (23) Gonzato, G.; Mulargia, F.; Marzocchi, W., Practical application of fractal analysis: Problems and solutions. *Geophys. J. Int.* **1998**, 132.
- (24) Dziuba, J.; Babuchowski, A.; Smoczynski, M.; Smietana, Z., Fractal analysis of caseinate structure. *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 287–292.
- (25) Quevedo, R.; Carlos, L. G.; Aguilera, J. M.; Cadoche, L., Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *J. Food Eng.* **2002**, *53*, 361-371.
- (26) Pedreschi, F.; Aguilera, J. M.; Brown, C. A., Characterization of food surfaces using scale-sensitive fractal analysis. *J. Food Proc. Eng.* **2000**.
- (27) Barret, A.; Peleg, M., Applications of fractal analysis to food structure. *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 553-563.
- (28) Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.

- (29) Hodge, J. R.; Hofreiter, B. T., Determination of reducing sugars and carbohydrates: Phenol Sulfuric test. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Wistler, R.; L; Wolfman, M. L., Eds. 1st ed. Academic Press: New York, 1962; 380-394p.
- (30) AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC international. Association of Official Analytical Chemists*: 16 th ed.; Patricia Cunniff: Gaithersburg, USA, 1997.
- (31) Cavallieri, A. L. F.; Costa-Netto, P.; Menossi, M.; Cunha, R. L. In *Extensional viscosity of acidified whey proteins isolated gels*, In ICEF9-International Congress on Engineering and Food, Montpellier- France, 2004; p. 110-114.
- (32) Steffe, J. F., *Rheological methods in food process Engineering*. ed.; Freeman Press: East Lansing, USA, 1996; p. 418
- (33) Rasband, W. S. ImageJ, U.S. National Institutes of Health. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- (34) Karperien, A. FracLac advanced user's manual. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/frac-lac.html>
- (35) Pugnali, L. A.; Matia-Merino, L.; Dickinson, E., Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloid Surface B* **2005**, 42, 211-217.
- (36) Bryant, C. M.; McClements, D. J., Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat- denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids* **2000**, 14, 383-390.
- (37) Zasytkin, D. V.; Braudo, E. E.; Tolstoguzov, V. B., Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids* **1997**, 11, 159-170.
- (38) Tolstoguzov, V., Some thermodynamics considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids* **2003**, 17, 1-23.

(39) Cavallieri, A. L. F. Effect of pH and thermal denaturation on rheological properties of whey protein and its thermodynamic compatibility with xanthan. Masters Dissertation, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, 2003.

CAPÍTULO 6

Conclusões Gerais

As principais conclusões obtidas sobre o processo de gelificação a frio das proteínas do soro usando glucona- δ -lactona como precursor ácido são enumeradas a seguir:

1- Desenvolvimento estrutural.

O efeito da velocidade de acidificação na estrutura dos sistemas estudados é relativo ao tempo de observação, sendo possível distinguir dois estágios; antes e após o ponto de gel. Até o ponto de gel, o aumento na velocidade de acidificação não exerceu influência na estrutura da rede, no entanto, o ponto de gel foi mais rapidamente atingido em elevadas taxas de acidificação. A partir do ponto de gel o desenvolvimento estrutural ou o fortalecimento da rede foi influenciado pela velocidade de acidificação, e diferentes características estruturais foram obtidas no pH final de equilíbrio do sistema. A análise das propriedades mecânicas permitiu a avaliação da dinâmica de formação da estrutura sendo possível distinguir efeitos simultâneos de pH, taxa de acidificação e de reorganização molecular no pH de equilíbrio.

A redução do pH causou um aumento na firmeza (tensão de ruptura) e deformabilidade (deformação na ruptura) dos géis. Em valores ligeiramente abaixo do pI da β -Lg (5,0) e em torno do pI da BSA (4,7) houve um aumento na tensão de ruptura entre 2 a 3 vezes o valor observado no pH 5,2. Em um mesmo valor de pH, observou-se que quando os géis foram formados em condição de acidificação lenta, os valores de tensão de ruptura foram até 2 vezes maiores do que os observados quando estes foram obtidos em condições de elevada velocidade de acidificação. Quando o sistema foi acidificado rapidamente, o fortalecimento estrutural ocorreu em menores valores de pH, em torno de 4,2, em um ponto mais distante do pI da principal fração protéica do soro (β -Lg) e da BSA. Esta diferença foi

atribuída ao fato de que em acidificações mais lentas, a organização estrutural ocorreu durante o decaimento de pH, enquanto que nas taxas mais rápidas esta organização foi postergada para o período em que ocorreu a estabilização de pH.

Estes fatos foram correlacionados a um aumento da extensão de interações entre os grupos hidrofóbicos dos agregados protéicos, com a sua subsequente agregação em torno do pI das proteínas, causando a formação e fortalecimento da rede do gel. Na acidificação mais lenta o sistema dispôs de tempo para completar o processo de interação levando a géis mais estruturados. Ao contrário, a acidificação rápida impediu a estruturação da rede devido à rápida queda do pH, afastando-se do pI da principal fração protéica do soro (β -Lg), e terminando por promover uma repulsão eletrostática e conseqüentemente formando géis mais fracos.

Os resultados obtidos indicam que a textura de géis de proteínas do soro formados a frio pela acidificação com GDL pode ser controlada ou modificada pelo controle do valor de pH final do gel ou pela duração do tempo de acidificação. A correlação da textura do gel com o valor de pH estaria relacionada à carga líquida dos agregados protéicos. Dependendo do tempo de acidificação, as interações entre os agregados contribuiriam para as propriedades mecânicas destes sistemas. Estas informações seriam relevantes no contexto de acelerar o tempo de produção de produtos alimentícios acidificados, uma vez que a textura é um importante parâmetro de qualidade destes produtos.

