

AUTORES
AUTHORS

✉ **Fernando Oieto ELIAS**¹
Caroline Dário CAPITANI²
Sara MOLINA³
Maria Cristina AÑON³
Maria Teresa Bertoldo PACHECO^{2*}

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil;

²Centro de Química e Nutrição Aplicada,
Instituto de Tecnologia de Alimentos,

CP. 139, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil;

³Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos,
Universidad nacional de La Plata/ CONICET, Argentina.

*e-mail: mtb@ital.sp.gov.br

RESUMO

Complexos de proteínas com polissacarídeos podem melhorar as propriedades emulsificantes, por contribuir no espessamento da camada aquosa interfacial que recobre os glóbulos de gordura. Neste trabalho proteínas de soro de leite coacervadas com carboximetil celulose (CMC) foram avaliadas com a finalidade de obter equações para explicar o comportamento da capacidade de emulsificação. As amostras foram denominadas de proteínas totais-CMC (PT/CMC), -lactoglobulina-CMC (-Lg/CMC) e -lactoalbumina-CMC (-La/CMC), em função da proteína predominante no complexo coacervado. Dispersões dos coacervados foram preparadas em água (5mg/mL) e emulsificadas com óleo de soja, utilizando um homogeneizador ultraturratec a 23°C. A fase aquosa contendo as amostras foi combinada com óleo em diferentes proporções, mantendo o volume final em 50 mL. Foi utilizado um planejamento experimental de 2², sendo as variáveis independentes o pH e a concentração de NaCl. Emulsões preparadas em diferentes valores de pH foram fotografadas em microscópio óptico de contraste de fase com um aumento de 20 vezes. Os resultados indicaram que a composição protéica do complexo reflete no desempenho da capacidade de emulsificação, sendo o desempenho das frações na capacidade de emulsificação na seguinte ordem: -La/CMC > -Lg/CMC > PT/CMC. Fotos de microscopia mostraram que as emulsões preparadas em pH 6,0 apresentaram maior homogeneidade no tamanho, forma e dispersão das gotículas de óleo.

SUMMARY

Protein complexes with polysaccharides can increase emulsificants properties contributing with the interfacial watery layer thickness that recovers the fat globules. At this study, milk whey proteins coacervate with carboxymethylcellulose (CMC) was evaluated with the purpose of getting equations to explain the behavior of the emulsification capacity. The samples were called total proteins-CMC (PT/CMC), -lactoglobulin-CMC (-Lg/CMC) and -lactoalbumin-CMC (-La/CMC), in function of the predominant protein in the coacervate complex. Coacervate dispersion were prepared in water (5mg/mL) and emulsified with soy oil, using ultraturratec homogenizer at 23°C. An experimental planning of 2² was used, considering independent variable the pH and the concentration of NaCl. Emulsions prepared aim different pH values were photographed with a optical microscope of contrast of phase with an increasing of 20 times. The results indicated that the protein complex composition reflects at the emulsification capacity performance, being the fractions performance of the emulsification capacity at the following order: -La/CMC > -Lg/CMC > PT/CMC. Microscopy photos showed that emulsions prepared at pH 6,0 had higher homogeneity at size, shape and dispersion of the oil drops.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

proteínas de soro de leite, carboximetil celulose,
complexos de proteína-polissacarídeo,
propriedades emulsificantes.
whey protein, carboxymethylcellulose,
protein-polysaccharide
complexes, emulsifying properties.

1. INTRODUÇÃO

Em geral as proteínas são considerados bons agentes emulsificantes porque possuem numa mesma molécula regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais reduzem a tensão superficial e interagem na interface da emulsão (ELIZALDE et al, 1991). Contudo a maioria das proteínas apresenta uma redução ou perda da atividade emulsificante em regiões de pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína, onde a carga líquida e a solubilidade apresentam-se reduzida. Outros fatores que prejudicam a capacidade emulsificante das proteínas são a presença de sais e exposição ao aquecimento.

