

# Caracterización de emulsiones prebióticas estabilizadas con inulina y $\beta$ -lactoglobulina

M. L. López-Castejón\*, C. Bengoechea, S. Espinosa and C. Carrera

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Sevilla,  
Escuela Politécnica Superior. Calle Virgen de África 7, 41011 Sevilla, España

*Inulin and  $\beta$ -lactoglobulin as stabilizers of prebiotic emulsions*

*Caracterització d'emulsions prebiòtiques estabilitzades amb inulina i  $\beta$ -lactoglobulina*

RECEIVED: 22 MAY 2018; REVISED: 5 JUNE 2018; ACCEPTED: 6 JUNE 2018

## SUMMARY

Inulin is a prebiotic polysaccharide that is being increasingly used in food emulsions as fat replacer, due to its thickening effect. In the present work, oil in water (O/W) emulsions (5/95) have been prepared by means of a pressure homogenizer, using  $\beta$ -lactoglobulin as an emulsifier (0.5 %), and varying the polysaccharide content up to 10 %. The zeta potential measurements suggest that there are no significant protein-polysaccharide interactions in the continuous phase. An increase in viscoelastic properties and viscosity of these pseudoplastic systems is observed as inulin content increases. Although inulin has no surface activity, its presence seems to favor protein adsorption kinetics at the interface. Likewise, the distribution of droplet sizes study for emulsions throughout the storage time points out how bimodal distributions obtained remain constant, indicating their stability, which is reinforced by backscattering results. These prebiotic emulsions may enjoy a great demand by the food industry.

**Keywords:** *Inulin; emulsion; interphase; rheology;  $\beta$ -lactoglobulin.*

## RESUMEN

La inulina es un polisacárido prebiótico que se utiliza cada vez más en emulsiones alimentarias como sustituyente de grasa, al tener un efecto espesante sobre las mismas. En el presente trabajo, se han preparado emulsiones aceite/agua (5/95) mediante un homogeneizador de presión, utilizando  $\beta$ -lactoglobulina como emulsionante a una concentración fija de 0,5 % (p/p), y variando el contenido en polisacárido desde 0 al 10 % (p/p). Las medidas de po-

tencial zeta sugieren que no existen interacciones importantes entre la proteína y el polisacárido en la fase continua, al tiempo que se observa un aumento de las propiedades viscoelásticas y viscosidad de estos sistemas pseudoplásticos. Aunque la inulina no presenta actividad superficial, su presencia parece favorecer la cinética de adsorción de la proteína en la interfase. Asimismo, el estudio de la distribución de tamaños de gota de las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento permite observar cómo las distribuciones bimodales obtenidas permanecen constantes, indicando la estabilidad de las mismas. Esto queda reforzado por los resultados obtenidos por medio de un analizador óptico de emulsiones con detectores de luz transmitida y retrodispersa. Emulsiones con ingredientes prebióticos como las estudiadas tiene un gran potencial en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** *Inulina; emulsión; interfase; reología;  $\beta$ -lactoglobulina*

## RESUM

La inulina és un polisacàrid prebiòtic que s'utilitza cada vegada més en emulsions alimentàries com substituent del greix, en tenir un efecte espesidor sobre les mateixes. En el present treball, s'han preparat emulsions oli / aigua (5/95) mitjançant un homogeneïtzador de pressió, utilitzant  $\beta$ -lactoglobulina com emulsionant a una concentració fixa de 0,5% (p/p), i variant el contingut en polisacàrid des de 0 al 10% (p/p). Les mesures de potencial zeta suggereixen que no hi ha interaccions importants

\*Corresponding author: [llcastejon@us.es](mailto:llcastejon@us.es)

entre la proteïna i el polisacàrid a la fase contínua, ahora que s'observa un augment de les propietats viscoelàstiques i de la viscositat d'aquests sistemes pseudoplàstics. Tot i que la inulina no presenta activitat superficial, la seva presència sembla afavorir la cinètica d'adsorció de la proteïna a la interfase. Així mateix, l'estudi de la distribució de mides de gota de les emulsions al llarg del temps d'emmagatzematge permet observar com les distribucions bimodals obtingudes romanen constants, indicant l'estabilitat de les mateixes. Això queda reforçat pels resultats obtinguts per mitjà d'un analitzador òptic de emulsions amb detectors de llum transmesa i retrodispersa. Emulsions amb ingredients prebiòtics com les estudiades tenen un gran potencial en la indústria alimentària.

**Paraules clau:** *Inulina; emulsió; interfase; reologia;  $\beta$ -lactoglobulina.*

## INTRODUCCIÓ

La búsqueda de una alimentación saludable que mejore la salud requiere, entre otras cosas, formulaciones con un menor contenido en grasa<sup>1</sup>. Por ello, en ocasiones, ésta es sustituida por polisacáridos, como pectina, almidón, kefiran, inulina o goma de xantana, debido a sus propiedades saludables, espesantes y gelificantes<sup>2</sup>. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables<sup>3</sup>, por lo que estos polisacáridos son frecuentemente utilizados en su formulación actuando como emulsionantes o agentes espesantes para, de esa forma, dar lugar a emulsiones cinéticamente estables. Los emulsionantes son sustancias superficialmente activas que pueden adsorberse en la superficie de las gotas de aceite para proporcionar una fuerte estabilización electrostática y estérica contra la floculación, agregación y coalescencia<sup>4</sup>, mientras que los estabilizantes mejoran la estabilidad de la emulsión al aumentar la viscosidad de la fase continua e inhibir la movilidad de las gotas<sup>5,6</sup>. Por lo tanto, los polisacáridos son componentes clave en la formulación de emulsiones comerciales con el fin de controlar su vida útil y sus propiedades organolépticas.