2- Interações moleculares no pH final

Foi observado que no pH final de equilíbrio dos géis, em torno do pI das proteínas do soro, a estrutura foi estabilizada por interações predominantemente eletrostáticas, porém

pontes de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas estão presentes em grande quantidade, em especial em torno do pH 4,2. Este fato poderia estar relacionado à intensificação da velocidade de acidificação para a obtenção destes géis, uma vez que nesta condição o sistema não dispôs do tempo necessário para a interação entre os grupos hidrofóbicos responsáveis pelo fortalecimento da estrutura da rede do gel. Análises complementares (eletroforese em gel de poliacrilamida) das frações solúveis em diferentes tampões mostraram que interações dissulfídicas estavam presentes em menor quantidade. Estas interações foram associadas com a estabilização dos agregados protéicos formados na etapa prévia de aquecimento, anterior à etapa de acidificação.

Os géis apresentaram maiores capacidade de retenção de água em pHs em torno de 5,2 e menores que 4,0, enquanto que a solubilidade em água foi menor em valores de pH 5,2 e 4,2, que correspondem respectivamente aos pIs das frações β -Lg e α -La. A β -Lg foi a fração protéica mais solúvel em água, além de ter um papel significativo na estabilização da rede, ou seja, conferir maior resistência à estrutura, ao mesmo tempo em que forneceu boa capacidade de retenção de água ao sistema. Esta característica estaria associada ao fato de aproximadamente 30% da β -Lg ter permanecido no estado nativo (não desnaturada) após a etapa preliminar de aquecimento para a formação dos agregados protéicos. Assim, os resultados obtidos sugerem que em produtos que utilizam o processo de gelificação a frio de proteínas do soro, a adição de proteínas nativas e não desnaturadas à solução de agregados térmicos, entre as etapas de agregação e gelificação poderia conferir maior estabilidade estrutural aos produtos em conjunto com melhores características de retenção

de água, em particular em torno do pH 5,2. No entanto, uma investigação mais aprofundada seria necessária para a confirmação desta hipótese.

3- Adição de polissacarídeos anteriormente ao processo de acidificação

A adição de polissacarídeos ao sistema protéico levou a uma modificação e a um aumento da complexidade das relações entre microestrutura e propriedades mecânicas dos géis de proteínas do soro formados a frio. Estas relações foram função do tipo de polissacarídeo (aniônico ou neutro), sua concentração, das condições de acidificação e do pH final.

O pH final e a concentração de polissacarídeo foram as variáveis que mais exerceram influência nas propriedades dos géis mistos com xantana, devido a que este é um polímero negativamente carregado. No entanto, a microestrutura destes géis foi resultado não somente da gelificação (fase de redução de pH), mas também da ocorrência de outro fenômeno simultaneamente: a separação de fases (pH inicial e acima do pI das proteínas do soro). A separação de fases levou à formação de poros e descontinuidade na rede, o que foi quantificado por um aumento do parâmetro de lacunaridade obtido a partir da análise de imagem das microscopias destes géis. Como consequência desta estrutura, os géis mistos de proteínas do soro e xantana foram mais fracos, mostrando valores de tensão de ruptura até 3 vezes menores do que os géis puros de proteínas do soro, enquanto que a deformabilidade (expressa pelos valores de deformação na ruptura dos géis) foi até 2 vezes menor do que os géis protéicos puros. No entanto, o módulo de elasticidade dos géis de proteínas do soro-xantana aumentou com a concentração de xantana no pH final 4,2 o que foi associado a um aumento das interações eletrostáticas entre este biopolímeros nos menores valores de pH final. Este efeito também foi observado por uma redução nos

valores de dimensão fractal obtidos a partir das microscopias destes géis, o que foi relacionado à formação de redes de gel mais lisas e menos recortadas. Este fato foi relacionado a uma intensificação do processo de gelificação em menores valores de pH final em torno do pI da fração α -La (pH final 4,2), devido à intensificação das interações proteína-proteína e/ou proteína-xantana. Menores valores de pH e maiores concentrações de xantana levaram à formação de géis com estrutura mais contínua e homogênea (menos porosa) e, portanto, mais resistentes e elásticos do que nos maiores valores de pH final 5,2 e 4,7.

Os aumentos da concentração de polissacarídeo e da taxa de acidificação foram as variáveis predominantes nas propriedades dos géis mistos WPI-guar. O aumento da descontinuidade da estrutura com a concentração de guar mostrou que esta ocupou os espaços do sistema e levou à concentração das proteínas em zonas da rede (efeitos de exclusão de volume). Na condição de acidificação lenta, a exclusão de volume impediu a interação proteína-proteína e formação da rede, resultando em géis mais fracos e menos elásticos. Com o aumento da taxa de acidificação, o sistema permaneceu menos tempo em valores de pH acima do pI das frações do soro, favorecendo a interação entre as proteínas do soro, compensando o efeito negativo de exclusão de volume na estrutura dos géis. Isto causou um fortalecimento dos géis, ao contrário do que ocorria em valores de pH em torno do pI da β -Lg. No entanto, nas duas condições de acidificação, o aumento da concentração de guar levou a uma inversão da fase contínua de proteína para polissacarídeo, o que aumentou a descontinuidade da rede, conforme visualizado pelo aumento do valor de lacunaridade. Com isso, impediu-se a formação de géis auto-sustentáveis em maiores

concentrações de guar. O efeito de exclusão de volume, proporcionado pela adição de guar aos géis de proteínas de soro, levou à formação de uma rede de gel mais lisa, o qual foi visualizado pela redução dos valores de dimensão fractal obtidos a partir da análise de imagem das microestruturas destes sistemas.

Os resultados obtidos mostraram que o entendimento das interações entre os ingredientes, bem como dos efeitos das condições de processo sobre as propriedades físicas (especialmente a textura) de géis de proteínas do soro formados a frio é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos para a indústria de alimentos. Assim, a utilização de variadas condições de gelificação devido à modificação das concentrações dos componentes ou a adição de polissacarídeos com diferentes densidades de carga pode ser aplicada na produção de alimentos com reduzido teor de gordura ou alto valor nutricional mantendo-se características ótimas de textura.