A interação entre proteínas e polissacarídeos pode ajudar a manter e até otimizar a propriedade emulsificante das proteínas nas faixas de pH próxima ao ponto isoelétrico. A superfície ativa dos complexos proteínas-polissacarídeos, podem ainda, contribuir para a estabilidade das emulsões por aumentar a viscosidade da fase aquosa imediatamente adjacente a interface da emulsão. Geralmente os polissacarídeos são poucos sensíveis à presença de sais no meio e mudanças de pH (PACHECO, 1997; DICKINSON et al, 2003).

Cabe ainda ressaltar, que tanto as proteínas de soro de leite como a carboximetilcelulose (CMC) são polímeros naturais, que possuem a capacidade de atuar como agentes emulsificantes, resultando num grande potencial de uso na indústria de alimentos (GIRARD et al, 2002). Portanto, os complexos podem combinar as excelentes propriedades emulsificantes das proteínas do soro com o efeito estabilizante da CMC (BAEZA et al, 2002, FONSECA et al, 2001).

A proteína γ -lactoglobulina possui atividade emulsificante satisfatória na faixa de pH alcalino, com perda desta habilidade na região de pH ácido. Esta propriedade reflete a reduzida adsorvidade da proteína na interface, devido à perda de flexibilidade da molécula, resultado de interações intermoleculares e enovelamento, causando elevada agregação da proteína. Muitas tentativas de aumentar a capacidade emulsificantes da γ -Lg numa ampla faixa de pH foram realizadas através de técnicas de modificação química da proteína, por aumento da hidrofobicidade, pela introdução de radicais não protetivos a molécula, tais como lipofiliação (AKITA E NAKAI, 1990), acilação (CREUZENET et al, 1992), glicosilação (BERTRAND-HARD et al, 1990), fosforilação (KRAUSE, 2002) entre outras.

A proteína α -La tem mostrado menor atividade emulsificante que a γ -Lg, principalmente na região do ponto isoelétrico, onde não forma emulsão devido à baixa solubilidade e elevada agregação das moléculas. Adicionalmente, sua elevada estabilidade estrutural, fornecida pela presença de 4 ligações dissulfídicas, dificulta o seu desdobramento e flexibilidade a interface água/óleo (KLEMASZEWSKI et al, 1992).

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade emulsificante das proteínas de soro de leite, totais ou fracionadas, coacervadas com carboximetilcelulose e verificar a influência das mudanças da composição protéica, pH e concentração salina, na otimização dos resultados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os coacervados foram obtidos por complexação das proteínas do soro de leite com carboximetil celulose (0,3% p/v), de maneira fracionada ou total. Os coacervados foram obtidos pelo ajuste do pH, seguidos de centrifugação para separação dos complexos. O complexo γ -lactoglobulina/CMC foi obtido por ajuste da solução para o pH 4,0, α -lactalbumina/CMC em pH 3,2, e o complexo de proteínas totais (PT/CMC) em pH 3,0 (CAPITANI et al, 2005). Depois de separados os complexos coacervados foram desidratados por liofilização.

2.1 Caracterização das amostras

Os coacervados foram caracterizados quanto à composição em proteínas, lipídeos e resíduo mineral, de acordo com a AOAC (2000).

2.2 Estudo da Capacidade emulsificante

As emulsões foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por DE KANTEREWICZ et al (1987). A capacidade de emulsificação foi definida como ao volume (mL) de óleo adicionado até alcançar o ponto de inversão da emulsão por grama de proteína. Dispersões de 0,5g de amostra em água foram agitadas em agitador magnético por um tempo de 30 minutos antes de adicionar o óleo. A fase aquosa e óleo de soja foram combinados em diferentes proporções mantendo o volume total igual a 50mL. A proporção de óleo usada para preparar a emulsão foi próximo ao ponto de colapso da emulsão, visualizada pela separação de fases. As emulsões foram agitadas em agitador ultraturratec (Modelo Te-102) em velocidade de 9500rpm a temperatura de 23°C.

2.3 Análise das emulsões utilizando fotos em microscópio óptico

Emulsões preparadas a 5mg/mL foram observadas após 2 minutos em microscópio ótico (DMLB, Heidelberg, Germany) e as imagens fotografadas com uma câmera digital (Leica DC100), num aumento de 20X.