La inulina es un polisacárido natural obtenido de la achicoria, considerado como una fibra dietética y ampliamente utilizada en alimentación<sup>7</sup>. Su uso como sustituyente de grasa se ve favorecido debido a su solubilidad en agua, puesto que sus grupos hidroxilo son más propensos a interactuar con las moléculas de agua que otros grupos funcionales presentes en su estructura. Además, algunos estudios han demostrado que posee propiedades anticancerígenas<sup>8,9</sup> e inmunomoduladoras<sup>10-12</sup>, al tiempo que tiene interesantes efectos biológicos, con lo que se puede utilizar como ingrediente prebiótico y funcional<sup>13,14</sup> dando un valor añadido a estas emulsiones.

Las proteínas de la leche, como la  $\beta$ -lactoglobulina o la b-caseína, son muy usadas en la formulación

de emulsiones alimentarias debido a sus excelentes propiedades emulsionantes y estabilizantes. Las proteínas son otro ingrediente clave en este tipo de productos y normalmente van acompañadas de algún polisacárido. Las interacciones que se establecen entre proteína y polisacárido pueden jugar un papel importante en la estructura y estabilidad de muchos alimentos procesados<sup>15</sup>, lo que hace que la caracterización de sus mezclas sea importante<sup>16</sup>. Las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias, así como la actividad interfacial, la solubilidad o las propiedades emulsionantes y espumantes que poseen, se ven afectadas por estas interacciones, determinando finalmente la relación entre la estructura y las propiedades de los sistemas alimentarios. En este sentido, el control o la manipulación de las interacciones proteína-polisacárido es muy importante para el desarrollo de nuevos alimentos procesados<sup>15</sup>. Estudios previos centrados en las posibles interacciones entre las proteínas de leche y la inulina<sup>17</sup> sugieren, después de cierto tratamiento térmico, la formación de complejos entre  $\beta$ -lactoglobulina e inulina. Estos complejos se han explicado en base a interacciones hidrófobas o interacciones covalentes de tipo Maillard.

Muchos sistemas alimentarios se encuentran en estado fluido durante su producción y procesado, lo que hace que la caracterización y el estudio de parámetros reológicos como la viscosidad, el esfuerzo de cizalla o la velocidad de deformación sean necesarios para evaluar su potencial uso como espesantes de ciertos ingredientes<sup>18,19</sup>. Las propiedades reológicas son muy importantes para el desarrollo de nuevos productos, la estimación de su vida útil, la evaluación sensorial y/o la evaluación de su estabilidad<sup>20</sup>, pudiendo verse afectadas por diversos factores (e.g. temperatura, concentración de la fase continua, pH)<sup>3</sup>.

El uso de la inulina como ingrediente en la formulación de alimentos funcionales está aumentando debido al interés que despiertan sus propiedades prebióticas y sus amplias propiedades funcionales (espesante, agente gelificante, azúcares y sustituto de la grasa,...). Así, su uso en emulsiones ligeras, como batidos o smoothies, resultaría de interés dentro del campo de los alimentos funcionales. Además, no existen muchos estudios previos en la bibliografía sobre la caracterización interfacial de sistemas mixtos proteína- inulina. Por todas estas razones, el objetivo principal del presente trabajo es la caracterización interfacial, reológica y microestructural de emulsiones ligeras de aceite en agua (Oil in Water, O/W) estabilizadas por una proteína láctea típica ( $\beta$ -lactoglobulina 0,5 % (p/p)) y diferentes contenidos de inulina (0-10 % (p/p))<sup>7</sup>. Para ello, se han establecido una serie de objetivos específicos que incluyen la caracterización de disoluciones de los ingredientes sin mezclar (sistemas puros), de disoluciones de sus mezclas (fases continuas), y de las emulsiones correspondientes. De estas últimas, se estudia su estabilidad física, debido a la clara importancia de cara a su vida comercial.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Tanto la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\geq 90$  % (p/p)) como la inulina, procedente de la achicoria, se han utilizado en forma de polvo liofilizado de la compañía Sigma-Aldrich (Estados Unidos). El aceite de girasol empleado fue adquirido en un comercio local, siendo todos los ingredientes de uso alimentario.

Las disoluciones de proteína y de polisacárido se han preparado por separado dispersando la cantidad adecuada en agua desionizada con agitación continua hasta su completa solubilización. La cantidad de  $\beta$ -lactoglobulina se ha mantenido siempre constante, mientras que la de inulina ha sido ajustada convenientemente para obtener una concentración del polisacárido en la disolución final igual a 2,5; 5; 7,5 and 10 % (p/p). Las disoluciones a utilizar como fase continua de las emulsiones a estudiar se obtuvieron mezclando las disoluciones de inulina con la de  $\beta$ -lactoglobulina siempre en proporción 1:1, resultando una concentración final de proteína del 0,5 % (p/p). También se han caracterizado los llamados sistemas puros (polímeros aislados), mezclando cada uno de ellos con agua en proporción 1:1. En todos los casos se ha añadido azida sódica como agente antimicrobiano (0,02 % (p/p)).

Las emulsiones O/W se han preparado añadiendo lentamente aceite en la disolución acuosa y homogeneizando al mismo tiempo con un sistema rotor-estátor Ultra-Turrax T25 Basic (Alemania) con una velocidad del rotor de 3500 rpm durante 3 min. Las diferentes pre-emulsiones obtenidas se han pasado posteriormente por un homogenizador de válvula de alta presión EmulsiFlex-2000-C5 (Alemania) a 70 MPa. Las emulsiones finales han mantenido una proporción fase oleosa/fase continua fija igual a 5/95.