ANEXOS

ANEXO 1 – Conceitos básicos de fractais

“A comunidade científica se surpreenderá e se encantará em encontrar não apenas as descrições de formas em que eles possam chamar de granulosas, fibrosas, esféricas, ramificadas, tortuosas, descontínuas, etc, mas em encontrar daqui por diante uma maneira vigorosa e rigorosa em descrever formas de uma maneira mais matemática e quantitativa” [MANDELBROT, 1983].

Os alimentos, assim como a grande maioria dos materiais na natureza, são inerentemente irregulares na sua conformação estrutural. Assim, muitos dos adjetivos citados acima por Mandelbrot são parâmetros qualitativos de descrição das diferentes formas da natureza, não sendo uma tarefa fácil descrever a estrutura irregular dos materiais de maneira quantitativa. Deve-se ainda considerar, em se tratando da análise microestrutural dos elementos, os padrões de forma se repetem ou se modificam quando analisados em diversas escalas de magnificação, partindo da estrutura visual até níveis microscópicos na ordem de micrômetros ou mesmo nanômetros.

A aplicação da dimensão fractal foi primeiramente utilizada para se descrever a costa da Grã Bretanha [MANDELBROT, 1967]. Observou-se que com constantes divisões da costa da Inglaterra, o número de partes obtidas não seguia o fator de escala empregado ao mesmo tempo em que as partes divididas eram semelhantes em forma [MANDELBROT, 1983].

O conceito de fractal foi proposto por MANDELBROT [1983] como uma maneira de descrever dimensões transcendendo a geometria Euclidiana clássica (linhas e superfícies), pois indica o grau em que uma imagem ou objeto se desvia das dimensões clássicas de continuidade e regularidade.

Fractais são em essência padrões de dimensões que não seguem uma relação linear de escala. Um quadrado de lado L é um exemplo de geometria que segue padrões lineares de escala, pois fornece 2 partes quando dividido ao meio (fator de redução $1/2$), fornece 4 partes quando dividido em 4 (fator de redução $1/4$) e assim por diante. Sendo assim, o número de partes é igual à escala em que se realizam as observações.

$$N(\text{partes}) = (\text{fator de escala}, f)^{-1} \quad (\text{A1.1})$$

Pode-se ainda dizer que com relação ao fator de escala:

$$\text{Comprimento } (L) \approx \text{área superficial } (L^{1/2}) \approx \text{volume } (L^{1/3}) \quad (\text{A1.2})$$

No entanto, estruturas e imagens com elevado grau de auto-similaridade em função da escala não seguem os expoentes anteriormente descritos na equação A1.2. Em se tratando de fractais de Koch (Figura A1.1) a divisão da imagem em um fator de redução $1/3$ levará à obtenção de 4 partes. Observa-se, portanto que o expoente da equação A1.2 corresponderá a um número não inteiro e igual a $1,26$.

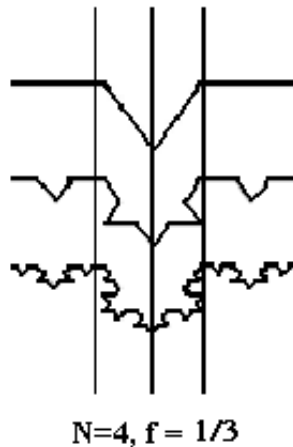


Figura A1.1: Fractais de Koch [KARPERIEN, 2004].

MANDELBROT [1983] propõe que uma dimensão fractal é uma medida da complexidade estrutural expressa pelo fator de escala, comparando-se o número de novas

partes com a escala de divisão. Um exemplo clássico deste comportamento pode ser visualizado dividindo-se uma folha de samambaia em n partes, conforme visualizado na Figura A1.2.

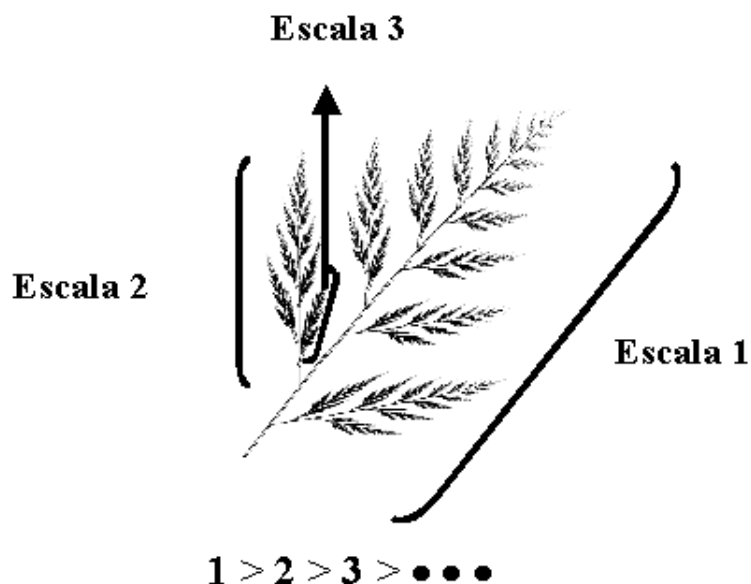


Figura A1.2: Padrões de similaridade (“self similarity”) da estrutura ramificada de uma folha de samambaia.

Podemos transpor este exemplo para a descrição da microestrutura de praticamente todos os materiais encontrados na natureza [MANDELROT, 1983]. Sendo assim, as associações de partes similares formam estruturas com elevado grau de auto similaridade como na estrutura contínua de géis de proteínas globulares.

Os valores de dimensão fractal variam entre as dimensões convencionais 1, 2 e 3, o que implica que os fractais não são nem dimensões Euclidianas (dimensões expressas por números inteiros) ou superfícies regulares ($D=2$) ou sólidos geométricos ($D=3$) [BARRET & PELEG, 1995]. Os fractais vão além das representações geométricas Euclidianas indicando o grau em que uma imagem ou objeto desvia das geometrias planas e regulares:

por exemplo: um objeto ou imagem com dimensão fractal entre 1 e 2 descreve o “nível de preenchimento em área” de uma linha com elevado grau de irregularidade e dobrada sobre si mesma, uma dimensão fractal entre 2 e 3 descreve a “capacidade de preenchimento espacial” de um sólido de superfície altamente irregular e rugosa [BARRET & PELEG, 1995].