2.4 Planejamento experimental e análise estatística

Para o estudo da CE dos coacervados foi utilizado um planejamento experimental completo de 2^2 , sendo as variáveis independentes o pH e a concentração de NaCl. A faixa de pH estudada variou de 2 a 6, enquanto a concentração de NaCl de 0 a 1molar. Os níveis utilizados e o planejamento estão apresentados na Tabela 1. Utilizou-se a metodologia descrita por BOX et al. (1978) e o software Statistica 98, versão 5.0 para obtenção das curvas de nível e de contorno.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O soro de leite in natura, utilizado como matéria prima, e os coacervados (liofilizados) foram caracterizados

quanto à sua composição química parcial: teor de proteínas, lipídeos, carboidratos e resíduo mineral (Tabela 2). O complexo -Lg/CMC apresentou o maior teor de proteínas e arrastou maior quantidade de lipídeos, aumentando cerca de dez vezes sua concentração em relação ao soro de leite desnatado. Comportamento similar foi observado para o complexo PT/CMC. A fração -La/CMC foi a que apresentou menor conteúdo de proteína na composição do soro e maior proporção de carboidratos, provavelmente devido à proporção entre os polímeros utilizada na precipitação.

O comportamento emulsificante dos complexos de proteínas do soro coacervados com carboximetil celulose foram comparadas entre si e em relação as variáveis de pH e força iônica. A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e a interação entre elas para a capacidade de emulsificação (CE) do complexo -La/CMC indicaram que tanto o pH como a concentração molar de NaCl tem efeito na CE da -La/CMC, sendo que a interação entre as variáveis não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

A elevação do pH resultou num efeito positivo para a CE, quando seu valor passou do nível -1 (2,6) para +1 (5,4) resultou em média, num acréscimo de 18,6 mg de óleo por grama de proteína, sendo este efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança. Contudo, o efeito da concentração de NaCl foi mais efetivo na elevação da CE, mostrando que seu valor ao passar do nível -1 (0,15) para o nível +1 (0,85) resultou em média num acréscimo de 30,0 mg de óleo por grama de proteína, sendo este efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$). O efeito do sal na CE provavelmente está associado ao acréscimo de solubilidade, o qual permite maior mobilidade e quantidade de proteínas de se deslocarem para a interface.

Através da análise de variância (ANOVA) foi encontrado que o valor do teste calculado de 16,21 é cerca de 3,5 vezes maior que o valor do tabelado $F_{0,95; 4; 7} = 4,46$,

Tabela 1 Faixa de valores estudados no planejamento experimental para o estudo da influência do pH e da concentração de NaCl na determinação da capacidade emulsificante (CE) de complexos protéicos coacervados com CMC.

Variável	-	-1	0	+1	+
pH	2	2,6	4	5,4	6
NaCl	0	0,15	0,5	0,85	1

indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para o processo estudado. Desta forma a capacidade de emulsificação em função do pH e da concentração de NaCl pode ser codificada através da equação: $CE_{\text{alfa-La/CMC}} = 83,33 + 26,06 \text{ pH}^2 + 32,32 \text{ NaCl}$. A partir do modelo proposto foi possível obter as superfícies de resposta (Figura 1) para analisar as melhores condições de pH e concentração salina que ocasionaram a melhor capacidade de emulsificação da a -la/CMC.

É possível observar que na faixa de pH ao redor do valor de obtenção do complexo (pH 3,2) a CE apresenta valores inferiores aos demais. Assim verifica-se que a melhor condição para a -La/CMC encontra-se em pH abaixo de 2,6 e acima de 5,4, onde a CE é ao redor de 140,45 mL óleo/g de proteína. A concentração molar salina mostrou-se mais eficiente em valores de pH acima de 0,5M, quando o pH encontra-se afastado do pH de obtenção dos complexos.

A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e a interação entre elas para a capacidade emulsificante da amostra -Lg/CMC, indicam que o modelo de 1ª. ordem é estatisticamente significativo e preditivo nas condições estudadas. A partir do modelo proposto foi possível obter as superfícies de resposta (Figura 2) para analisar as melhores condições de pH e concentração salina para otimizar a resposta da capacidade de emulsificação.