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1. Potencial Zeta

Las medidas de potencial zeta se han realizado en un equipo de dispersión dinámica de luz láser (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Reino Unido), mediante la evaluación de la movilidad electroforética de las partículas. Las muestras se diluyeron previamente 1:100 en agua desionizada. El potencial zeta se ha determinado a 25 °C, mostrando el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas por duplicado, con diez lecturas por cada muestra.

#### 2.2.2. Propiedades reológicas

Los ensayos de reología de cizalla se efectuaron tanto sobre la fase continua como sobre las emulsiones utilizando para ello un reómetro AR 2000 (TA Instruments, Estados Unidos). Se ha utilizado una geometría de aluminio placa-placa en paralelo con baja inercia con un diámetro de 60 mm y un espacio entre placas de 1 mm para todos los ensayos.

En los ensayos de flujo, la velocidad de cizalla se ha incrementado escalonadamente en el intervalo comprendido entre 0,1 y 100  $s^{-1}$ , hasta obtener el estado estacionario a cada velocidad.

#### 2.2.3. Presión y propiedades dilatacionales interfaciales

Las mediciones de la presión interfacial dinámica y las propiedades dilatacionales de superficie se han llevado a cabo utilizando un tensiómetro de gota pendiente (Tracker, IT Concept, Francia), tal y como se ha descrito previamente<sup>21-23</sup>. El módulo dilatacional interfacial (E) ha sido obtenido a través de una serie de compresiones y expansiones sucesivas y de manera sinusoidal de la gota correspondiente. Para ello, ha tenido lugar una disminución y un aumento del volumen de la gota a una amplitud de deformación ( $\Delta A/A$ ) del 10 % y a una frecuencia angular ( $\omega$ ) constante de 100 mHz. Las medidas dilatacionales superficiales se han llevado a cabo mediante cinco ciclos de oscilación sinusoidal, seguidos por un tiempo de reposo de 50 ciclos durante el tiempo necesario para una completa adsorción de la proteína. Se ha monitorizado la respuesta de la presión interfacial ( $\pi$ ,  $mN \cdot m^{-1}$ ) a lo largo de los diferentes ensayos como la diferencia entre la presión interfacial de la disolución acuosa sin proteína ( $\sigma_0$ ) y la presión interfacial en presencia de proteína ( $\sigma$ ).

Los ensayos se han realizado a 20 °C por duplicado, con una reproducibilidad superior al 5 %.

#### 2.2.4. Distribución de tamaño de gota (DTG)

El diámetro medio de gota de las emulsiones se ha medido utilizando un instrumento de difracción de láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Reino Unido). Para ello, se han tomado alícuotas de las emulsiones (0,5 ml) y se han diluido en una disolución de dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)) al 0,2 % (p/p) para facilitar así la rotura de posibles flóculos<sup>24</sup>.

Los valores del diámetro superficial,  $d_{32}$ , que es inversamente proporcional a la superficie específica de las gotas, se ha obtenido mediante la siguiente expresión.

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

donde  $n_i$  es el número de gotas con un diámetro igual a  $d_i$ .

El diámetro volumétrico,  $d_{43}$ , se ha obtenido utilizando la siguiente expresión:

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2)$$

Todas las medidas de DTG se han llevado a cabo en las muestras desde el momento en que se prepararon (día 0) hasta 15 días después.

### 2.2.5. Medidas de retrodispersión

La estabilidad de las emulsiones se ha determinado mediante un analizador óptico de barrido vertical Turbiscan MA 2000 (Formulation, France), en el que se ha medido la retrodispersión de un haz de luz cercano al infrarrojo ( $\lambda=850$  nm) a través de las emulsiones de estudio en función de la altura de la celda<sup>25</sup>. Para ello, las emulsiones se han introducido en celdas con forma de cilindros de vidrio que se han almacenado a 5 °C. La retrodispersión de la luz se ha medido a temperatura ambiente en función del tiempo. Los resultados se han presentado como un perfil de retrodispersión ( $\Delta RD/100$  %) en función del tiempo.

### 2.2.6. Análisis estadístico

Los resultados se han presentado como una media  $\pm$  desviación estándar. Se ha realizado un análisis de varianza con un valor de probabilidad p igual a 0,05. Un valor de p inferior a 0,05 se ha considerado significativo.

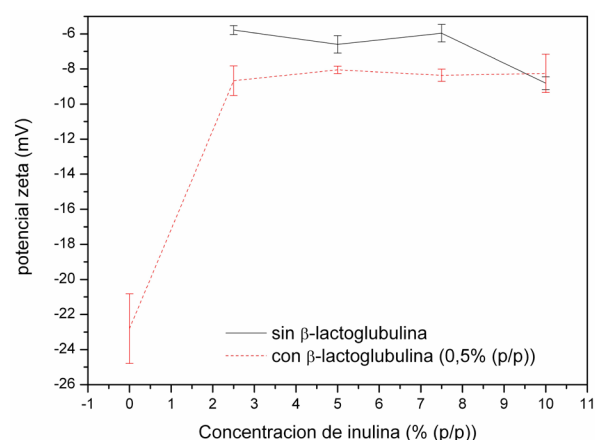
## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Fase continua

#### Potencial zeta

Se han preparado diferentes disoluciones con objeto de poder caracterizar las fases continuas de las emulsiones O/W a estudiar. El contenido de proteína ha sido siempre de 0,5 % para todas las disoluciones, mientras que el contenido de inulina se ha ido variando (0; 2,5; 5; 7,5; 10 %).

