

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA HUMECTACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE PROTEÍNA AISLADA DE SUERO DE LECHE Y GOMA DE MEZQUITE (*Prosopis* spp.)

THERMAL TREATMENT EFFECT ON WETTABILITY OF EDIBLE FILMS FROM WHEY PROTEIN ISOLATED AND MESQUITE (*Prosopis* spp.) GUM

Martín R. Porras-Godínez¹, Ruth Pedroza-Islas^{2*}, Guadalupe Franco-Rodríguez³, Eduardo San Martín-Martínez¹

¹Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. Legaría 694. Colonia Irrigación. 11500. D.F., México. (contactmart@hotmail.com, sanmartinedu@hotmail.com). ²Universidad Iberoamericana. Paseo de la Reforma 880. Colonia Lomas de Santa Fe. 01219. D.F., México. (ruth.pedroza@ibero.mx). ³Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida 1° de Mayo s/n, Colonia Santa María las Torres. 54740. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. (guadalupana_2@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Las películas y recubrimientos comestibles se usan para mejorar la calidad de los productos alimenticios al actuar como barrera contra gases, humedad y aromas, retardar las reacciones de deterioro y prolongar la vida útil de los alimentos. Para formar las películas se usan biopolímeros solos o mezclados, aprovechando las características de estos materiales y sus posibles interacciones en favor de mejores propiedades barrera. En este estudio se elaboraron películas compuestas de proteína aislada de suero de leche (WPI) y goma de mezquite (*Prosopis* spp.) (GM) y se evaluó el efecto del tratamiento térmico en la humectación, determinado por ángulo de contacto, las transiciones térmicas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y las interacciones proteína-polisacárido, por análisis de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Los resultados indicaron que la desnaturalización térmica y el incremento de la proporción de GM en las películas redujeron las propiedades de humectación. La entalpia y la temperatura de fusión se incrementaron con el aumento de GM en las mezclas. Los espectros FT-IR confirmaron las interacciones proteína-polisacárido y proteína-proteína, por la modificación en las bandas de los grupos hidroxilo (-OH), de los enlaces C-H, C-O, C-C y de los grupos tiol (-SH). Los resultados de este estudio confirmaron el potencial de uso de mezclas de WPI y GM para obtener películas comestibles.

Palabras clave: Películas comestibles, proteína aislada de suero de leche goma de mezquite, humectación.

ABSTRACT

Edible films and coatings are used to improve the quality of food products by acting as barriers against gases, moisture and aromas, delaying reactions of deterioration and prolonging the useful life of food. To form the films, biopolymers are used alone or mixed to take advantage of the characteristics of these materials and their possible interactions for better barrier properties. In this study, films made of protein isolated from whey (WPI) and mesquite (*Prosopis* spp.) gum (GM) were made, and the effect of heat treatment on their wettability was assessed. Determinations were contact angle, heat transitions by differential scanning calorimetry (DSC) and the interactions polysaccharide-protein by infrared spectroscopy (FT-IR). The results indicated that heat denaturalization and an increase in the proportion of GM in the films reduced humectation properties. Enthalpy and melting temperature increased with an increase of GM in the mixtures. The FT-IR spectra confirmed the interactions protein-polysaccharide and protein-protein, by the modifications in the bands of the hydroxyl group (-OH), in the C-H, C-O, C-C bonds, and in the thiol (-SH) groups. The results of this study confirmed the potential use of WPI and GM mixtures to obtain edible films.

Key words: Edible films, whey protein isolate, mesquite gum, humectation.

INTRODUCTION

Edible films can increase food shelf life and improve sensorial characteristics since they act as barriers against migration of nutrients,

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2014. Aprobado: noviembre, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 1-13. 2015.

INTRODUCCIÓN

Las películas comestibles pueden aumentar la vida de anaquel de los alimentos y mejorar las características sensoriales, ya que actúan como una barrera contra la migración de nutrimentos, humedad y solutos e incluso pueden usarse para incorporar aditivos (Kim y Ustunol, 2001). Un interés adicional es la búsqueda para reducir la contaminación ambiental causada por materiales sintéticos empleados en envolturas altamente especializadas (Pereda *et al.*, 2012), las que podrían ser sustituidas por películas comestibles y biodegradables.

Los materiales más empleados para obtener películas comestibles son las proteínas y los polisacáridos, por su capacidad de formar una matriz continua además de ser recursos naturales renovables y abundantes (Ghanbarzadeh *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2011). La proteína aislada del suero de leche (WPI) con un contenido de proteína mayor al 90 % es obtenida como el subproducto del procesamiento de los quesos, se usa con éxito como materia prima para la elaboración de este tipo de películas, y ofrece una excelente barrera al oxígeno a humedades relativas bajas e intermedias y alta permeabilidad al vapor por su naturaleza hidrofílica (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La necesidad de mejorar las propiedades tecnológicas de películas basadas en un solo material como proteínas y polisacáridos ha generado el diseño de películas a partir de sus mezclas combinando las ventajas de cada material (Osés *et al.*, 2009a). También se han evaluado los efectos de factores físicos (tratamiento térmico, pH, fuerza iónica) sobre las propiedades funcionales de las proteínas (Chanasattru *et al.*, 2007). La incorporación de lípidos se evaluó en la formulación de películas para aumentar las propiedades de barrera a la humedad, pero las reacciones de oxidación limitan significativamente su empleo (Kim y Ustunol, 2001).

La goma de mezquite (GM) es un exudado natural producido por árboles de mezquite (*Prosopis* spp.); es una sal neutra de polisacárido ramificado de naturaleza ácida formado por un núcleo de residuos de β -D-galactosa y cadenas laterales de oligosacáridos (Pérez-Orozco *et al.*, 2011), que contiene una fracción proteínica mayor a 6 % (Bosquez-Molina *et al.*, 2003). La GM forma películas con buenas propiedades de barrera al vapor de agua, cuando se combina con pequeñas proporciones de materiales lipídicos (Díaz-

moisture and solutes, and they can even be used to incorporate additives (Kim and Ustunol, 2001). An added interest is the challenge to reduce the environmental pollution caused by discarding synthetic materials used for highly specialized wrappings (Pereda *et al.*, 2012), which can be substituted for edible, biodegradable films.

The materials most used in manufacturing edible films are proteins and polysaccharides because they are capable of forming a continuous matrix. Moreover, they are abundant renewable natural resources (Ghanbarzadeh *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2011). The protein isolated from whey (WPI), with a protein content of more than 90 %, is obtained from the by-product of cheese making. It has been used successfully as raw material in the manufacture of this type of film, offering an excellent barrier to oxygen at low relative moisture and medium and high permeability to vapor due to its hydrophilic nature (Pérez-Gago and Krochta, 2002).