Os resultados mostram que o pH e a interação das variáveis independentes têm efeito estatisticamente significativo na CE da -Lg/CMC. A elevação do pH resultou num efeito positivo para a CE quando passou do nível 1 (2,6) para o nível -1 (5,4) ocasionando em média um acréscimo de 16,91 mL de óleo por grama de proteína presente no complexo, dentro do limite de confiança de 95% (Figura 2). Contudo, a interação do pH e concentração salina mostrou efeito negativo na capacidade emulsificante ($p < 0,05$). O efeito da interação foi de redução de 5,84mL de óleo por grama de proteína quando ocorreu a mudanças dos níveis. O modelo linear foi que apresentou a melhor regressão para explicar a influência das variáveis na capacidade de emulsificação da -Lg/CMC, conforme a equação codificada: $CE_{\text{-Lg/CMC}} = 86,93 + 8,46 \text{ pH} - 5,85 (\text{pH} \times \text{NaCl})$.

Através da superfície de resposta e curvas de contorno a partir do modelo proposto (Figura 2) verifica-se que a melhor condição para a CE do complexo -Lg/CMC situa-se na faixa de pH ao redor de 5,4 e concentração salina ao redor de 0,15 M NaCl. Na avaliação da capacidade emulsificante do complexo PT/CMC a análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e a interação entre elas para a avaliação da CE

Tabela 2 Composição centesimal do soro de leite desnatado e das amostras de proteínas complexadas com CMC, em base seca.

Determinações	Soro de Leite desnatado	PT/CMC	-Lg/CMC	-La/CMC
Proteínas Totais (%)	13,05 ± 0,43	48,33 ± 0,53	57,23 ± 0,32	35,96 ± 1,73
Lipídeos Totais (%)	0,89 ± 0,05	7,37 ± 0,13	9,42 ± 0,01	3,21 ± 0,002
Resíduo Mineral (%)	9,31 ± 0,05	1,76 ± 0,04	1,98 ± 0,96	4,14 ± 1,81
Carboidratos (%)*	76,73	42,54	31,37	56,69

* Calculado por diferença: 100 - (Proteínas + Lipídeos + Cinzas) = % carboidratos.

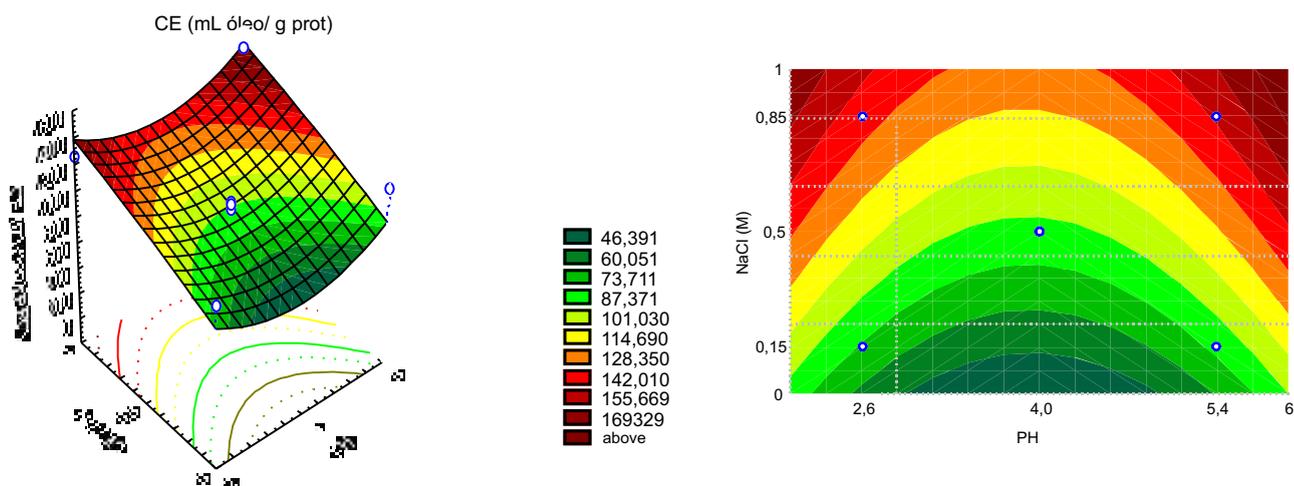


Figura 1 Superfície de resposta e curvas de contorno para a capacidade de emulsificação (CE) do complexo -Ia/CMC em função do pH e da concentração de NaCl.