Las interacciones que tienen lugar cuando se mezcla una proteína globular con un polisacárido es altamente dependiente del pH, la fuerza iónica, y la relación proteína/polisacárido utilizada<sup>21,26</sup>. Estas interacciones pueden ser tanto segregativas como asociativas dependiendo de la compatibilidad que exista entre los polímeros<sup>27,28</sup>.



**Figura 1.** Potencial zeta frente al contenido en inulina para disoluciones acuosas con y sin  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) y diferentes concentraciones de inulina (0; 2,5; 5; 7,5 y 10 %).

La Figura 1 muestra la evolución del potencial zeta frente al contenido en inulina para los diferentes sistemas utilizados como fase continua, así como para los sistemas puros ( $\beta$ -lactoglobulina o inulina sin mezclar). Se puede observar como todos los sistemas puros, muestran una carga negativa a pH 7, lo que puede conducir a una eventual ausencia de interacciones electrostáticas entre los polímeros en los sistemas mezclados ( $\beta$ -lactoglobulina + inulina). Además, hay que tener en cuenta que el pH utilizado es superior al punto isoeléctrico de la proteína, que se encuentra alrededor de 5,29. Por otra parte, la inulina es un polisacárido no iónico<sup>30</sup>, con lo que el valor negativo relativamente bajo encontrado para los sistemas puros de inulina a las diferentes concentraciones podría ser atribuido a la presencia de grupos hidroxilos presentes en su estructura, lo que podría resultar en la generación de cargas parciales.

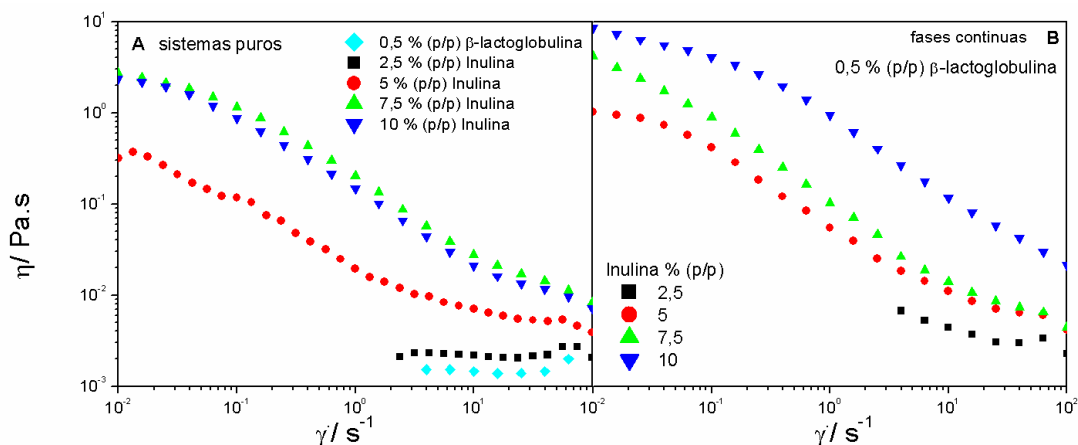
No se han encontrado cambios importantes para el potencial zeta en las mezclas cuando se comparan con los sistemas puros de inulina, lo que podría reforzar la idea de que no hay interacciones importantes entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la inulina. Ya otros autores han utilizado el potencial zeta como parámetro que permitiría evaluar las posibles interacciones existentes entre la  $\beta$ -lactoglobulina y diferentes polisacáridos, como pectinas, carragenanos, o hidroxipropilmetil celulosa (HPMC)<sup>31-33</sup>.

Por todo esto, no son esperables interacciones electrostáticas importantes en las mezclas, pudiéndose encontrar dominios diferentes ricos en cada polímero a lo largo de la fase continua, debido a un efecto de incompatibilidad termodinámica. Se han encontrado resultados similares a pH 7 para mezclas  $\beta$ -lactoglobulina-HPMC<sup>31</sup>.

#### Propiedades reológicas

La Figura 2 muestra las curvas de flujo desde 0,01 a 100  $s^{-1}$  tanto para los sistemas puros (Figura 2A) como para las mezclas usadas finalmente como fases continuas (Figura 2B). En el caso de los sistemas puros con  $\beta$ -lactoglobulina al 0,5 % o inulina al 2,5 % y la fase continua con  $\beta$ -lactoglobulina al 0,5 % a la menor concentración de inulina (2,5 %), el intervalo de estudio se ha reducido debido a la baja consistencia que presentan, que dificulta su medida experimental.

Tanto los sistemas puros como las fases continuas estudiadas muestran un aumento en la viscosidad conforme el contenido en inulina aumenta. Aunque en los sistemas puros no parece haber gran influencia en la viscosidad cuando se aumenta la concentración de inulina de 7,5 a 10 %, este aumento sí es progresivo en el caso de las fases continuas. Cuando se añade un polisacárido a una disolución, se observa frecuentemente un efecto espesante del mismo, lo que ocasiona mayores viscosidades conforme el contenido en polisacárido es mayor. El efecto espesante de la inulina podría estar relacionado con diferentes factores, como el aumento en el contenido total de sólidos o la existencia de interacciones entre los polisacáridos<sup>34-36</sup>. En la industria alimentaria