The need to improve technological properties of the films based on a single material such as proteins or polysaccharides has motivated the design of films from a mixture of the two to combine the advantages of each (Osés *et al.*, 2009a). The effects that physical factors (heat treatment, pH, ionic force) may have on the functional properties of the proteins have also been studied (Chanasattru *et al.*, 2007). The incorporation of lipids in the formulation of films was assessed in the search to increase moisture barrier properties, but oxidation reactions significantly limit its use (Kim and Ustunol, 2001).

Mesquite gum (GM) is a natural exudate produced by mesquite (*Prosopis* sp.) trees. It is a neutral ramified polysaccharide salt of acid nature formed by a nucleus of β -D-galactose residues and lateral chains of oligosaccharides (Pérez-Orozco *et al.*, 2011) and containing a protein fraction above 6 % (Bosquez-Molina *et al.*, 2003). GM forms films with good properties as a barrier to water vapor when combined with small proportions of lipid material (Díaz-Sobac *et al.*, 2002). It can also improve the flexibility of the WPI films, providing properties of less force and greater elongation to rupture, and has the potential to be used as a plasticizer (Osés *et al.*, 2009a). However, it is important to assess other characteristics such as wettability that modifies the barrier properties of the film. For this reason, the objective of this study were to assess the effect

Sobac *et al.*, 2002). Además puede mejorar la flexibilidad de las películas de WPI, proporcionando propiedades de menor esfuerzo y de mayor elongación a la ruptura, con potencial de uso como un plastificante (Osés *et al.*, 2009a). Sin embargo, es importante evaluar otras características como la humectación ya que modifica las propiedades barrera de la película, por lo cual los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades de humectación y el comportamiento térmico de las películas a base de WPI-GM, así como la naturaleza de las interacciones proteína-polisacárido involucradas en la respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y materiales

En la elaboración de las películas se usó WPI (Bi-Pro, contenido proteínico ≈ 90 %, Davisco Foods International, EE.UU.) y GM (Natural Products, México). Como plastificante se usó sorbitol (Panreac Química S.A., España).

Obtención de las dispersiones

Las dispersiones acuosas de WPI y GM se prepararon al 10 % (p/p) y se almacenaron a 5 °C por 24 h para su completa hidratación. Las dispersiones de WPI se calentaron mediante un baño con agitación a 90 °C por 20 min (Pérez-Gago y Krochta, 2002). Las dispersiones de GM se trataron a 80 °C por 15 min (Pérez-Orozco *et al.*, 2011). Para muestras testigo se omitió el tratamiento térmico en las dispersiones de WPI y en las de GM. Como plastificante se usó sorbitol en 30 % (p/p con respecto a los hidrocoloides) y se incorporó en la dispersión de GM. Después se elaboraron mezclas de las dispersiones acuosas en las siguientes proporciones de WPI-GM: 91-9, 93-7, 95-5, 97-3, 99-1, con un agitador magnético por 10 min, a velocidad constante y se usó una bomba de vacío para eliminar las burbujas de aire. El pH de cada una de las dispersiones se determinó con un potenciómetro (Corning Instruments, EE.UU.).

Evaluación de potencial zeta (z)

Las dispersiones acuosas de WPI y GM fueron analizadas con un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) para determinar su potencial-z (García-Márquez *et al.*, 2014). Las mediciones se realizaron por triplicado y a 25 °C.

of heat treatment on the humectation properties and thermal behavior of the films made from a base of WPI-GM, and to observe the nature of the protein-polysaccharide interactions involved in their response.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and materials

WPI (Bi-Pro, protein content ≈ 90 %, Davisco Foods International, USA) and GM (Natural Products, México) were used to make the films. Sorbitol (Panreac Química S.A., Spain) was used as a plasticizer.

Preparation of dispersions

Aqueous WPI and GM dispersions were prepared at 10 % (w/w) and stored at 5 °C for 24 h to allow complete hydration. The WPI dispersions were heated in a water bath with shaking at 90 °C for 20 min (Pérez-Gago and Krochta, 2002). The GM dispersions were treated at 80 °C for 15 min (Pérez-Orozco *et al.*, 2011). For the control samples, the heat treatment was omitted in the WPI and GM dispersions. As a plasticizer, 30 % sorbitol (w/w, relative to the hydrocolloids) was incorporated into the GM dispersion. The mixtures of the aqueous dispersions were then prepared in the following proportions of WPI-GM: 91-9, 93-7, 95-5, 97-3, and 99-1, with a magnetic shaker for 10 min at constant speed; a pump was used to eliminate air bubbles. The pH of the dispersions was determined with a potentiometer (Corning Instruments, USA).

Evaluation of z potential

The aqueous dispersions of WPI and GM were analyzed with Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipment to determine their z potentials (García-Márquez *et al.*, 2014). The measurements were done in triplicate at 25 °C.

Preparation of films

Twelve grams of WPI-GM solution were poured onto leveled polyvinyl chloride plates coupled with a 12 cm diameter ring to delimit the edges. The solution was then dried for 24 h at 20 °C. The films were conditioned at 50 ± 1 % relative humidity (Osés *et al.*, 2009b).

Preparación de las películas

Doce g de solución WPI-GM se vertieron sobre placas niveladas de policloruro de vinilo, las cuales fueron acopladas con un anillo de 12 cm de diámetro para delimitar los bordes. Después la solución se secó 24 h a 20 °C. Las películas se acondicionaron a una humedad relativa de 50 ± 1 % (Osés *et al.*, 2009b).

Evaluación de las propiedades de humectación

El ángulo de contacto formado entre una gota de agua y una de las caras superficiales de las películas (la expuesta al aire de secado) se cuantificó con un goniómetro (TANTEC, EUA). La medición del ángulo de contacto aparente (Marmur, 2006) correspondió al método de la gota dispuesta (Kwok y Newman, 1999), donde una gota de agua desionizada (20 μ L) se dejó caer a 5 mm de altura sobre la película colocada horizontalmente. Cada evaluación se realizó a 20 ± 1 °C, por cuadruplicado.

Determinación del comportamiento térmico

Las determinaciones del comportamiento térmico de las películas WPI-GM se realizaron con un microcalorímetro diferencial de barrido (DSC) (Micro DSC 3.2 Setaram Scientific, EE.UU.). Las películas se trituraron, pesaron (aproximadamente 0.2 g por muestra) y se depositaron en celdas de acero inoxidable selladas herméticamente (Hatakeyama y Quinn, 2000). Las muestras se calentaron aplicando una rampa de calentamiento de 25 a 105 °C con 0.5 °C min^{-1} . El microcalorímetro DSC se calibró con un estándar de Indio caracterizado por una temperatura de fusión de 156.6 °C y una entalpia asociada de 28.71 J g^{-1} (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.) (Ramos *et al.*, 2013). Una celda con alúmina (Al_2O_3) se usó como referencia. El software SETSOF (Setaram Scientific, EE.UU.) se empleó para obtener las transiciones térmicas: Temperatura onset (T_o), temperatura de fusión (T_f) y la entalpia de fusión (ΔH_f). Cada evaluación fue realizada por duplicado.