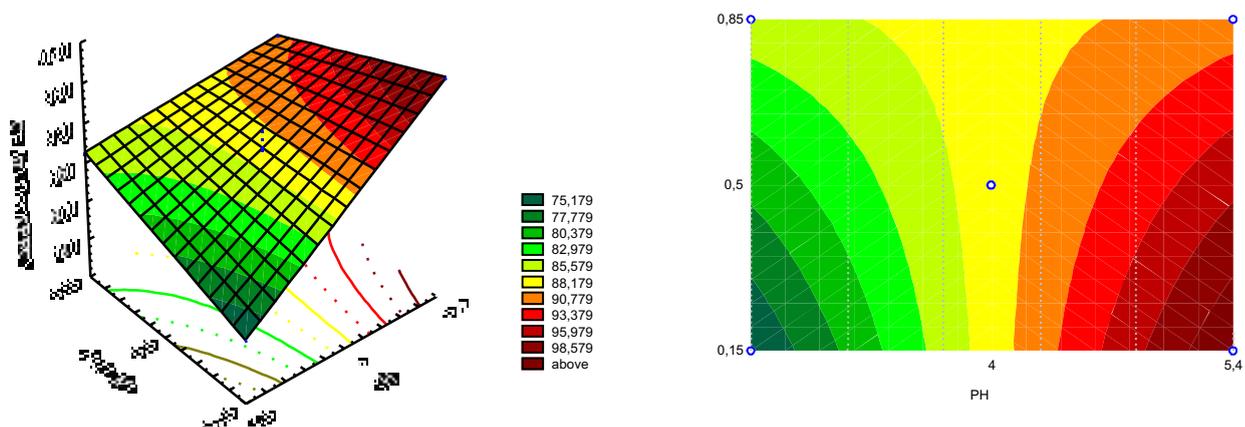


Figura 2 Superfície de resposta e curvas de contorno para a capacidade de emulsificação (CE) do complexo -Ilg/CMC em função do pH e da concentração de NaCl.

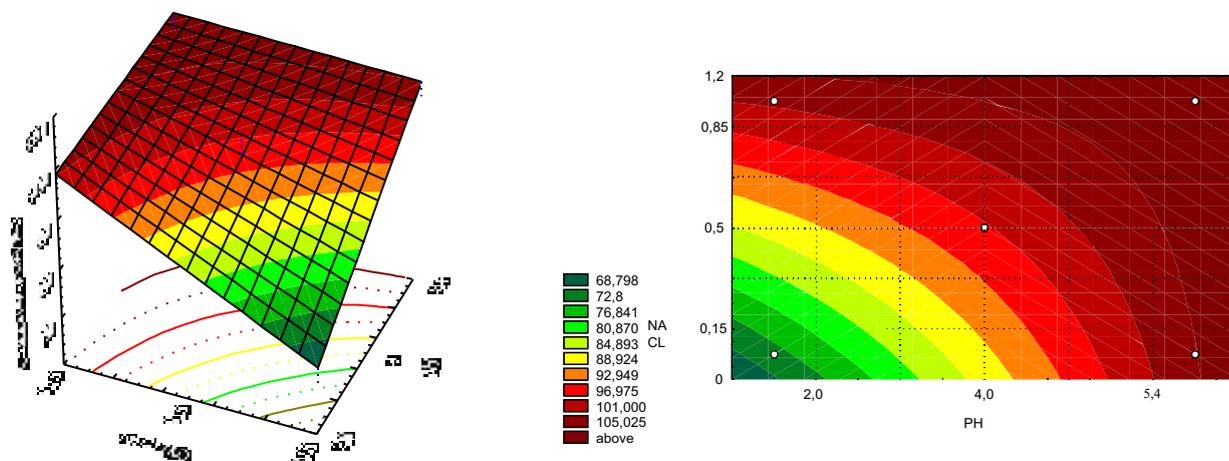


Figura 3 Superfície de resposta e curvas de contorno para a capacidade de emulsificação (CE) do complexo PT/CMC em função do pH e da concentração de NaCl.

mostram que o pH resultou num efeito positivo para a CE quando passou do nível -1 (2,6) para o nível 1 (5,4), ocasionando em média um acréscimo de 10,00 mL de óleo por grama de proteína presente no complexo ($p < 0,05$).