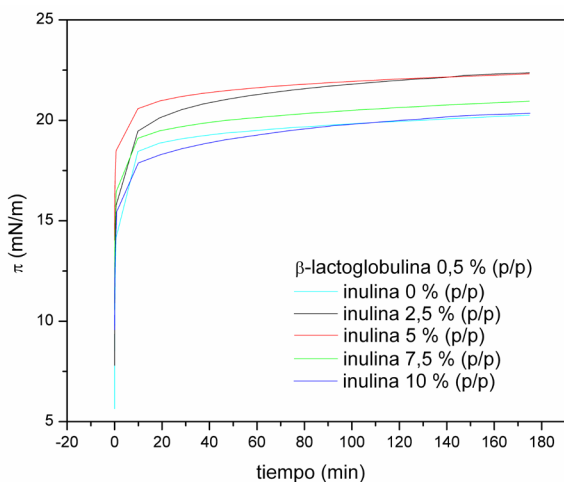
**Figura 2.** Curvas de flujo para: A) disoluciones acuosas de sistemas puros sin mezclar:  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %), inulina (2,5; 5; 7,5 y 10 %); B) disoluciones acuosas de mezclas (fases continuas):  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) + inulina (2,5; 5; 7,5 y 10 %).

se utilizan comúnmente como agentes espesantes, gelificantes o estructuradores de disoluciones acuosas, diferentes polisacáridos (e.g. goma xantana), de manera que retrasen o inhiban procesos de desestabilización como el cremado a través de la modificación de la reología de la fase continua<sup>37,38</sup>

La mayor parte de los sistemas presentan un comportamiento pseudoplástico, mostrando un descenso en la viscosidad conforme aumenta la velocidad de cizalla. Tan sólo los sistemas puros sin inulina o con un contenido en ésta igual al 2,5 % presentan un comportamiento newtoniano, con viscosidades independientes de la velocidad de cizalla en torno a  $1,5 \pm 0,2$  y  $2,2 \pm 0,2$  mPa·s, respectivamente.

### 3.2. Interfase

#### Presión interfacial dinámica



**Figura 3.** Evolución de la presión interfacial ( $\pi$ ) con el tiempo de adsorción para el sistema puro  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) y los sistemas mezclados  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %)-inulina, a diferentes concentraciones de inulina (2,5; 5; 7,5 y 10 %) en la interfase O/W.

En la Figura 3, se muestra la evolución de la presión interfacial ( $\pi$ ) con el tiempo de adsorción para el sistema puro  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) y los sistemas mezclados  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %)-inulina, a diferentes concentraciones de esta última (2,5 %, 5 %, 7,5 % y 10 %), en la interfase O/W a 20 °C. Debido a la carencia de actividad superficial de la inulina, en esta figura no aparecen datos de los sistemas puros de inulina.

Se puede observar claramente que, aunque la inulina no presente actividad superficial, sí tiene un efecto positivo sobre el comportamiento de adsorción de la  $\beta$ -lactoglobulina. Así, se puede apreciar que para las menores concentraciones de inulina estudiadas (2,5 % y 5 %), la actividad de la proteína aumenta significativamente (mayores valores de  $\pi$ ), mientras que al aumentar la concentración de inulina (7,5 % y 10 %), dicho efecto se reduce.

Con el fin de poder cuantificar los efectos observados debido a la presencia del polisacárido sobre la cinética de adsorción de la proteína en los sistemas estudiados, se ha procedido a ajustar los datos correspondientes a la etapa de difusión mostrados en la Figura 3 a la ecuación modificada de Ward y Tordai<sup>39</sup>:

$$\pi = 2C_0KT \left( \frac{Dt}{3.14} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Donde  $C_0$  es la concentración de la proteína en la subfase,  $K$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $t$  es el tiempo de adsorción, y  $D$  es el coeficiente de difusión. Cuando esta etapa de difusión es la etapa controlante de la cinética del proceso de adsorción, la velocidad de difusión,  $K_{diff}$  se puede estimar como la pendiente de la representación de  $\pi$  frente  $t^{1/2}$  en su región lineal<sup>40,41</sup>.

Por otra parte, los datos correspondientes a las etapas de penetración y reordenamiento se ajustaron a



la siguiente ecuación semiempírica de primer orden <sup>42</sup>:

$$\ln\left(\frac{\pi_{180}-\pi_t}{\pi_{180}-\pi_0}\right) = -k_i \cdot t \quad (4)$$

Donde  $p_{180}$ ,  $p_0$ , y  $p_t$  son las tensiones interfaciales a 180 min de adsorción, a tiempo cero, y a cualquier tiempo dado, respectivamente; y  $k_i$  es la constante de velocidad de primer orden. Normalmente, en la representación de la ecuación anterior aparecen más de una región lineal, correspondientes a las diferentes etapas de penetración ( $k_p$ ) y reordenación ( $k_R$ ).

Sólo para el sistema puro con  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) se puede decir que la adsorción de proteína hacia la interfase O/W está controlada por el mecanismo de difusión, ya que fue el único sistema que fue posible ajustar a la ecuación de Ward y Tordai. Para el resto de los sistemas la etapa de difusión es demasiado rápida para poder ser detectada mediante la técnica experimental empleada. Sin embargo, observando los valores de presión interfacial en los instantes iniciales ( $p_0$ ), se puede comprobar como la presencia de inulina acelera la velocidad de adsorción de proteína hacia la interfase en los momentos iniciales, a pesar del aumento de la viscosidad en la fase acuosa detectado en presencia de inulina. En cualquier caso, los valores de  $p_0$  en presencia de inulina siempre superan al correspondiente al sistema de la proteína sin polisacárido. Un efecto similar ha sido descrito en la bibliografía en sistemas mezclados de proteína con polisacáridos sin actividad superficial, como caseinato sódico con goma xantana<sup>43</sup>, mezclas de  $\beta$ -lactoglobulina con goma xantana<sup>44</sup> y proteína del suero de leche con alginato sódico<sup>21</sup>. En todos los casos, se ha comprobado que la magnitud de las interacciones proteína-polisacárido depende de la proporción entre ambos, observándose que la presencia de goma xantana causa un incremento de la hidrofobicidad superficial.