Análisis de espectroscopia de infrarrojo

Los espectros de las películas se determinaron usando un espectrómetro de infrarrojos Cary 630 por Transformadas de Fourier (FT-IR, Agilent Technologies, EE.UU.) en modo de reflectancia total atenuada (ATR). El espectro FT-IR fue obtenido en un intervalo de longitud de onda de 600 a 4000 cm^{-1} usando 16 barridos a una resolución de 18 cm^{-1} . Tres réplicas por tratamiento fueron recolectadas, y para el análisis se seleccionaron cuatro regiones espectrales: 800-1150 para determinar la presencia

Evaluation of the humectation properties

The contact angle formed between the water drop and one of the surfaces of the film (that was exposed to air during drying) was quantified with a goniometer (TANTEC, USA). Measurement of the apparent contact angle (Marmur, 2006) was done by the goniometer-sessile drop technique (Kwok and Neumann, 1999), in which a drop of di-ionized water (20 μ L) was dropped onto a horizontal film from a 5 mm height. Each evaluation was done in quadruplicate at 20 ± 1 °C.

Determination of thermal behavior

The determinations of thermal behavior of the WPI-GM films were done with a differential scanning microcalorimeter (DSC) (Micro DSC 3.2 Setaram Scientific, USA). The films were macerated, weighed (approximately 0.2 g per sample) and deposited in stainless steel cells, which were hermetically sealed (Hatakeyama and Quinn, 2000). The samples were heated gradually from 25 to 105 °C, raising the temperature 0.5 °C min^{-1} . The DSC was calibrated with an Indian standard characterized by a fusion temperature of 156.6 °C and associated enthalpy of 28.71 J g^{-1} (TA Instruments, New Castle, DE, USA) (Ramos *et al.*, 2013). One cell with aluminum (Al_2O_3) was used as reference. The software SETSOF (Setaram Scientific, USA) was used to obtain the thermal transitions Onset temperature (T_o), fusion temperature (T_f) and fusion enthalpy (ΔH_f). Each evaluation was done in duplicate.

Infrared spectroscopy analysis

The spectra of the films were determined using a Fourier transform infrared spectrometer Cary 630 (FT-IR, Agilent Technologies, USA) in the attenuated total reflectance (ATR) mode. The FT-IR spectrum was obtained in a wavelength interval of 600 to 4000 cm^{-1} using 16 scans at a resolution of 18 cm^{-1} . Three replications per treatment were collected and, for the analysis, four spectral regions were selected: 800-115 cm^{-1} to determine the presence of C-C, C-O and C-H groups; 1600-1900 cm^{-1} to determine the presence of primary and secondary amides, the -SH groups were assessed between 2200-1900 cm^{-1} and from 3000-3600 cm^{-1} for its relevance in the determination of -OH groups (Barth, 2007).

Statistical analysis of the results

The experimental design was one-factor; the factor was the variation in the concentration of WPI relative to GM. A concentration of 10 % (w/w) was maintained in the dispersion.

de grupos C-C, C-O y C-H; 1600-1900 cm^{-1} para determinar la presencia de amidas primarias, secundarias; los grupos -SH se evaluaron entre 2200-1900 cm^{-1} ; y de 3000-3600 cm^{-1} , por su relevancia para determinar grupos -OH (Barth, 2007).

Análisis estadístico de los resultados

El diseño experimental fue unifactorial, el factor fue la variación de concentración de WPI en relación a GM, y se mantuvo una concentración de 10 % (p/p) en la dispersión. Los tratamientos fueron cinco niveles de concentración (WPI-GM: 91-9, 93-7, 95-5, 97-3, 99-1). Los resultados se analizaron con un ANDEVA, se usó la distribución *t* de Student, y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando Minitab versión 16 para Windows (Minitab, Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto la WPI como la GM fueron compatibles en solución y pudieron mezclarse sin separación de fases aparente. Las películas obtenidas fueron translúcidas, flexibles (cuando se aplicó un tratamiento térmico), homogéneas sin que se detectaran poros o rupturas.

Las proteínas del WPI pueden formar redes tridimensionales que atrapan agua y otros componentes solubles (Chanasattru *et al.*, 2007) y forman geles cuando son previamente calentadas para inducir el desdoblamiento molecular, lo cual permite la exposición de sus grupos sulfhidrilo internos así como de los grupos hidrofóbicos. Este desdoblamiento da lugar a interacciones intermoleculares proteína-proteína (fuerzas entrópicas e interacciones dipolares y electrostáticas), las que junto con las reacciones de intercambio interacciones sulfhidrilo/disulfuro, están involucradas en la formación de las matrices que resultan en películas (Guckian *et al.*, 2006).

Las películas obtenidas con las mezclas WPI-GM pudieron despegarse de las placas con facilidad pero aquellas sin tratamiento térmico, aunque contenían sorbitol como plastificante, fueron frágiles lo que requirió un manejo cuidadoso para el desprendimiento de la superficie de soporte y para las evaluaciones posteriores. Cuando proteínas globulares nativas son dispersas en agua a pH neutral, no se forman de una matriz estructural porque las fuerzas repulsivas intermoleculares son mayores que las atractivas (Byant y McClements, 1998).

The treatments were five levels of concentration (WPI-GM: 91-9, 93-7, 95-5, 97-3, 99-1). The results were analyzed with an ANOVA; a Student *t* distribution was used, and the treatment means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$) using Minitab version 16 for Windows (Minitab, Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

Both WPI and GM were compatible in solution and could mix without apparent separation phases. The films obtained were translucent, flexible (when the heat treatment was applied), and homogeneous, and no pores or ruptures were detected.

The WPI proteins form tri-dimensional networks that trap water and other soluble components (Chanasattru *et al.*, 2007) and form gels as long as they are previously heated to induce molecular unfolding that permits exposure of its internal sulfhydryl groups as well as the hydrophobic groups. This unfolding leads to protein-protein intermolecular interactions (entropic forces and dipolar and electrostatic interactions) which, together with the reactions of sulfhydryl/disulfide interaction exchange, are involved in the formation of the matrixes that result in films (Guckian *et al.*, 2006).

The films obtained with the WPI-GM mixtures could be easily detached from the plates, while those without heat treatment, despite the sorbitol as plasticizer, were fragile and required careful handling for both detaching it from the surface of the support and for the later assessments. When native globular proteins are dispersed in pH neutral water, a structural matrix is not formed because the intermolecular repulsive forces are stronger than attractive forces (Byant and McClements, 1998).

Evaluation of z potential

The proteins and polysaccharides in solution have an electric charge generated by the presence of ionizable groups and the conditions of the solution, such as pH, concentration and availability of counter-ions. The z potential, or electric potential of the surface of the WPI and GM mixtures in different proportions is presented in Table 1; the temperatures 20 and 90 °C correspond to the heat treatment conditions of the polymer solution.

