

# **PUBLICACIONES REOLÓGICAS**

## **VOLUMEN I**

Trabajos Completos presentados en

**1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Biorreología**

**V Jornada Dr. Rodolfo J. Rasia de Física Aplicada a la Biomedicina**

Rosario, 15 y 16 de marzo 2012



Editores: B. Riquelme; M. E. Hidalgo; M. D'Arrigo; P. Risso

## EVALUACIÓN DE GELES ÁCIDOS DE AISLADOS PROTEICOS DE LACTOSUERO Y DE SOJA

**Romina Ingrassia<sup>1</sup>, Pablo Sobral<sup>2</sup>, Jorge Wagner<sup>2</sup>, Patricia Risso<sup>1,3,4</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Rosario;

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Quilmes, Bernal; <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR, Casilda; IFIR, CONICET-UNR; Rosario. E-mail: phrisso@yahoo.com.ar

*Resumen.* El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades reológicas, la textura y la estabilidad de geles ácidos de aislados proteicos del lactosuero bovino (WPI) y de soja (SPI) a diferentes temperaturas. También se evaluaron mezclas de SPI con proteínas del suero de soja (WSP) con el objetivo de aumentar el valor nutricional de estos geles. La gelación se indujo por acidificación lenta adicionando glucono- $\delta$ -lactona (GDL) a las soluciones proteicas. Ensayos reológicos oscilatorios fueron utilizados para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas. Se estimó el tiempo de gel (tgel) como el tiempo en que se igualan el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ). Se determinó el pH al tgel (pHgel) y el máximo valor de  $G'$  alcanzado ( $G'_{\text{máx}}$ ). Para la obtención de imágenes microscópicas se colocaron las muestras en placas y fueron observadas en un microscopio óptico con una cámara digital acoplada. Durante la formación de geles de WPI y SPI, el tgel disminuyó al incrementarse la temperatura, sin cambios significativos en el pHgel. Para los geles de WPI, la elasticidad aumentó con la temperatura, pero a su vez hubo un aumento de la pérdida de elasticidad en el tiempo. Para evitar esta reversión se adicionó carboximetilcelulosa, la cual se adsorbe en la superficie proteica y estabiliza al gel. En el caso de los geles de SPI, la elasticidad fue mayor a menores temperaturas. Además los geles no revirtieron y presentaron valores de  $G'_{\text{máx}}$  tres veces superiores. En el caso de las mezclas SPI/WSP, se observó que a medida que aumentó la proporción de WSP, disminuyó el grado de compactación, incrementándose el tamaño de los poros. En conclusión, se pueden obtener geles proteicos con características estructurales diferentes controlando la velocidad de gelación (control de temperatura) y el tipo y proporción de cosoluto adicionado (carboximetilcelulosa, WSP), lo cual puede ser interés para la obtención de productos alimenticios con características texturales diferenciadas.

*Palabras clave:* lactosuero, aislado proteico de soja, aislado proteico de suero de soja, glucono- $\delta$ -lactona, reología

## INTRODUCCIÓN

Los aislados proteicos del lactosuero bovino (WPI), producto contaminante de desecho de la elaboración de los quesos, y los aislados nativos proteicos de soja (SPI), de reportado efecto benéfico en la salud (Friedman and Brandon 2001), poseen diversas propiedades nutricionales y funcionales, entre ellas la gelación, que los vuelve muy útiles para la obtención de productos alimenticios con características organolépticas y de estabilidad deseables.

Los WPI y los SPI pueden formar geles a pH cercanos al pI de las principales proteínas que los conforman, previa desnaturalización térmica de las mismas, en un proceso conocido como “gelación fría” (Cavallieri and da Cunha 2008). Esta se compone de dos etapas consecutivas: en la primera se forman polímeros por calentamiento de la solución proteica a pH lejanos al pI; luego del enfriamiento, los polímeros proteicos permanecen solubles y pueden ser almacenados por días sin cambiar significativamente su tamaño. En la segunda etapa, se induce la gelación por adición de sales o disminución del pH (Alting, de Jongh et al. 2002). La diferencia en la velocidad del proceso puede afectar el grado de dureza y elasticidad del gel formado. Esta propiedad funcional puede verse afectada también por variaciones de las condiciones de proceso, como temperatura, contenido de sales, combinación de ingredientes, etc.