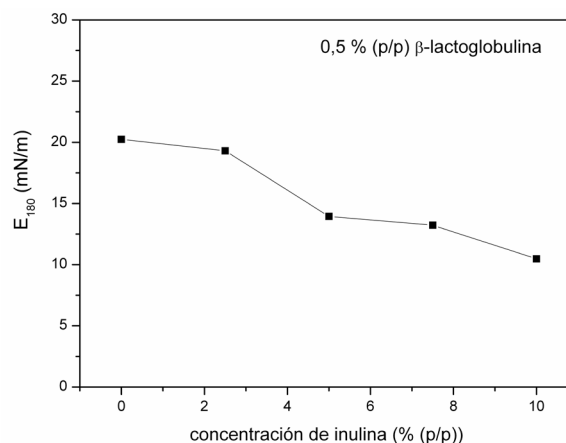
De esta forma, el aumento de la velocidad de difusión observado en presencia de inulina podría estar relacionado con el fenómeno de incompatibilidad termodinámica, anteriormente comentado. Así, el hecho de que la proteína y el polisacárido tiendan a estar presentes en dominios donde ambos se excluyen mutuamente podría conducir a que la proteína presente una mayor tendencia adsorberse. Este hecho queda reflejado no sólo en los valores de presión superficial inicial ( $p_0$ ), sino también en la presión en el "equilibrio" ( $p_{180}$ ): es importante destacar que los mayores efectos, tanto sobre  $p_0$  y  $p_{180}$ , se observan a las menores concentraciones de inulina estudiada (2,5 % y 5 %). Así, mientras el sistema sin inulina tiene un valor de  $p_0$  de  $5,6 \pm 1,5$  mN·m, éste aumenta en presencia de inulina hasta  $14,1 \pm 1,2$  mN·m cuando el contenido en polisacárido es 5 %. De la misma forma, en el caso de  $p_{180}$  se pasa de un valor igual a  $20,2 \pm 0,5$  mN·m en ausencia de inulina hasta  $22,4 \pm 0,5$  mN·m. Al seguir aumentando la cantidad de inulina, dicho efecto se reduce parcialmente, alcanzando  $p_0$  y  $p_{180}$  valores de  $10,0 \pm 1,2$  mN·m y  $20,3$

$\pm 0,6$  mN·m, respectivamente, para una concentración de inulina del 10 %. Estos resultados, podrían explicarse teniendo presente la existencia de dos efectos que son contrapuestos: por un lado, la presencia de inulina aumenta la viscosidad de la fase continua, lo que dificulta la velocidad de adsorción de la proteína hacia la interfase; por otro lado, la presencia de inulina aumenta el efecto de incompatibilidad termodinámica, lo que induce a que la proteína tienda a adsorberse más rápidamente. Por los resultados obtenidos, parece ser que existe una concentración de inulina óptima ( $\beta$ -lactoglobulina (0,5%)-inulina (5%)), ya que a mayores concentraciones, probablemente debido al aumento de la viscosidad, la tendencia a adsorberse la proteína comienza a ser menor que en los otros sistemas estudiados.

Tras la etapa de difusión, se estudian las etapas de penetración y reordenamiento interfacial. De forma general, no se observan grandes cambios en los valores de  $k_p$  en los diferentes sistemas, estando todos los valores en torno a  $2,7 \pm 0,2 \cdot 10^4$ .

### Propiedades reológicas

Resulta interesante llevar a cabo una caracterización reológica de las interfases aceite-agua ya que se puede relacionar con la estabilidad de las emulsiones correspondientes, proporcionando una idea de la naturaleza de las interacciones intermoleculares presentes en la interfase <sup>21</sup>.



**Figura 4.** Evolución del módulo elástico dilatacional a los 180 min ( $E_{180}$ ) para los sistemas mezclados  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %)-inulina, a diferentes concentraciones de inulina (0; 2,5; 5; 7,5 y 10 %) en la interfase O/W.

Así, la Figura 4 muestra los valores del módulo dilatacional en la interfase,  $E$ , en función de la concentración de inulina (2,5; 5; 7,5; 10 %), a un tiempo de adsorción de 180 min a 20 °C. El aumento de la cantidad de inulina resulta en un descenso progresivo de  $E$ , lo que indica una disminución del carácter elástico de la interfase. Esto podría relacionarse con los datos cinéticos discutidos anteriormente, ya que el aumento en la velocidad de adsorción hacia la interfase que tiene lugar en presencia de inulina

conduce a una mayor acumulación de proteína en la misma en un periodo de tiempo relativamente corto. Esta aceleración podría interferir con la formación de una película coherente en la interfase, dando lugar a una disminución en las interacciones entre las moléculas de proteína. De hecho, ya otros autores han informado que altas concentraciones de proteína conducen a mayores velocidades de adsorción y menores módulos elásticos. Procesos de adsorción más lentos facilitan un mayor grado de interacción entre las moléculas adsorbidas, puesto que llegan a disponer de más espacio en la interfase sobre el que desplegarse y formar finalmente una película que, a través de interacciones proteína-proteína podría llegar a originar incluso una gelificación interfacial<sup>21</sup>. Además, todos los valores de  $\tan \theta$  encontrados son bastante inferiores a 1 (en torno a  $0,15 \pm 0,1$ ). Este parámetro informa sobre la viscoelasticidad de la película, estando relacionado con el empaquetamiento y con el grado de interacción de las moléculas que conforman la película interfacial. Por tanto, los sistemas estudiados presentan un comportamiento predominantemente elástico, por lo que se podría pensar en la formación de una película interfacial de proteína tipo “gel”.