According to Loveday *et al.* (2014), the stabilization of hydrocolloid aggregates from proteins, such as WPI, with polysaccharides occurs mainly

Evaluación del potencial zeta

Las proteínas y polisacáridos en solución presentan una carga eléctrica generada por la presencia de grupos ionizables y las condiciones de la solución como pH, concentración y disponibilidad de contraiones. El potencial z o potencial eléctrico de superficie de mezclas de WPI y GM en diferente proporción se presenta en el Cuadro 1; las temperaturas de 20 y 90 °C corresponden a las condiciones de tratamiento térmico de la solución polimérica.

Según Loveday *et al.* (2014), la estabilización de agregados de hidrocoloides con proteínas como la WPI con polisacáridos ocurre principalmente por interacciones electrostáticas. Estas interacciones son afectadas por la proporción entre biopolímeros, el pH y el punto isoeléctrico (pI) y modifican el potencial z. El tratamiento térmico a 90 °C de WPI aumentó la carga neta de todas las mezclas por el desdoblamiento de las cadenas proteínicas y la exposición de sus residuos ácidos (Cuadro 1), los que a $\text{pH} > \text{pI}$ están ionizados; también quedan expuestos otros sitios reactivos (aminoácidos) lo que aumenta las probabilidades de interacciones con los polisacáridos. En estos últimos, también ocurre una ionización de los grupos ácidos que adquieren carga negativa ($-\text{COO}^-$) (Cuadro 1). La interacción entre polisacáridos aniónicos con proteínas aniónicas ($\text{pH} > \text{pI}$) ocurre por las interacciones entre los sitios reactivos aniónicos de los polisacáridos y los pocos sitios reactivos catiónicos de las proteínas, formando agregados aniónicos proteína-polisacárido, donde la proporción del polisacárido

through electrostatic interactions. These interactions are affected by the proportion of biopolymers, the pH and the isoelectric point (pI), and modify the z potential. The WPI heat treatment at 90 °C increased the net charge of all the mixtures because of the unfolding of the protein chains and the exposure of its acid residues (Table 1), which are ionized at $\text{pH} > \text{pI}$. Also, other reactive sites (amino acids) become exposed, increasing the probable interactions with polysaccharides. In the latter, ionization of the acid groups also occurs, and they acquire a negative charge ($-\text{COO}^-$) (Table 1). The interaction between anionic polysaccharides and anionic proteins ($\text{pH} > \text{pI}$) occurs because of the interactions between the reactive anionic sites of the polysaccharides and the few reactive cationic sites of the proteins, forming anionic protein-polysaccharide aggregates, in which the proportion of the polysaccharide has a relevant function in aggregate solubility (Tolstoguzov, 2006). In both cases, with or without heat treatment, a maximum negative value was obtained for the WPI-GM 95-5 mixture. It should be mentioned that the pH of the WPI-GM dispersions was maintained within an interval of 6.85 to 6.70, where the increase in the proportion of GM in the mixture progressively decreased this parameter. For the aqueous dispersions of the biopolymers studied, it was found that when the GM dispersion was heated (80 °C/15 min), pH decreased from 5.3 to 4.8 and the z potential from -15.23 mV to -17.1 mV, whereas for WPI dispersion, pH values varied from 6.8 to 6.6 (90 °C/20 min), and those of the z potential were -15.80 mV to -28.33 mV, respectively, coinciding with the findings of Kováčová *et al.* (2009) and Klein *et al.*, (2010) in WPI dispersions.

Cuadro 1. Evaluación de potencial ζ de dispersiones de WPI-GM.

Table 1. Evaluation of ζ potential of WPI-GM dispersions.

Dispersión WPI-GM (%)	Potencia ζ (mV) [†]	
	T= 20 °C	T= 90 °C
99-1	$-13.53 \pm 0.7a$	$-21.96 \pm 0.7a$
97-3	$-16.66 \pm 0.6b$	$-23.95 \pm 0.3b$
95-5	$-17.0 \pm 0.3b$	$-27.80 \pm 0.2c$
93-7	$-14.66 \pm 0.5a$	$-24.06 \pm 0.5b$
91-9	$-16.13 \pm 1.0b$	$-24.20 \pm 0.5b$

[†]Valores promedio de tres repeticiones \pm error estándar; valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) [‡]Values are the average of three replications \pm standard error; values with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

Experimental film wettability

Measurement of the contact angle, which refers to the angle formed between the water drop deposited and the film, and the data obtained, are direct indicators of the humectation capacity of a surface (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 2009; Kokoska *et al.*, 2010), it can be interpreted as the degree of hydrophobicity of the contact material. The results obtained for the parameter of humectation of the WPI-GM films are shown in Table 2.

There is a difference in humectation of the solutions by effect of the heat treatment; that

tiene una función relevante en la solubilidad de los agregados (Tolstoguzov, 2006). En ambos casos, con o sin tratamiento térmico se obtuvo un valor máximo negativo para la mezcla WPI-GM 95-5. Cabe mencionar que el pH de las dispersiones WPI-GM se mantuvo en un intervalo de 6.86 a 6.70, donde el aumento en la proporción de GM en la mezcla disminuyó progresivamente este parámetro. Para las dispersiones acuosas de los biopolímeros estudiados, se encontró que al calentar la de GM (80 °C/15 min) el pH pasó de 5.3 a 4.8 y el potencial z de -15.23 mV a -17.1 mV, mientras que para la dispersión de WPI los valores de pH variaron de 6.8 a 6.6 (90 °C/20 min), y los del potencial z fueron de -15.80 mV a -28.33 mV, respectivamente, coincidiendo con lo encontrado por Kováčová *et al.* (2009) y Klein *et al.*, (2010) en dispersiones de WPI.

Humectación de las películas experimentales

La medición del ángulo de contacto, el cual se refiere al ángulo formado entre la gota de agua depositada y la película, y los datos obtenidos, son indicadores directos de la capacidad de humectación de una superficie (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 2009; Kokoska *et al.*, 2010); también puede interpretarse como el grado de hidrofobicidad del material de contacto. Los resultados obtenidos para el parámetro de humectación de las películas elaboradas con WPI-GM se muestran en el Cuadro 2.

Existe una diferencia en la humectación por efecto del tratamiento térmico de las soluciones, es decir, la exposición al calor disminuyó la humectación de la película. Esto coincide con lo observado por Guckian *et al.* (2006) de que las películas de WPI sin tratamiento térmico son solubles, mientras que al aplicar calor a las soluciones de WPI se obtienen películas insolubles.

Al calentar las proteínas del suero lácteo a 80 °C a pH neutral, ocurre un desdoblamiento de la estructura globular exponiendo los grupos libres tiol (-SH) reactivos, y la desnaturalización puede ser completada en 12.5 min de exposición al calor (Baier *et al.*, 2004). Generalmente las películas con valores altos de ángulo de contacto exhiben una alta concentración de grupos hidrófobos en la superficie, lo cual aumenta sus propiedades barrera contra la humedad (Tang y Jiang, 2007) y reduce su humectación.

is, exposure to heat decreased film wettability, coinciding with Guckian *et al.* (2006), who observed that the untreated WPI films are soluble, while by applying heat to the WPI solutions, insoluble films are obtained.