Lacunaridade é uma medida complementar à dimensão fractal que descreve a distribuição e tamanho dos espaços vazios ou a textura deste fractal [MANDELBROT, 1983]. De maneira geral, se um fractal tem grandes espaços vazios ou buracos, este possui lacunaridade alta; por outro lado, se um fractal é quase invariante à translação de escala, tem baixa lacunaridade. Podem ser construídos fractais diferentes que tenham a mesma dimensão, mas que parecem extremamente diferentes porque eles têm lacunaridade diferentes. Há aplicações desta propriedade no processamento de imagens, ecologia, astronomia, e mesmo na medicina.

ANEXO 2 - Análise de imagem para a análise fractal

Neste tópico será apresentada uma abordagem simplificada para demonstrar o procedimento de tratamento de imagem empregado para a análise fractal de géis protéicos a partir das imagens do sistema obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Não serão abordados especificamente os conceitos complexos do tratamento de imagem, como por exemplo, os conceitos fundamentais de aquisição e realce de imagens, ou os aspectos matemáticos e de modelagem numérica associados ao processo. No entanto, estes conceitos podem ser encontrados em maior profundidade na literatura [KARPERIEN, 2004, RUSS, 2005].

O primeiro ponto da análise de imagem se refere à escolha do modelo de cor adequado. Os modelos de cor são padrões que descrevem as imagens numericamente [LIMA, 2005, RUSS, 2005]. Existem diferentes métodos de descrever a imagem numericamente, e o modo de cor determina qual método ou codificação numérica será usado para representar a imagem. Os métodos comumente encontrados são aqueles que codificam as imagens em diferentes canais de cor, sendo os mais comuns o modo RGB (red, green and blue), CMYK (cyan, magenta, yellow and black), escala de cinza (grayscale onde os canais de cor são níveis de cinza entre preto e branco) e ainda o método L-a-b [LIMA, 2005]. Em cada um destes modos, a combinação dos diferentes canais de cor irão compor os diferentes padrões de cores associados à imagem, conforme apresentado na Figura A2.1 para o padrão RGB.

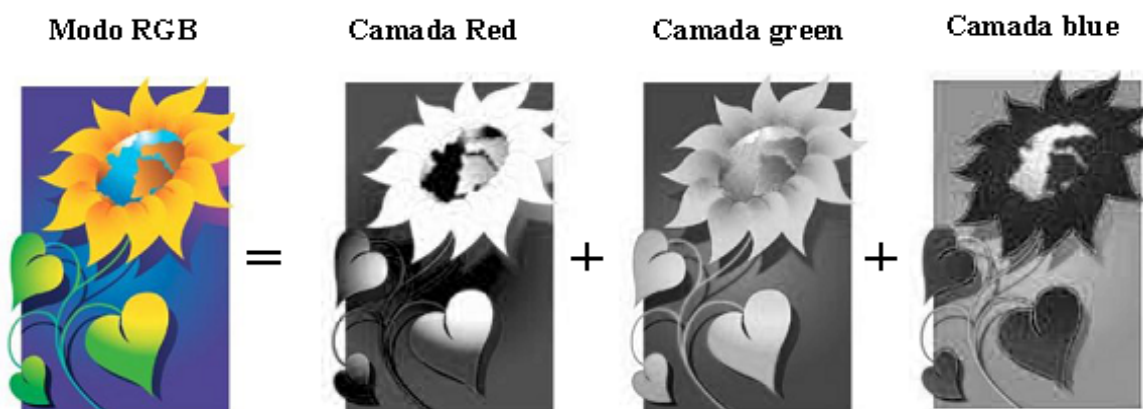


Figura A2.1: Exemplificação do modo de cor RGB. As cores da imagem correspondem a uma sobreposição das diferentes camadas de cor.

Da Figura A2.1 é possível notar um princípio muito importante para a análise de imagem, que corresponde à seleção dos pixels referentes à zona de interesse da imagem. A determinação dos limites de interesse (“thresholding”) esta baseada no fato de que as imagens podem ser processadas permitindo a seleção de estruturas ou padrões que são essencialmente representados por camadas específicas de cor ou intensidade de brilho. A seleção destas camadas pode ser feita de diversas formas, inclusive pela combinação de uma ou mais camadas específicas, desde que o resultado da combinação seja a zona de interessa da imagem [RUSS, 2005]. Da Figura A2.1, por exemplo, pode se notar que a seleção da camada “red” levou a se isolar da imagem os padrões correspondentes à cor amarela da estrutura da imagem da flor. A seleção de estruturas (“thresholding”) pode ser feita utilizando-se uma série de softwares disponíveis, permitindo em seguida as medidas quantitativas de cada padrão estrutural da imagem, permitindo assim a diminuição do grau

de subjetividade inerente a análise de imagens, assim como a correlação destes valores quantitativos com propriedades físicas do sistema [LANGTON & HERMANSSON, 1996].

Para a análise da estrutura fractal de um material utilizando o software ImageJ o formato adequado da imagem corresponde ao modo greyscale e isto por se tratar de um modo com apenas uma camada de cor cinza onde as diferenças de estruturas serão atribuídas à intensidade de pixels da imagem e não ao padrão de cor (binarização). Sendo assim, estruturas proeminentes e protuberantes serão representadas por pixels tendendo ao branco, enquanto que pontos escuros e de profundidade serão representados por pixels pretos. A mesma relação é possível considerando estruturas coradas por reagentes de especificidade em pontos pré-determinados do sistema, como no caso de microscopia confocal de varredura laser, onde os diferentes pontos em escala de cinza serão relativos à estrutura corada do sistema [VAN DE VELDE, et al., 2003]. A Figura A2.2 exemplifica este processo de binarização de imagem, empregado para a seleção do contorno de uma célula neuronal a partir de uma imagem de microscopia óptica.