La reducción del pH de soluciones proteicas puede realizarse rápidamente (acidificación directa) o lentamente (uso de cultivos lácticos). Dependiendo de la concentración y temperatura, la hidrólisis de la glucono-delta-lactona (GDL) en ácido D-glucónico (GH) puede promover la reducción lenta del pH (de Kruif 1997). Su uso evita algunas de las dificultades asociadas a la utilización de bacterias lácticas, ya que el pH final del sistema es función de la cantidad de GDL adicionada, mientras que las bacterias producen ácido hasta que se auto inhiben o mueren por el bajo pH del medio.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades reológicas, la textura y la estabilidad de geles ácidos de WPI y SPI a diferentes temperaturas. También se evaluaron mezclas de SPI con aislado proteico del suero de soja (WSP), obtenido a partir del subproducto proveniente de la elaboración de aislados, con el objetivo de aumentar el valor nutricional de estos geles ya que se ha visto que estos últimos, cuando están inactivados, poseen

un valor biológico comparable al de las proteínas de reserva, principal constituyente de los SPI (Kishi and Inoue 1987; Cheftel, Cuq et al. 1989).

El conocimiento adecuado del efecto de la composición y el procesamiento sobre el comportamiento micro y macroscópico de estos geles será la base para el desarrollo de nuevos productos. Por ello es de gran importancia profundizar el estudio de la estructura del gel, de las interacciones entre sus componentes y de las fuerzas de interacción que determinarán su consistencia y estabilidad física.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materiales*

Las drogas utilizadas en este trabajo fueron, en la mayoría de los casos, de calidad pro-análisis. Las más utilizadas fueron: WPI (Arla Food Ingredients), CMC de baja viscosidad y GDL (Sigma-Aldrich).

El SPI se preparó a partir de una harina de soja desgrasada (Solae Latin America, Brasil), no tratada térmicamente y desolventizada en condiciones suaves siguiendo los procedimientos detallados por Sorgentini y Wagner (90,7 ± 0,2 % P/P, N×6,25) (Sorgentini and Wagner 1999). Los WSP se prepararon siguiendo procedimientos experimentales descriptos en trabajos previos (Sorgentini and Wagner 1999; Sobral and Wagner 2009). El sobrenadante de la precipitación isoeléctrica (pH 4,5) de las proteínas del SPI, se ajustó a pH 8 y se centrifugó (12.400×g, 15 min., 20°C) para obtener un sobrenadante clarificado, al cual se adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar un 90 % de saturación. El precipitado resultante de los WSP se separó por centrifugación (12.400×g, 15 min, 20°C) se lavó con agua destilada, se dializó contra agua destilada durante 24 horas y finalmente se secó por liofilización (proteína bruta: 99,0 ± 0,5 % P/P, N×6,25).

Las soluciones WPI, SPI y mezclas SPI/WSP se prepararon por disolución en agua destilada a una concentración proteica final de 3% P/P. Luego fueron sometidas a tratamiento térmico a 80°C durante 30 min y 100°C durante 5 min en baño termostático para las muestras provenientes del lactosuero y de soja respectivamente. A continuación, se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo para evitar la precipitación, y por último se permitió que la muestra alcance nuevamente la temperatura ambiente. Se ensayaron 3 relaciones SPI/WSP (% P/P/% P/P): 2,25 /0,75, 1,5/1,5 y 0,75/2,25.

Para el caso particular de la mezcla WPI 3% P/P y carboximetilcelulosa (CMC) 0,5 % P/P se prepararon soluciones de WPI 6% P/P y CMC 3% P/P por disolución de los respectivos solutos en agua destilada, para luego mezclar los volúmenes apropiados y alcanzar las concentraciones finales deseadas con adición de agua destilada.

### Métodos

*Estudio del efecto de la temperatura sobre las propiedades reológicas de geles ácidos de WPI y SPI*

Se analizó la gelación ácida de soluciones de WPI o de SPI en agua destilada a una concentración de 3 % P/P y a distintas temperaturas (10-35 °C), con el objetivo de evaluar el efecto de la misma sobre la gelación de los WPI y SPI.