When whey proteins are heated to 80 °C at neutral pH, unfolding of the globular structure occurs, exposing the free reactive thiol groups (-SH), and denaturalization can be completed in 12.5 min of heat exposure (Baier *et al.*, 2004). Generally, the films with high contact angle values exhibit a high concentration of hydrophobic groups on the surface, which increases moisture barrier properties (Tang and Jiang, 2007) and reduces its wettability. Moreover, the GM concentration in the films affected their humectation; the higher the concentration, the larger the contact angle (Table 2).

Conditions of the aqueous medium can intervene in the nature and intensity of the interactions between the proteins and polysaccharides; for example, at low ionic force and neutral pH, both WPI (Kováčová *et al.*, 2009) and GM (Pérez-Orozco *et al.*, 2011) are negatively charged and remain co-solubilized in the aqueous medium. Indeed, at values close to the isoelectric point of the proteins, it is possible that protein-polysaccharide complexes form because of electrostatic interaction (Jones and McClements, 2011), which can result in changes in hydrophobic properties, as was observed when the GM concentration was increased in the films. The heat

Cuadro 2. Ángulo de contacto en películas WPI-GM.
Table 2. Contact angle on WPI-GM films.

Película WPI-GM (%)	Ángulo de contacto (°) [†]	
	T= 20 °C	T= 90 °C
99-1	42.6±0.2a	58.3±0.2b
97-3	43.3±0.1b	59.0±0.3a
95-5	43.1±0.4ab	59.3±0.2a
93-7	44.2±0.1c	61.1±0.1c
91-9	45.0±0.3d	62.0±0.4d

[†]Valores promedio de cuatro repeticiones ± error estándar; valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Las temperaturas de 20 y 90 °C corresponden al tratamiento térmico de la solución polimérica de formación
[‡]Values are the average of four replications ± standard error; values with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$). The temperatures 20 and 90 °C correspond to the heat treatment of the polymer solution of formation.

Además, la concentración de GM en las películas afectó su humectación y a mayor concentración, mayor ángulo de contacto (Cuadro 2).

Las condiciones del medio acuoso pueden intervenir en la naturaleza e intensidad de las interacciones entre las proteínas y los polisacáridos, por ejemplo, a baja fuerza iónica y pH neutral, tanto la WPI (Kováčová *et al.*, 2009) como la GM (Pérez-Orozco *et al.*, 2011) se encuentran cargados negativamente y permanecen co-solubilizados en el medio acuoso. Incluso, en valores cercanos al punto isoelectrico de las proteínas, es posible que se formen complejos proteína-polisacárido debido a la interacción electrostática (Jones y McClements, 2011), lo cual puede resultar en cambios de las propiedades hidrofóbicas, como se observó al aumentar la concentración de GM en las películas. El tratamiento térmico genera la pérdida de la estructura terciaria exponiendo los aminoácidos que se encontraban en capas interiores, y además favorece la interacción entre proteína-proteína (Pérez-Gago y Krochta, 2001) y proteína-polisacárido al desnaturar la fracción proteínica de GM (Osés *et al.*, 2009a), obteniendo estructuras con menor solubilidad.

Determinación del comportamiento térmico

El efecto del tratamiento con calor de las soluciones de WPI-GM sobre las propiedades térmicas de las películas experimentales fue analizado por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC, siglas en inglés). Un termograma DSC de las películas a base de WPI-GM en proporción 95-5, con dos diferentes temperaturas de tratamiento, se presenta en la Figura 1.

Fioramonti *et al.* (2014) reportan que sobre 85 °C ya no se observan transiciones debido al tratamiento térmico por ocurrir una desnaturación completa de las proteínas de WPI. También puede inferirse que la presencia del sorbitol en las películas fue compatible con los polímeros de prueba, ya que solo se presentó un pico endotérmico. Si algunos de los dos biopolímeros (WPI o GM) fuera inmiscible con el plastificante, la mezcla podría exhibir más de un pico correspondiente a las fases no mezcladas (Ramos *et al.*, 2013).

Las películas elaboradas sin tratamiento térmico (a temperatura ambiente, 20 °C) mostraron una transición térmica correspondiente a una temperatura de fusión (T_f) de 81 ± 0.2 °C. La temperatura de

treatment generates the loss of the tertiary structure, exposing the amino acids that were originally found in the inner layers, and also favors the interactions protein-protein (Pérez-Gago and Krochta, 2001) and protein-polysaccharide by denaturalizing the GM protein fraction (Osés *et al.*, 2009a), resulting in less soluble structures.

Determination of thermal behavior

The effect of the heat treatment of the WPI-GM solutions on the thermal properties of the experimental films was analyzed with differential scanning calorimetry (DSC). A DSC thermogram of the WPI-GM films in the 95-5 proportion with two different treatment temperatures is presented in Figure 1.

Fioramonti *et al.* (2014) reported that above 85 °C transitions caused by the heat treatment were no longer observed due to a complete denaturalization of the WPI proteins. It can also be inferred that the presence of sorbitol in the films was compatible with the test polymers since only one endothermic peak occurred. If one of the two biopolymers (WPI or GM) were immiscible with the plasticizer, the mixture might have had more than one peak, corresponding to the unmixed phases (Ramos *et al.*, 2013).

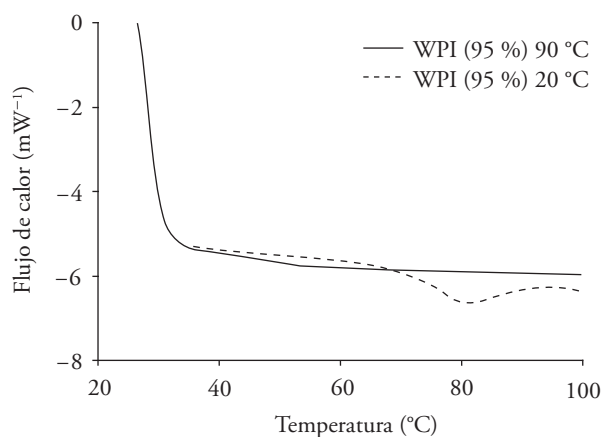


Figura 1. Termogramas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las películas comestibles de la dispersión acuosa de proteína aislada de suero de leche-goma de mezquite (WPI-GM) en proporción 95-5.

Figure 1. Thermograms by differential scanning calorimetry (DSC) of the edible films made from aqueous dispersion of whey protein isolate and mesquite gum (WPI-GM) in a 95-5 proportion.

desnaturalización de WPI es alrededor de 73 °C (Fioraminti *et al.*, 2014), de tal manera que la presencia del polisacárido modifica ese parámetro, lo cual coincide con los resultados de este estudio (Cuadro 3).