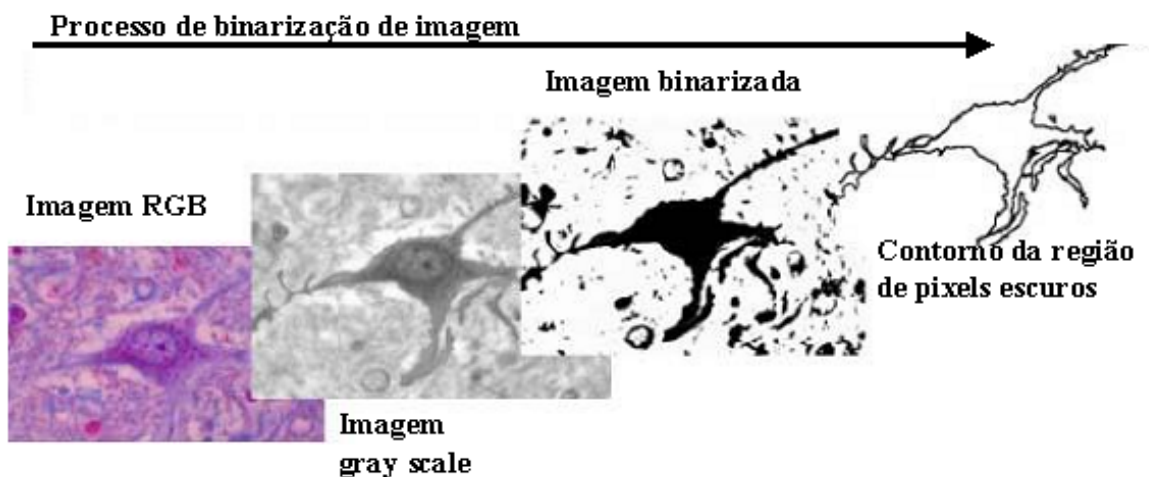


Figura A2.2: Preparação para a determinação da dimensão fractal do contorno de uma célula neuronal. Adaptado de [KARPERIEN, 2004].

A imagem original foi convertida do modo RGB para grey scale utilizando o software ImageJ [RASBAND, 2006], em seguida foram selecionados os pixels correspondentes aos pontos escuros (célula corada) e em seguida selecionado o contorno, utilizando os comandos de digitalização disponíveis no programa [RASBAND, 2006].

A.1 Determinação do limite de nível de cinza (TL_F) para a análise fractal

Uma das etapas mais relevantes na análise fractal é a determinação dos níveis de cinza ou “grey level” (GL) da imagem que correspondem à estrutura que se deseja analisar. Este processo corresponde ao processo de determinação quando um pixel em particular da imagem faz parte do objeto a se analisar ou simplesmente faz parte do fundo (background) da imagem. Estes limites de separação dos níveis de cinza (GL) são chamados de “threshold limits in fractal analysis” (TL_F). No formato de escala de cinza o nível de cinza, “grey level” (GL), varia entre 0 (pixels totalmente pretos) a 255 (pixels totalmente brancos) [LIMA, 2005]. A maneira de se definir os níveis de cinza que corresponderão à estrutura do objeto (threshold level ou TL_F) deve ser padronizada de forma a permitir uma análise

adequada entre as diferentes imagens que se deseja analisar [KARPERIEN, 2004]. Qualquer pixel com intensidade de cinza (GL) maior ou igual ao nível TLF é considerado ser parte do objeto (foreground), enquanto que qualquer pixel da imagem com GL menor que TLF é considerado ser parte do fundo ou background da imagem [KARPERIEN, 2004].

Vários trabalhos de análise fractal de sistemas protéicos a partir de análise de imagem são encontrados na literatura [HAGIWARA, et al., 1997, HAGIWARA, et al., 1998], no entanto os métodos para a determinação de TL_F são detalhadamente relatados apenas na literatura recente [ALTING, et al., 2003, DÁVILA & PERÉS, 2007, PUGNALONI, et al., 2005]. De maneira geral os métodos para estabelecer o TL_F são bastante variados assim como as técnicas para a obtenção da imagem. Os autores relatam que as escolhas dos critérios objetivam a representação mais precisa possível da relação entre a estrutura que se deseja analisar e plano de fundo que se considera como a porosidade do sistema.

Utilizando técnicas de microscopia confocal para o estudo de géis de caseína com adição de sacarose PUGNALONI, et al. [2005] considerou que o total de GL na imagem é proporcional à quantidade de proteína no sistema. Uma vez que nesta técnica as estruturas visíveis correspondem à proteína presente no sistema, os autores determinaram um nível de GL médio relativo à quantidade de proteína no sistema para determinar os níveis de TLF. No entanto, relatam que neste critério ocorreu uma subestimação da porosidade, pois entre os diferentes tratamentos estudados, parte dos poros da imagem foram contabilizados como estrutura. ALTING, et al. [2003] utilizou microscopia confocal para a avaliação do efeito da concentração de proteína na gelificação a frio de isolado protéico de soro por

acidificação com GDL. Os autores relatam que para determinar TL_F consideraram o valor médio de GL das imagens, utilizando como TL_F valores de 20% acima e abaixo do ponto médio da distribuição de GL da imagem. Recentemente, [DÀVILA & PERÉS, 2007] utilizou microscopias MEV para o estudo da organização fractal de géis de proteínas de plasma formados pelo aquecimento. Para a análise fractal do sistema os autores utilizaram o programa ImageJ [RASBAND, 2006] equipado com o plug in FracLac [KARPERIEN, 2004]. Neste trabalho foi definido o limite de TL_F como o valor médio do histograma da distribuição de GL das imagens.

Apesar da grande variação dos métodos empregados para a determinação dos valores de TL_F na literatura, os autores concordam em um ponto: a obtenção da imagens deve ser padronizada para minimizar os erros associados a comparação entre as diferentes imagens no sistemas estudados e que o método de determinação de TL_F deve ser padronizado mesmo que diminua a precisão da separação dos pixels da imagem. Um outro ponto que também deve ser ressaltado é que a porosidade do sistema se distribui de maneira tridimensional e é necessário ser muito criterioso na descrição dos parâmetros obtidos, uma vez que as imagens correspondem a vistas binarizadas da estrutura. No entanto, as imagens binarizadas e os parâmetros dela obtidos podem ser utilizados como fatores de comparação dos efeitos dos diferentes tratamentos estudados na estrutura do sistema em análise.