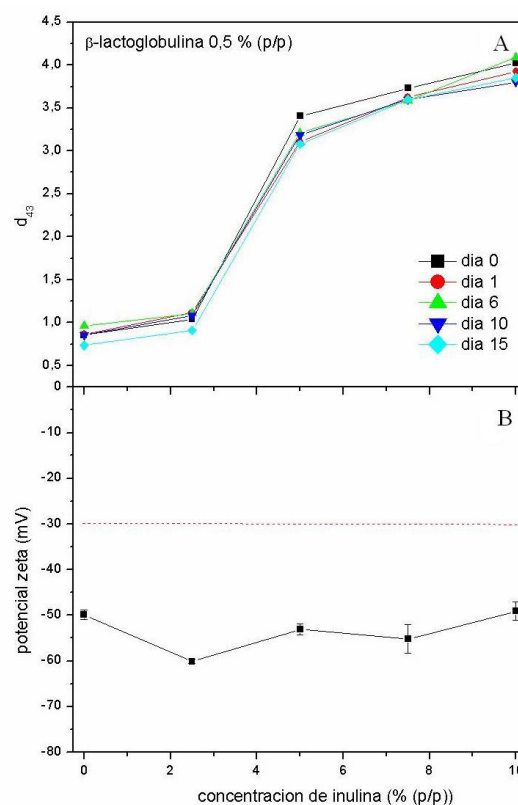
### 3.3. Emulsiones

#### Distribución de tamaño de gotas y potencial zeta

La Figura 5 muestra la evolución del diámetro volumétrico,  $d_{43}$ , (Figura 5A) y del potencial zeta (Figura 5B) con la cantidad de inulina para emulsiones O/W estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %). Se ha elegido el diámetro  $d_{43}$  porque se ha asociado tradicionalmente con modificaciones del tamaño de partícula debidas a procesos de desestabilización, tales como coalescencia o floculación<sup>45</sup>. En la Figura 5A se muestra además la evolución con el tiempo de almacenamiento hasta 15 días después de su preparación, observándose que todas las emulsiones muestran una gran estabilidad frente a la coalescencia. Así, los valores de  $d_{43}$  permanecen bastante estables a lo largo del tiempo, lo que podría relacionarse con los resultados interfaciales comentados anteriormente, ya que las películas poliméricas adsorbidas en la interfase podrían poseer propiedades reológicas adecuadas para estabilizar las dispersiones coloidales<sup>46,47</sup>. Así, la mayor capacidad emulsionante mostrada por la emulsión que contiene 2,5 % de inulina se puede relacionar tanto con la mayor velocidad de adsorción como con el menor descenso del módulo elástico con respecto al resto de sistemas con inulina, comentados anteriormente. Además, la alta estabilidad detectada para las emulsiones que contienen inulina se puede relacionar con el efecto espesante que tiene ésta sobre la fase continua (Figura 2), que dificultaría el movimiento de la fase dispersa, favoreciendo la estabilidad de la emulsión.

Otro factor a considerar en relación a la estabilidad de las emulsiones es la repulsión electrostática existente entre las gotas de aceite. De acuerdo a Karaca et al.<sup>48</sup>, la existencia de una carga electrostática

en la superficie de las partículas puede producir una repulsión entre las mismas lo suficientemente fuerte como para estabilizar la emulsión. De manera general, cargas electrostáticas netas inferiores a 30 mV conducen a la agregación de las gotas, desestabilizando la emulsión<sup>49</sup>. Como se observa en la Figura 5B, todas las emulsiones tienen un potencial zeta superior a 30 mV, lo que confirmaría la participación de factores electrostáticos, además de espesantes, en el proceso de estabilización.

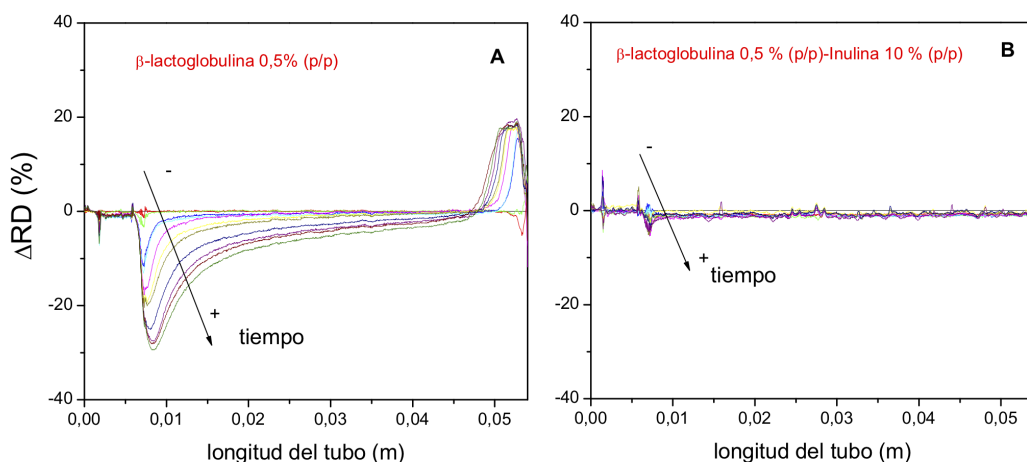


**Figura 5.** Evolución del diámetro volumétrico ( $d_{43}$ ) con el tiempo de almacenamiento (A); y el potencial zeta (B) con la concentración de inulina (0; 2,5; 5; 7,5 y 10 %).