Estos resultados son semejantes a lo reportado por Noisuwan *et al.* (2008), quienes encontraron una T_f de 79 °C en mezclas de WPI y almidón de arroz, mientras que las películas elaboradas después de calentar la solución de WPI (90 °C por 20 min) no mostraron cambios de transición de fase.

La presencia de polisacáridos a bajas concentraciones (2 % p/v) en mezclas de WPI con pectina y goma guar no modificaron la estabilidad térmica de la proteína; sin embargo, concentraciones mayores de polisacáridos, como las usadas para GM en el presente estudio, afectaron las propiedades térmicas de la proteína (Ibanoglu, 2005). El aumento en la concentración de GM en las películas, tendió a aumentar los valores de ΔH_f (Cuadro 3), lo cual puede significar una mayor estabilidad térmica de las películas. Esta modificación probablemente se debe a la interacción electrostática entre las fracciones de proteína (WPI) cargadas positivamente y los grupos $-\text{COO}^-$ del polisacárido (GM), aumentando la contribución entálpica (Noisuwan *et al.*, 2008) o bien a un incremento en las interacciones proteína-proteína (Ramos *et al.*, 2013). Según Sobral *et al.* (2011), decrementos en T_o y T_f podrían reflejar un aumento en el volumen libre en la red que integra la estructura de la película y en la movilidad de los segmentos de las cadenas poliméricas que la componen. Como se observa en el Cuadro 3, ambos parámetros aumentaron y pudo ocurrir una mayor interacción entre los biopolímeros a medida que la proporción de GM aumentó en la mezcla.

Análisis FT-IR

La espectroscopia de infrarrojo FT-IR es una técnica usada para estudiar sistemas a base de hidrocoloides ya que hay regiones fácilmente identificables en el espectro del infrarrojo medio, donde la absorción de proteína (Wang *et al.*, 2013) y polisacárido (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010) se registra de manera diferente. El espectro FT-IR en la región de 600 a 3600 cm^{-1} (Figura 2) se empleó para analizar el efecto del tratamiento térmico sobre las modificaciones estructurales de las películas a base de WPI-GM, y se eligió la concentración 95-5 para esta evaluación.

The films made without the heat treatment (at room temperature, 20 °C) exhibited a thermal transition corresponding to a fusion temperature (T_f) of 81 ± 0.2 °C. The WPI denaturalization temperature was around 73 °C (Fioraminti *et al.*, 2014), so that the presence of the polysaccharide modified this parameter, coinciding with the results of our study (Table 3).

The results are similar to those reported by Noisuwan *et al.* (2008), who found a T_f of 79 °C in WPI and rice starch mixtures, while the films made after heating the WPI solution (90 °C for 20 min) did not show changes of phase transition.

The presence of polysaccharides at low concentrations (2 % w/v) in mixtures of WPI with pectin and guar gum did not modify the thermal stability of the protein; however, higher concentrations of polysaccharides, such as those of GM used in this study, affected protein thermal properties (Ibanoglu, 2005). The increase in the GM concentration in the films tended to increase the ΔH_f values (Table 3), possibly meaning greater thermal stability of the films. This modification is likely due to the electrostatic interaction between protein (WPI) fractions charged positively and the $-\text{COO}^-$ groups of the polysaccharide (GM), increasing the contribution of enthalpy (Noisuwan *et al.*, 2008), or rather to an increase in the protein-protein interactions (Ramos *et al.*, 2013). According to Sobral *et al.* (2011), decreases in T_o and T_f can

Cuadro 3. Valores promedio y desviación estándar de las propiedades térmicas obtenidas por DSC.

Table 3. Average values and standard deviation of the thermal properties obtained by DSC.

Película WPI-GM)	DSC [†]		
	T_o (°C) [‡]	T_f (°C) [§]	ΔH_f (Jg ⁻¹) [¶]
99-1	72.01±0.41c	79.00±0.29b	0.85±0.05b
97-3	73.18±0.14b	81.28±0.90b	0.96±0.01b
95-5	73.49±0.19b	81.08±0.61b	1.03±0.02ab
93-7	73.28±0.14b	81.53±0.81b	1.01±0.10b
91-9	76.74±0.35a	85.39±0.34a	1.27±0.05a

[†]Valor promedio de dos repeticiones \pm error estándar de: [‡]Temperatura Onset, [§]Temperatura de fusión, [¶]Entalpía de fusión. Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) \diamond [†]Values are the average of two replications \pm standard error: [‡]Onset temperature, [§]Fusion temperature, [¶]Fusion enthalpy. Values with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

Las características más importantes en un espectro que involucre proteínas son los picos localizados en la región de 1650 y 1540 cm^{-1} que corresponden a las bandas de amida I y amida II respectivamente (Wang *et al.*, 2013). Para los hidratos de carbono puede localizarse una serie de picos superpuestos en la región de 1180-953 cm^{-1} resultantes de la vibración de enlaces tipo C-C, C-O y C-H (Wang *et al.*, 2013). Se observa una modificación en la banda de absorción 1100 cm^{-1} donde las películas sin tratamiento térmico exhibieron una proporción alta de estas estructuras, en contraste con otras películas con tratamiento térmico donde se reducen de forma notable probablemente debido a la interacción del polisacárido con las proteínas inducido por la desnaturalización térmica (Figura 2). También se observa una ligera disminución en la banda 1420 cm^{-1} que corresponde a los grupos simétricos de $-\text{COO}^-$ de los ácidos glucurónicos de la GM (López-Franco *et al.*, 2008) probablemente por interacción con los grupos ($-\text{NH}_3^+$) de aminoácidos como lisina, arginina e histidina que se presentan en forma ionizada alrededor de pH 7.0.

Barth (2007) indica que la región de 2551 cm^{-1} a 1849 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los grupos tiol ($-\text{SH}$) presentes en la cisteína, en ese sentido se observa una disminución en el intervalo correspon-

reflect an increase in the free volume in the network that integrates the film structure and in the mobility of the segments of the polymeric chains of which it is composed. As can be seen in Table 3, both parameters increased and greater interaction between the biopolymers could have occurred in the measure that the GM proportion increased in the mixture.

FT-IR analysis

FT-IR infrared spectroscopy is a technique used to study hydrocolloid systems since there are easily identifiable regions in the mid infrared spectrum where the absorption of protein (Wang *et al.*, 2013) and of polysaccharide (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010) are registered in different manners. The FT-IR spectrum in the 600 to 3600 cm^{-1} region (Figure 2) was used to analyze the effect of the heat treatment on structural modifications of the WPI-GM films; the 95-5 concentration was chosen for this assessment.