Definiendo R como:

$$R = \frac{\% \frac{P}{P} GDL}{\% \frac{P}{P} proteína}$$

se trabajó a un R constante (1 y 0,35 para soluciones de WPI y SPI respectivamente) ya que la concentración de GDL influye en el tiempo (velocidad) de agregación debido a la variación de la velocidad de descenso del pH.

Ensayos reológicos oscilatorios fueron utilizados para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas. Una muestra de (0,80 ± 0,01) mL de la muestra a ensayar fue introducida en un reómetro de tensión controlada TA Instruments, modelo AR G2 (Brookfield Engineering Laboratories, E.U.A). Se utilizó una geometría de tipo cono (diámetro: 40mm, ángulo cono: 2°, truncación: 55mm) y un kit de cubierta trampa de solvente de 60 mm para evitar la contracción de la muestra por evaporación de agua. La temperatura de trabajo (20-35°C) fue controlada con un baño con recirculador marca Julabo modelo ACW 100 conectado al plato Peltier del instrumento. El reómetro dispone de un sistema de adquisición de datos y control de operación mediante el software Rheology Advantage v5.7. Se configuró un procedimiento de adquisición de datos durante 2 horas a intervalos de 30 segundos, teniendo fijados los valores de tensión de oscilación (oscillation stress) en 0,1Pa y la frecuencia en 0,1Hz. Se estimó el tiempo de gel ( $t_{gel}$ ) a partir del punto de cruce del módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) en

función del tiempo. Se determinó el pH correspondiente al  $t_{gel}$  ( $pH_{gel}$ ) y el máximo valor de  $G'$  alcanzado ( $G'_{máx}$ ).

*Efecto de la presencia de WSP en la gelación ácida de SPI*

Se estudió la cinética de gelación a 35°C de soluciones de diferentes relaciones SPI/WSP (2,25/0,75; 1,5/1,5 y 0,75/2,25) de concentración proteica total 3 % P/P. Los mecanismos de interacción entre ingredientes y la textura de los geles formados pueden ser caracterizados a través de análisis ópticos (Lucey 2002). Se evaluó la microestructura de los geles de SPI 3 % P/P y de sus mezclas con WSP formados por acidificación con GDL (R 0,35), manteniendo las proporciones indicadas en la sección anterior para las mezclas.

Para profundizar el estudio de la microestructura de estos geles, se obtuvieron imágenes microscópicas de los mismos. Para ello se colocaron (85 ± 1) µL de cada muestra en placas LAB-TEK II de ocho compartimientos (por triplicado). Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico invertido al cual se le acopló mediante un adaptador Canon de 520 mm una cámara fotográfica digital. Se utilizó el zoom en la opción 7.1x, y el objetivo del microscopio utilizado fue de 100x.

*Análisis estadístico*

Las distintas determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Los datos se informaron como el valor promedio ± su desvío estándar. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa para PC Sigma-Plot Versión 10.0.

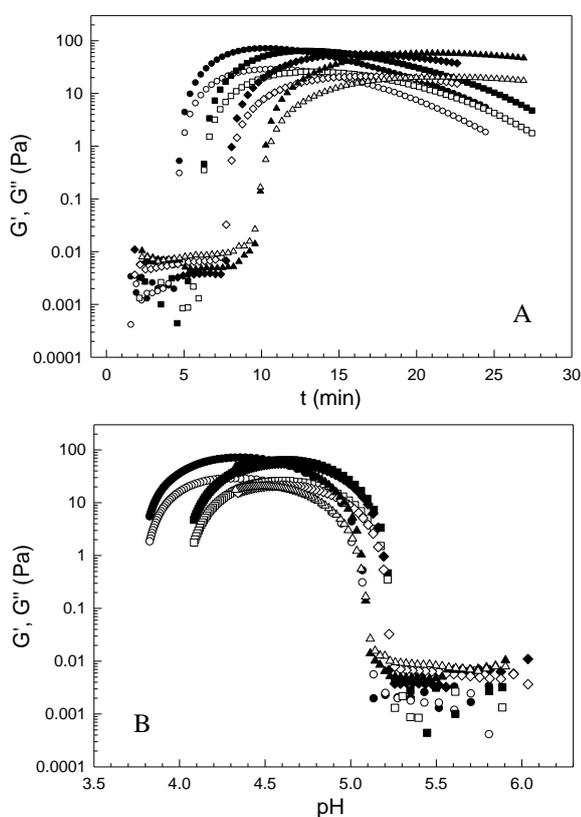
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Análisis del efecto de la temperatura sobre los parámetros reológicos durante la gelación ácida de los WPI*