Pela análise de variância o valor do F calculado foi cerca de 5,59 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de 1ª. ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo nas condições estudadas. Sendo assim, a equação codificada que descreve o modelo é a seguinte: $CE_{PT/CMC} = 96,581 + 10,00 \text{ pH}$. A variação explicada pelo modelo é bastante apropriada, ou seja, explica 88% do comportamento da CE em resposta às condições avaliadas, ao nível de 95% de limite de confiança.

A partir do modelo proposto foi possível obter as superfícies de resposta (Figura 3) para analisar as melhores

condições de pH e concentração salina para otimizar a resposta da capacidade de emulsificação. Os melhores resultados da CE para a amostra PT/CMC se encontra no pH ao redor de 5,0 e concentração salina de 1,0M.

De um modo geral, para todos os experimentos realizados com os três coacervados os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) mostraram que a reprodutibilidade dos ensaios foi semelhante com um desvio padrão reduzido, resultando em baixos valores de falta de ajuste. A capacidade de emulsificação dos complexos correlacionaram de maneira positiva com a solubilidade da proteína (CAPITANI et al, 2005) e com o tamanho das gotículas de óleo (Figura 4).

Na Figura 4 encontram-se as fotografias das emulsões preparadas contendo 5mg/ml de complexo, onde é possível