The most important characteristics in a spectrum that involves proteins are the peaks located in the region 1650 and 1540 cm^{-1} that correspond to the amide I and amide II bands, respectively (Wang *et al.*, 2013). For carbohydrates, a series of superimposed peaks can be found in the 1180-953 cm^{-1} region, resulting from the vibration of C-C, C-O and C-H

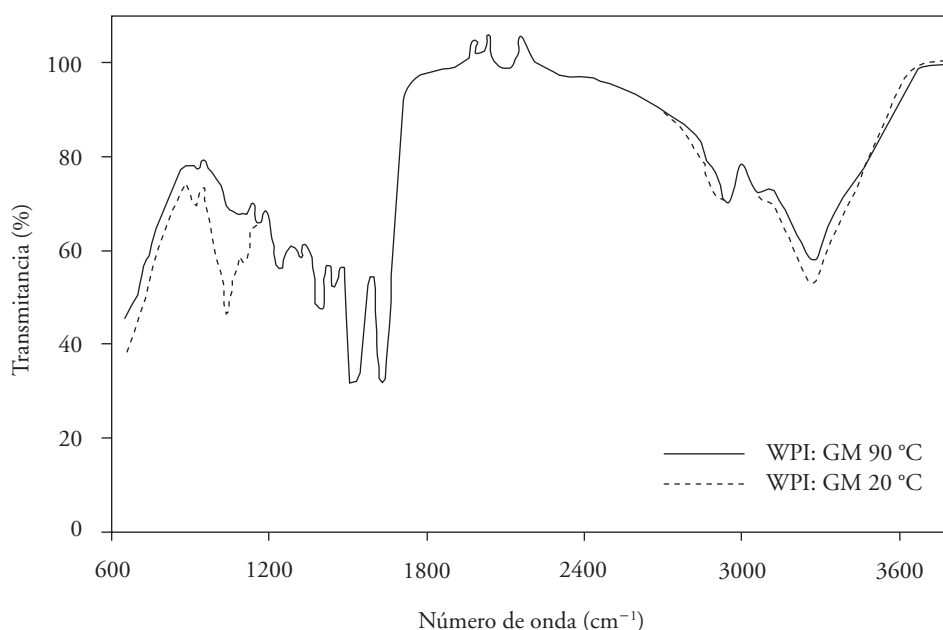


Figura 2. Espectro infrarrojo de películas elaboradas con las dispersiones acuosas de WPI-GM.
Figure 2. Infrared spectrum of films made with WPI-GM aqueous dispersions.

diente, para la muestra tratada a 90 °C (Figura 2) y esta disminución se podría relacionar con la formación de enlaces disulfuro (S–S) en películas con tratamiento térmico. De acuerdo con Pérez-Gago y Krochta (2001), la degradación de la estructura nativa de las proteínas ocasionada por tratamiento térmico, expone los grupos –SH originalmente ocultos dentro de la macromolécula permitiendo la formación de enlaces covalente intermoleculares (S–S), explicable en películas con mayor resistencia al vapor de agua.

En la región entre 3000 y 3600 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de enlaces tipo –OH, disminuyó la intensidad de la banda 3330 cm^{-1} característica de polisacáridos (López-Franco *et al.*, 2008; Espinosa-Andrews *et al.*, 2010), en la película con tratamiento térmico, sugiriendo que estos grupos interactúan con la WPI. Por tanto, los datos obtenidos de un análisis FTIR indican que la desnaturalización térmica modifica la estructura de WPI, lo cual coincide con estudios de Zhang y Zhong (2012) y Qian *et al.*, (2014).

CONCLUSIONES

El tratamiento térmico de las dispersiones de hidrocoloides modificó el potencial eléctrico de superficie, aumentando la carga neta para todas las proporciones proteína-polisacárido. El tratamiento térmico de la WPI influyó en la humectación de la superficie de las películas, asimismo por la proporción de GM en la mezcla.

A través de un análisis DSC se encontró que el valor de ΔH_f de las películas obtenidas con dispersiones acuosas de WPI-GM tratadas térmicamente, se incrementó a medida que aumentó la concentración de GM en la mezcla.

La caracterización por espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) proporcionó información para la comprensión del efecto del tratamiento térmico en las interacciones proteína-proteína y proteína-polisacárido, a través de la modificación en bandas de absorción de grupos funcionales relacionados con la humectación de las películas comestibles.

De acuerdo con este estudio, es posible reducir la humectación de las películas comestibles a partir de WPI-GM por efecto del tratamiento térmico y la proporción de polisacárido.

type bonds (Wang *et al.*, 2013). A modification is observed in the absorption band 1100 cm^{-1} where the untreated films exhibited a high proportion of these structures in contrast with other heat treated films in which they decrease notably, probably due to the interaction of the polysaccharide with proteins induced by thermal denaturalization (Figure 2). A slight decrease in the 1420 cm^{-1} band is also observed. This band corresponds to the symmetric –COO– groups of glucuronic acids of the GM (López-Franco *et al.*, 2008), likely because of interaction with the amino acid (–NH₃⁺) groups such as lysine, arginine and histidine that occur in ionized form at pH about 7.0.

Barth (2007) indicates that the 2551 cm^{-1} to 1849 cm^{-1} region corresponds to the vibrations of the thiol (–SH) groups present in cysteine. In this sense, a decrease in the corresponding interval is observed for the sample treated at 90 °C (Figure 2) and this decrease may be related to the formation of disulfide bonds (S–S) in heat treated films. According to Pérez-Gago and Krochta (2001), degradation of the native protein structure caused by the heat treatment exposes the previously hidden –SH groups within the macromolecule, allowing the formation of covalent intermolecular bonds (S–S), explicable in films that are more resistant to water vapor.

In the region between 3000 and 3600 cm^{-1} , corresponding to the vibrations of –OH type bonds, diminished intensity of band 3330 cm^{-1} , characteristic of polysaccharides (López-Franco *et al.*, 2008; Espinosa-Andrews *et al.*, 2010), is observed in the heat treated film, suggesting that these groups interact with WPI. Therefore, the data obtained from the FT-IR analysis indicate that thermal denaturalization modifies the WPI structure, coinciding with previous studies (Zhang and Zhong, 2012; Qian *et al.*, 2014).

CONCLUSIONS

The heat treatment of the hydrocolloid dispersions modified the surface electric potential, increasing the net charge for all of the protein-polysaccharide proportions. The heat treatment of WPI influenced wettability of film surfaces, as did the proportion of GM in the mixture.