Se evaluó el cambio de  $G'$  y  $G''$  durante la gelificación ácida a partir de WPI 3% P/P inducida por adición de GDL para un R=1 a diferentes temperaturas en un rango de 24 a 35°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

En estos gráficos se evidencia que en una proimera etapa, al adicionar GDL y al pH cercano al pH isoiónico de la muestra proteica, el módulo  $G'' > G'$ , comportamiento típico de los sistemas predominantemente viscosos. A

medida que desciende el pH y por encima del pI de las proteínas que conforman los WPI, este comportamiento se mantiene hasta llegar al  $t_{gel}$  donde  $G' = G''$ , a pH cercano al pI. A pH menores, el comportamiento se revierte con un aumento de ambos parámetros pero siendo  $G' > G''$ , hasta alcanzar el máximo valor del componente elástico del sistema. A partir de ese momento, y si el gel no revierte, se observan cambios lentos en los valores de ambos módulos debido al reordenamiento de las interacciones en la malla de gel. A las T más altas, esto no ocurre y se puede observar el descenso de  $G'$  y  $G''$  a causa de la pérdida de estado de gel a bajos valores de pH (R 1).



**Figura 1.** Variación de  $G'$  (símbolos llenos) y  $G''$  (símbolos vacíos) en función del tiempo (A) y pH (B) una vez adicionada la GDL a diferentes T: (●) 35°C; (■) 31°C; (◆) 27°C; (▲) 24°C. WPI 3% P/P, R 1.

Esto también ha sido comprobado en trabajos previos de nuestro grupo en donde se evaluó la gelación de WPI a diferentes concentraciones y distintos valores de R (Marrone 2010). Es posible inferir por medidas reológicas que este proceso de reversión sucede con mayor rapidez a temperaturas más altas a partir de los valores de tiempo donde se alcanzó

el  $G'_{máx}$  para las distintas T. Esto es debido a que al disminuir la T, ocurre un desplazamiento hacia la no disociación de la reacción de hidrólisis de la GDL.

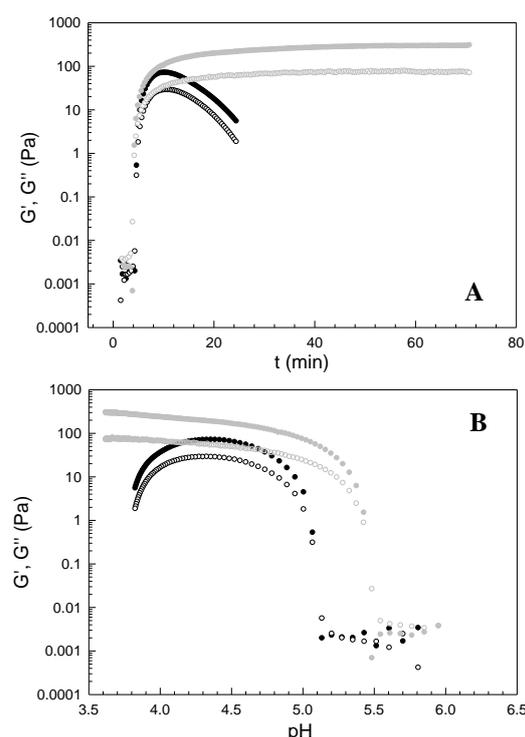
En la Tabla 1. se resumen los resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$  obtenidos para los distintos sistemas. El  $t_{gel}$  disminuye a medida que se incrementa la temperatura, sin cambios significativos en el  $pH_{gel}$ . Esto estaría indicando una primera etapa más rápida a  $pH > pI$ . Por otra parte,  $G'_{máx}$  alcanzado es mayor. Pero esto no implica que a mayor T los geles son más elásticos ya que pierden elasticidad en el período de tiempo del ensayo, a diferencia de lo observado a 24°C, en donde los valores de  $G'$  solo disminuyen levemente. Se puede inferir que el descenso de T lleva a valores de pH finales mayores y esto podría lentificar o evitar la pérdida de estado de gel.