Para a demonstração do tratamento pode se visualizar a micrografia da estrutura de um gel de proteínas de soro formado a frio pela acidificação com GDL e adição de 0,3% de goma guar (Detalhe da Figura A2.3).

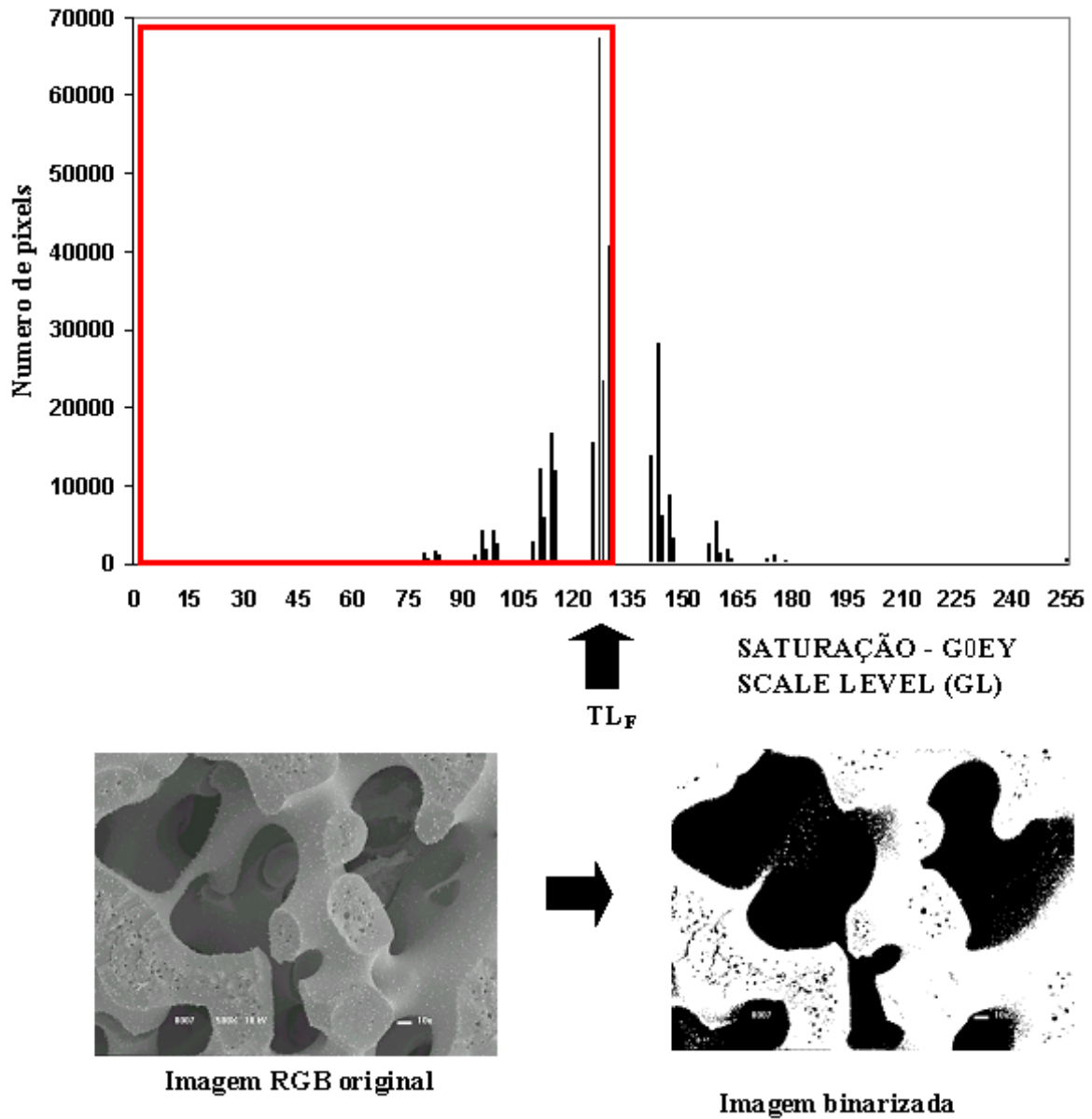


Figura A2.3: Distribuição do nível de cinza, “Grey level”, (GL) da imagem original mostrada no detalhe. A imagem binarizada correspondente também é mostrada no detalhe. O limite de nível de cinza (TL_F) utilizado na análise fractal das imagens foi apontado pela seta.

Neste trabalho foi utilizado o método de TL_F proposto por [DÀVILA & PERÉS, 2007] que consiste na determinação do ponto médio do histograma de distribuição de GL da imagem. A imagem original mostrada na Figura A2.3 consiste de 640 pixels em comprimento por 480 pixels de largura. A imagem obtida foi convertida do modo RGB para greyscale e a Figura A2.3 mostra a distribuição de GL após a conversão.

Pode se visualizar que a região demarcada como $GL < TL_F$ (quadro em vermelho na Figura A2.3) está associada a regiões de GL tendendo ao preto, o que corresponde às regiões mais profundas da estrutura sendo estas demarcadas como fundo (background). Estas regiões correspondem à zonas em preto da imagem binarizada e estão associadas às regiões correspondentes à porosidade do sistema, enquanto que a região acima de TL_F correspondem às regiões de estrutura do primeiro plano da imagem.

Determinação das propriedades fractais das imagens binarizadas utilizando o método de Box count

1 Dimensão fractal D_f

Devido a sua simplicidade e facilidade de implementação, o Box Counting é um dos métodos mais conhecidos e utilizados para estimar a dimensão fractal de objetos e imagens. Sua aplicação consiste em sobrepor uma malha de quadrados ou grades à forma sob análise, de modo a obter o número de quadrados necessários para cobri-la. A contagem se refere ao número de caixas que contém pixels associados à estrutura da imagem em análise (caixas contendo pixel correspondem ao número de partes ou detalhes). A Figura A2.4 apresenta a representação esquemática deste método.