By means of a DSC analysis, it was found that the ΔH_f value of the films obtained with WPI-GM

AGRADECIMIENTOS

Porras-Godínez, agradece al CONACyT-México por el apoyo otorgado a esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1767: 1073-1101.
- Baier, S. K., E. A. Decker, and D. J. McClements. 2004. Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloid*. 18: 91-100.
- Bosquez-Molina, E., I. Guerrero-Legarreta, and E. J. Vernon-Carter. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Res Int*. 36: 885-893.
- Byant, C. M., and D. J. McClements. 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Tech*. 9: 143-151.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza., M. P. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente. 2009. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale*. *J. Food Eng*. 95: 379-85.
- Chanasattru, W., E. A. Decker, and D. J. McClements. 2007. Modulation of thermal stability and heat-induced gelation of β -lactoglobulin by high glycerol and sorbitol levels. *Food Chem*. 103: 512-520.
- Díaz-Sobac, R., H. García, C. I. Beristain, and E. J. Vernon-Carter. 2002. Morphology and water vapor permeability of emulsion films based on mesquite gum. *J. Food Process Pres*. 29: 129-141.
- Espinosa-Andrews H., O. Sandoval-Castilla, H. Vázquez-Torres, E. J. Vernon-Carter, C. Lobato-Calleros. 2010. Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydr Polym*. 79: 541-546.
- Fioramonti, S. A., A. A. Perez, E. E. Aringoli, and A. C. Rubiolo. 2014. Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloid*. 35: 129-136.
- García-Márquez, E., A. Román- Guerrero, F. Cruz-Sosa, C. Lobato-Calleros, J. Álvarez-Ramírez, E. J. Vernon-Carter, and H. Espinosa-Andrews. 2014. Effect of layer (calcium phosphate-chitosan)-by-layer (mesquite gum) matrix on carotenoids-in-water-emulsion properties. *Food Hydrocolloid*. in press.1-8.
- Ghanbarzadeh, B., H. Almasi, and A. A. Entezami. 2010. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innov Food Sci Emerg Tech*. 11: 697-702.
- Guckian, S., C. Dwyer, M. O'Sullivan, E. D. O'Riordan, and F. J. Monahan. 2006. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *Eur Food Res Technol*. 223: 91-95.
- aqueous dispersions treated thermally increased in the measure that the GM concentration increased in the mixture.
- Characterization by infrared spectroscopy (FT-IR) provided information for understanding the heat treatment in protein-protein and protein-polysaccharide interactions by observing the modifications in absorption bands of functional groups related to humectation of the edible films.
- According to our study, it is possible to reduce wettability of edible WPI-GM films with heat treatment and proportion of polysaccharide.

—End of the English version—



- Hatakeyama, T., and F.X. Quinn. 2000. Thermal analysis fundamentals and applications to polymer science. Second edition. John Wiley & Sons. Baffins Lane, Chichester. pp: 45-65.
- Ibanoglu, E. 2005. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chem*. 90: 621-626.
- Jones, O. G., and D. J. McClements. 2011. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treatment electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Adv Colloid Interfac*. 167: 49-62.
- Kim, S.J., and Ustunol, Z. 2001. Solubility and moisture sorption isotherms of whey protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *J. Agric Food Chem*. 49: 4388-4391.
- Klein M., A. Aserin, P. Ben Ishai, N. Garti. 2010. Interactions between whey protein isolate and gum arabic. *Colloid Surfac B: Biointerfac*. 79: 377-383.
- Kokoska, S., F. Debeaufort, A. Lenart, and A. Voilley. 2010. Water vapor permeability, thermal and wetting properties isolate based edible films. *Int Dairy J*. 20: 53-60.
- Kováčová, R., A. Synytsya and J. Štětina. 2009. Characterisation of whey proteins-pectin interaction in relation to emulsifying properties of whey proteins. *Czech J. Food Sci*. 27: 4-8.
- Kwok, D. Y., and A. W. Neumann. 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interfac*. 81: 167-249.
- López-Franco Y. L., A. M. Calderón de la Barca, M. A. Valdez, M. G. Peter, M. Rinaudo, G. Chambat, and F. M. Goycoolea. 2008. Structural characterization of Mesquite (*Prosopis velutina*) gum and its fractions. *Macromol Biosci*. 8: 749-757.
- Loveday, S. M., A. Ye, S. G. Anema, and H. Singh. 2014. Tuning heat-induced colloidal aggregation of whey proteins, sodium caseinate and gum arabic: Effect of protein composition, preheating and gum arabic level. *Food Res Int*. 62: 128-136.
- Marmur, A. 2006. Measurement and interpretation of contact angles. *Soft Matter*. 2: 12-17.

- Noisuwan, A., J. Bronlund, B. Wilkinson, and Y. Hemar. 2008. Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. *Food Hydrocolloid*. 22: 174-183.
- Osés, J., M. Fabregat-Vázquez, R. Pedroza-Islas, S. A. Tomás, A. Cruz-Orea, and J. I. Maté. 2009a. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *J. Food Eng.* 92: 56-62.
- Osés, J., I. Fernández-Pan, M. Mendoza, and J. I. Maté. 2009b. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloid*. 23: 125-131.
- Pereda, M., G. Amica, and N. E. Marcovich. 2012. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydr Polym.* 87: 1318-1325.
- Pérez-Gago, M. B., and J. M. Krochta. 2001. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *J. Food Sci.* 66: 705-710.
- Pérez-Gago, M. B., and J. M. Krochta. 2002. Formation and properties of whey protein films and coatings. In: *Protein-Based Films and Coatings*. Aristippos Gennadios (ed.) B. Raton, FL. February 7, 2002, Ed. CRC Press. pp: 159-180.
- Pérez-Orozco, J. P., E. Barrios-Salgado, A. Román-Guerrero, and R. Pedroza-Islas. 2011. Interacción goma de mezquite-quitosano en la interfase y su influencia en la estabilidad de emulsiones múltiples W1/O/W2. *Rev Mex Ing Quim.* 10: 487-99.
- Qian, L., K. Baohua, H. Jianchun, S. Changyan, and L. Peijun. 2014. Structure and antioxidant activity whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. *Food Struct.* 1: 145-154.
- Ramos, O. L., I. Reinas, S. I. Silva, J. C. Fernandes, M. A. Cerqueira, R. N. Pereira, A. A. Vicente, M. F. Poças, M. E. Pintado, and F. X. Malcata. 2013. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloid*. 30: 110-122.
- Sobral, P. J., R. A. de Carvalho, I.C. Freitas M., A. M. Q. Barbosa B., and E. S. Monterrey-Quintero. 2011. Phase transitions in biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol). *Ciencia Tecnol Alim.* 31: 372-379.
- Tang, C.H., and Y. Jiang. 2007. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. *Food Res Int.* 40: 504-509.
- Tolstoguzov, V. 2006. Phase behavior in mixed polysaccharide systems. In: *Food polysaccharides and their applications*. A. M. Stephen, G. O. Phillips, P.A. Williams. 2nd. Ed. ed. CRC Press, Taylor and Francis group. Boca Raton, FL. pp: 589-627.
- Vu, K. D., R. G. Hollingsworth, E. Leroux, S. Salmieri, and M. Lacroix. 2011. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Res Int.* 44: 198-203.
- Wang, W., Y. Bao, and Y. Chen. 2013. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interaction in a whey protein isolate and sugar system. *Food Chem.* 139: 355-361.
- Zhang Y., and Q. Zhong. 2012. Effects of thermal denaturation on binding between bixin and whey protein. *J. Agric Food Chem.* 60: 7526-7531.