T (°C)	$G'_{máx}$ (Pa) ± 1	$t_{gel}$ (min) ± 0,4	$pH_{gel}$ ± 0,07
35	68	5,1	5,14
31	64	6,3	5,22
27	56	8,1	5,19
24	58	10,3	5,06

**Tabla 1.** Resultados de  $t_{gel}$  y  $pH_{gel}$  obtenidos para los sistemas WPI 3% P/P posterior a la adición de GDL (R 1) a distintas temperaturas.

En trabajos previos se comprobó por medidas turbidimétricas que la adición de carboximetilcelulosa (CMC) a concentraciones superiores a 0,2 % P/V sobre muestras de WPI 3 % P/P, evita la pérdida de estado de gel. (Marrone 2010) En este trabajo, se evaluó el comportamiento reológico de WPI 3 % P/P y CMC 0,5 % P/V, pudiéndose comprobar por esta técnica el aumento de estabilidad del gel por adición del polisacárido (Figura 2).

Ha sido reportado que la CMC se adsorbe sobre la superficie de micelas de caseína originando una repulsión electrostática entre ellas a pH bajos por aumento de la densidad de carga negativa superficial (Du, Li et al. 2007). Ésta adsorción de la CMC sobre una superficie proteica podría ser la razón del incremento en la estabilidad de la mezclas de WPI/CMC. La CMC actuaría como un estabilizador ya que su presencia en alta proporción aumenta el pH final alcanzado.



**Figura 2.** Variación de  $G'$  y  $G''$  en función del tiempo (A) y del pH (B) una vez adicionada la GDL: (●)  $G'$ , (○)  $G''$  WPI 3% y (●)  $G'$ , (○)  $G''$  WPI 3% en CMC 0,5%. R 1 y T 35°C.

*Evaluación por determinaciones reológicas del efecto de la temperatura de la gelación ácida de los SPI*

De manera análoga a la gelación ácida de los WPI, pudieron obtenerse los parámetros tiempo y pH de punto de gel ( $t_{gel}$  y  $pH_{gel}$ ) a los cuales  $G'=G''$ , así como el valor de  $G'$  máximo alcanzado, los cuales se informan en la Tabla 2.

T (°C)	$G'_{máx}$ (Pa)	$t_{gel}$ (min)	$pH_{gel}$
35	272 ± 12	8,6 ± 0,4	5,79 ± 0,05
31	260 ± 7	12,7 ± 0,6	5,66 ± 0,03
27	264 ± 8	16,6 ± 0,7	5,71 ± 0,03
24	337 ± 5	28 ± 2	5,63 ± 0,04
20	283 ± 10	31,3 ± 0,9	5,81 ± 0,05

**Tabla 2.** Resultados de  $G'_{máx}$ ,  $t_{gel}$  y  $pH_{gel}$  obtenidos para los sistemas SPI 3% P/P posterior a la adición de GDL (R 0,35) a distintas T.

Los resultados coinciden con lo informado en la sección anterior. El  $t_{gel}$  aumenta a medida que disminuye la T de trabajo, sin cambios apreciables en el  $pH_{gel}$ . Los valores de  $G'_{máx}$  aumentaron a 24 y 20°C. Esto sugiere que la diferencia en la cinética del proceso de gelificación en el rango de T estudiado puede modificar el grado de incorporación de la proteína desnaturizada en la red de gel.

A diferencia de los geles de WPI, los geles de SPI no revirtieron y además presentaron valores de  $G'_{máx}$  aproximadamente 3 veces superiores. Esto puede deberse a la formación de complejos solubles entre la glicinina y la  $\beta$ -conglucina, proteínas mayoritarias del SPI. El calentamiento de los SPI a pH neutro (6,8-7,5) resulta en la desnaturalización de ambas proteínas y como consecuencia los puentes disulfuro entre los polipéptidos ácidos y básicos de la glicinina se rompen produciendo la formación de nuevos puentes disulfuro entre los polipéptidos básicos de la glicinina y las subunidades  $\beta$  de la  $\beta$ -conglucina (Renkema, Lakemond et al. 2000).