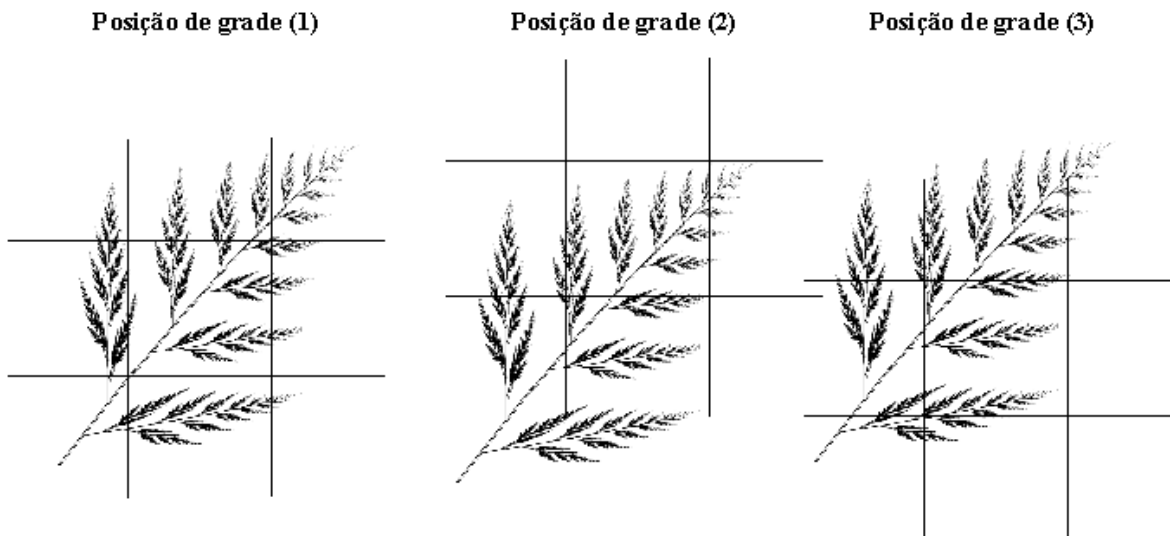


Figura A2.4: Posicionamento de grades sobre a estrutura fractal de uma imagem fractal. As grades são posicionadas em diferentes posições das imagens de forma a contabilizar a heterogeneidade da imagem durante a contagem.

Diferentes posições de grades são necessárias durante o processo de contagem para avaliar a heterogeneidade da imagem. Na posição (1) o número de partes com detalhes correspondem a 9 caixas. Já na posição (2) o número de caixas com detalhes corresponde a 5, e na posição (3) correspondem à 7.

Dada uma forma A , o número de caixas que contém parte da forma A , $N_r(A)$, varia de acordo com o tamanho da caixa, r , seguindo a relação:

$$N_r(A) = \mu r^{-D_f} \quad (\text{A2.1})$$

A relação acima corresponde a uma relação de escala entre o número de caixas que contém detalhes da imagem $N_r(A)$ e o tamanho da caixa r , sendo μ uma constante e D_f a

dimensão fractal do objeto da imagem. A partir desta relação é possível determinar a dimensão fractal como sendo:

$$Df = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\ln(Nr(A))}{\ln(r)} \quad (A2.2)$$

Tal solução adiciona o problema do cálculo de um limite. Esse problema pode ser resolvido adaptando-se o cálculo do limite para um espaço discreto, onde a contagem de caixas, $Nr(A)$, é realizada para diferentes valores de r . Faz-se então necessário definir um conjunto B com os vários tamanhos de lados r que serão utilizados nas diversas iterações do método. Tal conjunto pode ser definido inicialmente pelo usuário do método. No entanto, é padrão calculá-lo com base nas dimensões da forma sob análise, de modo que:

$$\forall r_i \in B \quad \left\{ \begin{array}{l} r_0 = (\text{altura} * \text{largura})_0 \\ r_{i+1} = r_i / 2 \end{array} \right. \quad (A2.3)$$

A partir da regressão do gráfico log-log de $N(A)$ (número de caixas ocupadas) por r (tamanho do lado dessa caixa) obtém-se a aproximação de uma reta, cujo coeficiente angular é α . Deste modo, é possível definir $D = -\alpha$ e como sendo a dimensão fractal de A
 $Df = \alpha + 1$

2 Lacunaridade

A lacunaridade é uma medida baseada no grau de invariância a translação que um fractal apresenta. Ela caracteriza a maneira como os pixels estão distribuídos e organizados em uma determinada região da imagem, ou seja, ela quantifica como o espaço está preenchido, diferente da dimensão fractal que mede o quão preenchido está o espaço.

A lacunaridade (A) é calculada como a variação no número de pixels em uma dada posição de caixa sobre uma imagem, durante um método de box counting padrão, seguindo a equação (A2.4):

$$\Lambda\varepsilon = CV = \left(\frac{\sigma}{\mu}\right)^2 \quad (\text{A2.4})$$

onde $\Lambda\varepsilon$ é a lacunaridade para uma grade com caixas de tamanho ε . A lacunaridade depende do quadrado do coeficiente de variação de pixels (CV), σ sendo o desvio padrão da contagem de pixels entre todas as caixas de um tamanho ε , e μ a media de pixels na contagem de caixas de mesmo tamanho.

De fato, a lacunaridade pode ser compreendida como um complemento da dimensão fractal, uma vez que formas com a mesma dimensão fractal podem apresentar diferentes valores para a lacunaridade. A lacunaridade é obtida medindo-se a distribuição espacial dos buracos existentes na imagem. Por meio dela é possível quantificar a homogeneidade de uma imagem ou de parte dela em função da escala, de modo a torná-la comparável com outras imagens. Este conceito pode ser exemplificado pela Figura A2.5.