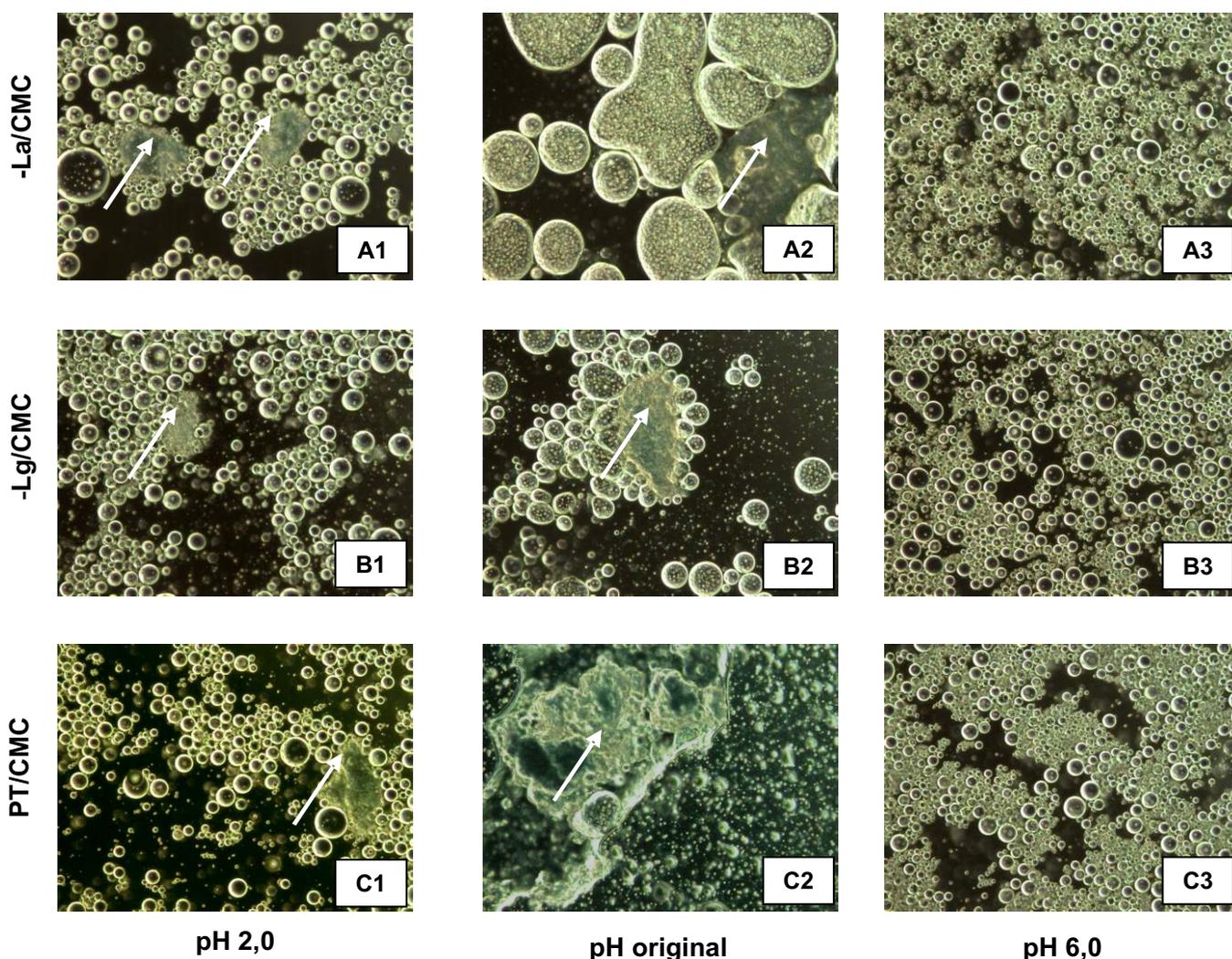


Figura 4 Fotos das emulsões a 5 mg/mL de concentração, em aumento 20X. - A1, A2 e A3 representam respectivamente emulsões de -La/CMC em pHs 2,0; 3,2 e 6,0; B1, B2 e B3 representam respectivamente emulsões de -Lg/CMC em pHs 2,0; 4,0 e 6,0; C1, C2 e C3 representam respectivamente emulsões de PT/CMC em pHs 2,0; 3,0 e 6,0.

observar a presença de gotas de aspecto e tamanhos diferenciados em função do valor do pH do meio. As fotografias tiveram como objetivo visualizar em aumento de 20 vezes o aspecto das emulsões dos diferentes complexos, tanto no pH original de formação como em outros dois valores extremos de pH (2 e 6). Em valores de pH 2 (Figuras 4- A1, B1, C1) todas as amostras emulsionadas formaram gotas de pequeno tamanho com tendência à floculação, apresentando vazios entre elas, correspondente à fase líquida. Verifica-se a presença de agregados insolúveis em meio a esta fase.

Nota-se que em pH original de formação dos complexos (Figuras 4- A2, B2, C2), em geral todas as amostras estudadas apresentam agregados insolúveis (apontados pelas setas brancas), provavelmente em decorrência da falta de solubilidade inicial das amostras nesta condição. Para o complexo -La/CMC (pH 3,2) verifica-se (Figura 4-A2) que as gotas apresentam aspecto nitidamente globular de grande tamanho com tendência a coalescer para volumes maiores. Apesar do complexo -Lg/CMC ser capaz de formar emulsão em pH original (pH 4,0) forma filmes que engloba a fase oleosa em gotas de menor tamanho quando comparadas ao complexo -La/CMC, contudo apresenta a mesma tendência a coalescência, englobando os agregados insolúveis, gerando espaços livres da fase líquida. Este comportamento indica claramente que ocorre falta de estabilidade na emulsão logo após a sua formação.

Para a emulsão formada com a PT/CMC (pH 3,0) verifica-se (Figura 4-C2) um aspecto diferenciado, pois as gotículas formadas são de menor tamanho. Provavelmente devido a sua característica de hidrofobicidade apresentam a formação de uma capa de óleo ao seu redor, nitidamente visualizado por seu aspecto esbranquiçado. Das três amostras estudadas, somente a -Lg/CMC formou emulsão no pH original de formação dos coacervados.