*Efecto de la presencia de WSP en la gelación ácida de los SPI*

Se realizaron ensayos previos de manera de corroborar que ninguna de las soluciones de WSP agregaron por adición de GDL en un rango de concentración entre 0,5 y 3 % P/P y con R entre 0,35 y 1.

En trabajos previos, a partir de medidas turbidimétricas en sistemas más diluidos, se pudo observar que antes del agregado de GDL existe la formación de complejos entre las proteínas que comprenden SPI y WSP de tamaño cada vez mayor a medida que aumenta la proporción de WSP, los cuales ante la presencia de GDL serían más inestables de manera tal que comenzarían el proceso de agregación antes y a pH más altos (Ingrassia 2011). Pudo observarse también que el grado de compactación de los agregados finales disminuye al aumentar la proporción de WSP, probablemente a causa de la disminución de la reestructuración de las interacciones por el aumento de la velocidad de agregación.

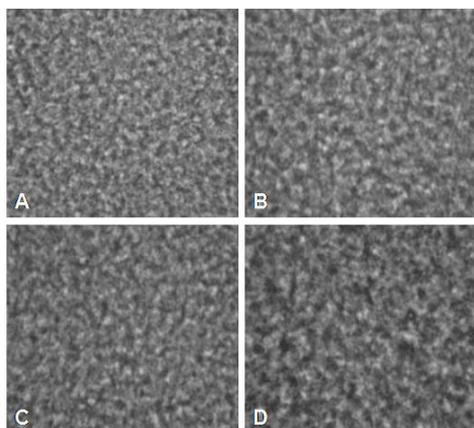
En la tabla 3. se muestran los resultados obtenidos de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{max}$  obtenidos a partir de las medidas reológicas del proceso de gelación a T constante (35°C) inducido por GDL de soluciones de SPI y de sus mezclas con WSP.

	G'max (Pa)	pH <sub>gel</sub>	t gel (min)
SPI 3%	389 ± 3	5.64 ± 0.04	16 ± 1
SPI 2.25% WSP 0.75%	275 ± 6	5.71 ± 0.07	10.4 ± 0.5
SPI 1.5% WSP 1.5%	184 ± 30	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.2
SPI 0.75% WSP 1.25%	44 ± 2	5.76 ± 0.02	5 ± 1

**Tabla 3.** Resultados de G' máx, t<sub>gel</sub> y pH<sub>gel</sub> obtenidos para los sistemas SPI 3% P/P y sus mezclas con WSP posterior a la adición de GDL (R 0,35) a T 35°C

Puede comprobarse entonces que en sistemas más concentrados (3% P/P) esa disminución en el grado de compactación de los agregados en función de un aumento de la proporción de WSP se ve traducida como una marcada disminución del grado de elasticidad final lograda en el gel ácido (G'max). Además se comprueba a partir de los valores de t<sub>gel</sub> que efectivamente el proceso de desestabilización y gelificación ocurre a mayor velocidad conduciendo a geles menos compactos.

También se evaluaron las mezclas SPI/WSP mediante microscopía óptica a concentración proteica 3 % P/P. La Figura 3 muestra las imágenes digitales de los geles ácidos obtenidos.



**Figura 3.** Imágenes digitales obtenidas por microscopía óptica de geles de (A) SPI 3%, y sus mezclas con WSP (%SPI/%WSP): (B) 2,25/0,75; (C) 1,5/1,5 y (D) 0,75/2,25. R 0,35, T 35°C.

En coincidencia con los resultados precedentes, puede observarse que a medida que aumenta la proporción de WSP en la mezcla disminuye el grado de compactación de los geles, incrementándose el tamaño de los poros.

## CONCLUSIONES

Las proteínas globulares desnaturalizadas presentes en los WPI y en los SPI pueden formar agregados o asociaciones estables y solubles por calentamiento de la solución proteica a pH lejano al punto isoeléctrico e inmediato enfriamiento de la muestra. Estas suspensiones pueden agregar o gelificar, según la concentración original de las mismas, por pérdida de su estabilidad electrostática inducida por la GDL.