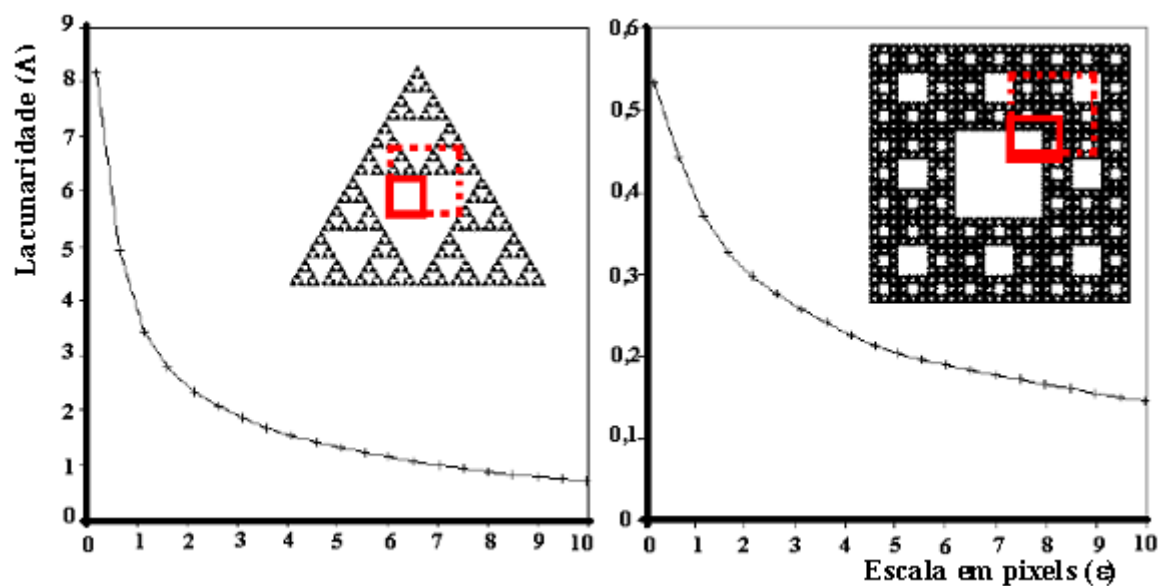


Figura A2.5: Imagens com diferentes padrões de distribuição de espaços em função da variação da escala de segmentação da imagem (representada em vermelho). Adaptado de [BOURKE, 2004].

Na Figura A2.5 o objeto é considerado pelos pixels pretos enquanto que os espaços vazios são os pixels brancos. Comparando-se regiões da imagem em valores de segmentação de 10 pixels da imagem original, durante o procedimento de box counting (representado em vermelho na Figura A2.5) o quadrado apresenta menor lacunaridade que o triângulo, sendo portanto mais homogêneo. Quando a imagem não apresenta variação de distribuição de pixels ao longo da variação de escala, sua lacunaridade será correspondente a zero, conforme visualizado na Figura A2.6.

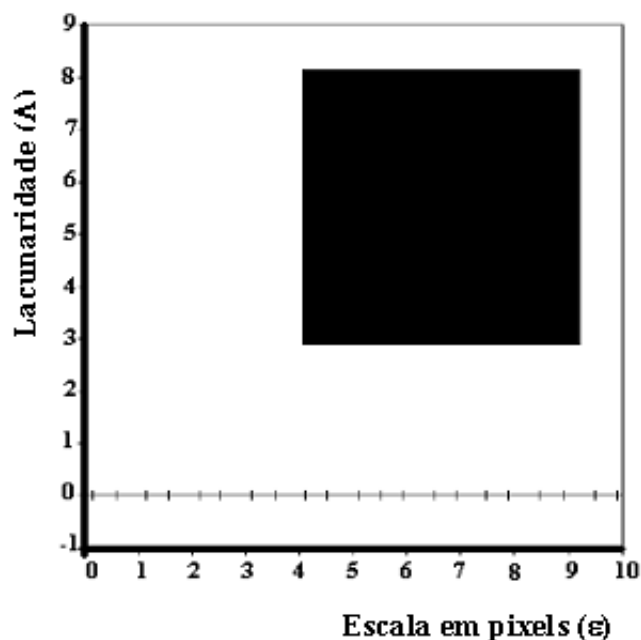


Figura A2.6: Distribuição de espaços em função da variação da escala de segmentação da imagem para uma imagem de distribuição de pixels homogênea. Adaptado de [BOURKE, 2004].

REFERENCIAS

- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 3150-3156, 2003.
- BARRET, A.; PELEG, M. Applications of fractal analysis to food structure. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 6, p. 553-563, 1995.
- BOURKE, P. **Lacunarity**. Disponível em: <<http://local.wasp.uwa.edu.au>>. Acesso em: 30/ago./2006. 2004.
- DÀVILA, E.; PERÉS, D. Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 147-153, 2007.

- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T. Fractal analysis of the elasticity of BSA and beta-Lactoglobulin gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3807-3812, 1997.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; NAKAMURA, K. Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-36, 1998.
- KARPERIEN, A. **FracLac advanced user's manual**. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/frac-lac.html>>. Acesso em 25/jan./2007: 2004.
- LANGTON, M.; HERMANSSON, A. M. Image analysis of particulate whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 179-191, 1996.
- LIMA, C. E. F. **Adobe® Photoshop CS**. 1ª. ed. São Paulo: 2005. 236 p.
- MANDELBROT, B. How long is the coast of Britain, statistical self similarity and fractional dimension. **Science**, New York, v. 156, n. 3775, p. 636-638, 1967.
- MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York: Freeman Press, 1983. 468 p.
- PUGNALONI, L. A.; MATIA-MERINO, L.; DICKINSON, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 42, n. 3-4, p. 211-217, 2005.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U.S. National Institutes of Health. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 2006.
- RUSS, J. C. **Image analysis of food microstructure**. first ed. Washington: 2005. 363 p.
- VAN DE VELDE, F.; WEINBRECK, F.; EDELMAN, M. W.; VAN DER LINDEN, E.; TROMP, R. H. Visualization of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 31, n. 1-4, p. 159-168, 2003.