Para as emulsões preparadas em valores de pH 6,0 (Figura 4-A3, B3, C3) as gotas apresentam floculação entre elas, porém sem coalescência. Observa-se pouco espaço vazio de fase líquida e maior homogeneidade entre as fases e portanto maior tendência a estabilidade. Singh et al (2003) observou que a adição de -carragena a emulsões preparadas com isolado protéico de soro, a agregação das glóbulos emulsionados foi dependente do pH, sendo que em pH neutro ocorreu floculação.

4. CONCLUSÃO

A partir dos modelos propostos foi possível obter as superfícies de resposta e curvas de contorno indicando as melhores condições de pH e concentração salina, para otimizar a resposta da capacidade de emulsificação das amostras coacervadas.

Somente a -La/CMC e a PT/CMC não apresentaram formação de emulsão para os valores de pH de obtenção dos complexos na ausência de sal.

Pelos resultados da microscopia as emulsões preparadas em pH 6,0, apresentaram maior homogeneidade, dispersão e menor tamanho das gotículas de óleo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. In: HORWITZ, W. (Ed.), *Official Methods of Analysis*. Washington, 00. 17TH. ed., 2000.
- AKITA EM, NAKAI S. Lipophilization of β -lactoglobulin: effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. *Journal of Food Science*, v.55, p.711-717, 1990.
- BAEZA, R.I.; PILOSOFF, A.M.R. Calorimetric studies of thermal denaturation of β -Lactoglobulina in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, v. 35, p. 393-399, 2002.
- BERTRAND-HARD, C.; CHARRIER, B.; DELGALARRONDO, M.; COBERT, JM; JHEARTLÉ, T. Condensation of glycosidic and aromatic structure on amino groups of β -lactoglobulin B via reductive alkylation: solubility and emulsifying properties of the protein derivatives. *Lait*, v.71, p.5-215, 1990.
- BOX, GEP. In Box, GEP; Hunter, WG, Hunter, JS. *Statistics for experiments: An Introduction to desing data analysis and Model Building*. New York, 1978, 653p.
- CAROLINE DÁRIO CAPITANI, MARIA TERESA BERTOLDO PACHECO, HOMERO FERRACINI GUMERATO, E FLÁVIO LUIS SCHMIDT. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.11, p. 1123-1128, 2005.
- CREUZENET, C.; TOUATI, A.; DUFOUR, E.; CHOISET, Y.; CHOUBERT, J.; HEARTLÉ, T. Acylation and alkylation of bovine β -lactoglobulin in organic solvents. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, v.40, p184-190, 1992.
- DE KANTEREWICZ, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BRTHOLOMAI, G.B. Water-oil absorption index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. *Journal of Food Science*, v.52, n.5, p. 1381-1383, 1987.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 25-39, 2003.
- ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Prediction of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins. *Journal of Food Science*, v.56, n.1, p.116-1, 1991.
- FONSECA, L.M., E BRADLEY JR, R. Precipitação de proteínas por meio de coacervação com carboidratos complexos. *Revista do Instituto "Cândido Tostes". Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios*, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.341-348, 2001.
- GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; PAQUIN, P. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science*, v.67, n.1, p. 113-119, 2002.
- KLEMASZEWSKI, J.L.; DAS, K.P.; KINSELA, J.E. Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *Journal of Food Science*, v.57, p.366- 371, 1992.
- KRAUSE, JR. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potencial and foaming properties of protein isolates from rapeseed (Brassica napus). *Industrial Crops and Products*, v.15, p.221-228, 2002.
- NAGASAWA, K.; TAKAHASHI, K.; HATTORI, M. Improved emulsifying of β -lactoglobulin by conjugating it with carboxymethyl dextran. *Food Hydrocolloids*, v.10, p.63-67, 1996.
- PACHECO, MARIA TERESA B. Uso de hidrocolóides na recuperação de proteínas e/ou melhoria de propriedades funcionais. *Anais do I Seminário Internacional sobre Tópicos Especiais em Ciência de Proteínas*. ITAL, Campinas, p:111-117, 1997.
- SINGH, H, TAMEHANA, M., HEMAR, Y., MUNRO, PA. Interfacial compositions, microstructure and stability of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and -carrageenan:2.whey protein isolate (WPI). *Food Hydrocolloids*, v.17, p.549-561, 2003.