La velocidad de acidificación y el pH final alcanzado influyen sobre la estructura y la estabilidad geles ácidos. Estos son menos compactos y menos estables cuanto más rápido es el proceso de acidificación y cuanto más bajo es el pH final alcanzado. A medida que el proceso sea más lento, más fácilmente podrán orientarse y reordenarse las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas y esto favorecerá la formación de un agregado/gel más ordenado y homogéneo. Estos cambios en la velocidad de formación de los agregados pueden controlarse eligiendo la temperatura de trabajo. Cuanto más baja sea la temperatura, más lento se realizará dicho proceso.

La gelación ácida de WPI realizadas a R=1 resultaron en geles inestables que revirtieron luego de un tiempo. Esta inestabilidad puede ser eliminarse por adición de carboximetilcelulosa.

Los agregados ácidos obtenidos a partir de SPI fueron más compactos que los de WPI, a igualdad de condiciones experimentales. Esto está vinculado a la posibilidad de reordenamientos de las interacciones disulfuro que poseen los SPI.

La adición de WSP a los SPI induce la asociación de las partículas proteicas que forman micropartículas de tamaño cada vez mayor a medida que aumenta la proporción de WSP. Además, se produce un aumento de la velocidad de agregación inducida por la adición de GDL. Teniendo en cuenta que el WSP no agrega al disminuir el pH, la disminución del tiempo y el aumento del pH a los cuales comienza la agregación, estaría vinculada con una disminución de la estabilidad electrostática de los SPI al interactuar con el WSP. Esto trae como consecuencia la formación de agregados menos compactos.

Es posible, entonces, obtener agregados y geles con características estructurales diferentes controlando el estado inicial de las muestras proteicas, el tipo y proporción de cosoluto o la velocidad del proceso de agregación/gelación (control de la temperatura).

Estos resultados pueden ser de interés para la obtención de productos alimenticios con diferentes texturas basados en procesos de agregación o gelificación. Este trabajo pretende profundizar en el estudio de un proceso de agregación ácida alternativo, como es el uso de la GDL, y colaborar con la optimización de las características de textura que deben tenerse en cuenta al desarrollar una fórmula alimenticia.

antitriptica de sueros de soja y tofu y comportamiento térmico de sus proteínas aisladas. *Información tecnológica* 20,(5), 65-73.

Sorgentini, D. A. and J. R. Wagner (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *J. Food Biochem.* 23,(5), 489-507.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alting, A. C., H. H. J. de Jongh, et al. (2002). Physical and Chemical Interactions in Cold Gelation of Food Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50,(16), 4682-4689.
- Cavallieri, A. L. F. and R. L. da Cunha (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloid.* 22,(3), 439-448.
- Cheftel, J.-C., J. L. Cuq, et al. (1989). *Proteínas Alimentarias*. Zaragoza.
- de Kruif, C. G. (1997). Skim Milk Acidification. *J. Colloid Interf. Sci.* 185,(1), 19-25.
- Du, B., J. Li, et al. (2007). The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. *Lait* 87,(4-5), 287-301.
- Friedman, M. and D. L. Brandon (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1069-1086.
- Ingrassia, R. (2011). Efecto de la temperatura y la adición de cosolutos sobre las propiedades estructurales y funcionales de proteínas alimentarias. Rosario, Universidad Nacional de Rosario. Licenciada en Biotecnología.
- Kishi, K. and G. Inoue (1987). Soy protein in human nutrition. *International Symposium:* 45-57.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85,(2), 281-294.
- Marrone, J. (2010). Análisis del proceso de gelificación de proteínas del lactosuero bovino. Departamento de Química-Física. Rosario, Universidad Nacional de Rosario. Licenciada en Biotecnología.
- Renkema, J. M. S., C. M. M. Lakemond, et al. (2000). The effect of pH on gel forming properties of soy proteins. *J. Biotech.* 79, 223-230.
- Sobral, P. A. and J. R. Wagner (2009). Relación entre la composición y la actividad