#### Retrodispersión

Para analizar la estabilidad de las emulsiones frente al cremado, la Figura 6 muestra los perfiles diferenciales de la variación de la retrodispersión ( $\Delta RD$ ) a lo largo del tiempo de almacenamiento. Así, se ha estudiado la cinética del cremado para emulsiones estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina, 0,5 %, sin y con 10% de inulina.

Se observa cómo en el sistema en el que no se ha introducido inulina aparece el fenómeno de cremado, debido a las diferencias entre las densidades de la fase continua y la fase dispersa<sup>3</sup>. Así, al inicio del ensayo, la retrodispersión es bastante constante a lo largo de toda la altura de la celda que contiene la muestra. Conforme pasa el tiempo, las gotas de aceite ascienden debido al efecto de la gravedad, lo que hace que descienda la señal de retrodispersión en la parte baja de la celda. De manera inversa, un aumento en la retrodispersión es detectado en la parte superior debido a un aumento en la concen-

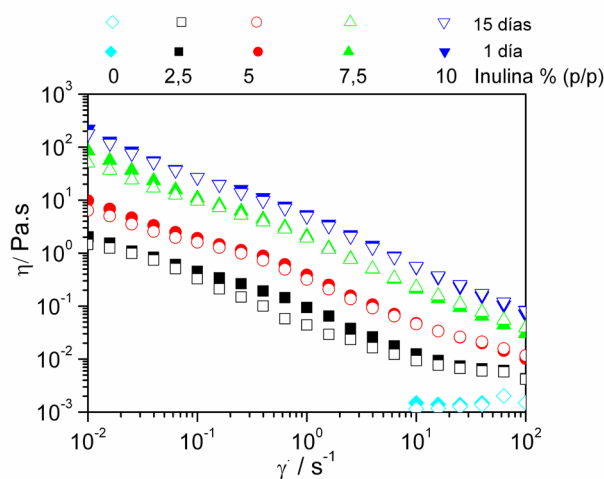


**Figura 6.** Evolución de los perfiles de retrodispersión (DRD%) en función de la altura de la celda con el tiempo de almacenamiento (hasta 15 días) de la emulsión estabilizada con  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) (A); y de la emulsión estabilizada con  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) e inulina (10 %) (B). Las flechas indican el tiempo de almacenamiento.

tración de gotas. En la parte intermedia de la celda no se observa ninguna evolución con el tiempo de almacenamiento, lo que indica la ausencia de floculación o coalescencia. Estos resultados concuerdan con los mostrados para el diámetro volumétrico (Figura 5A).

En el caso de la emulsión que contiene un 10 % de inulina, no se observa ningún cambio con el tiempo para el perfil de retrodispersión, con lo que no parece detectarse cremado, floculación o coalescencia.

### Propiedades reológicas



**Figura 7.** Curvas de flujo para emulsiones estabilizadas por  $\beta$ -lactoglobulina (0,5 %) y diferentes concentraciones de inulina (0; 2,5; 5; 7,5 y 10 %) el mismo día de su preparación (día 0) y tras 15 días de almacenamiento (día 15).

La Figura 7 muestra las curvas de flujo para todas las emulsiones estudiadas en el momento de prepararse y 15 días después. Se observa un aumento de la viscosidad conforme aumenta el contenido en inulina, como ya ocurría en las fases continuas. Además,

todas las muestras, independientemente del contenido de polisacárido, muestran un comportamiento pseudoplástico, al descender la viscosidad conforme aumenta la velocidad de deformación. Hay que destacar el hecho de que las curvas de flujo permanecen prácticamente invariables tras los 15 días de almacenamiento, lo que corrobora la ya comentada estabilidad de las emulsiones estudiadas.

### CONCLUSIONES

Emulsiones O/W que contienen  $\beta$ -lactoglobulina ven modificadas sus propiedades físico-químicas en presencia de inulina. El efecto producido por el polisacárido se ve afectado tanto por las posibles interacciones proteína-polisacárido como por el efecto espesante de la inulina en la fase acuosa. La mayor importancia de un factor sobre el otro depende del contenido de inulina.

Los ensayos dilatacionales muestran cómo la presencia de inulina acelera la difusión de la proteína hacia la interfase, resultando en una disminución de su elasticidad. Esto podría ser el resultado de una ausencia de interacciones electrostáticas entre el polisacárido y la proteína, tal y como parecen indicar las medidas del potencial zeta de las fases continuas. La aceleración en la difusión de la proteína en presencia de inulina parece sugerir una incompatibilidad termodinámica entre ambos biopolímeros.

El efecto espesante de la inulina origina un aumento en la consistencia de los sistemas conforme aumenta el contenido en ésta de 0 a 10 %, mostrando generalmente un comportamiento pseudoplástico. Ese espesamiento ayuda a inhibir los procesos de desestabilización como la floculación o la coalescencia, tal y como permite observar la evolución de los diámetros de gota o los perfiles de retrodispersión con el tiempo. No obstante, sí aparece un proceso de cremado en ausencia de inulina.



Además del efecto espesante, los altos valores encontrados para el potencial zeta de las emulsiones (> 30 mV) sugieren la participación de procesos de estabilización electrostáticos en la justificación de la estabilidad de estos sistemas.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la adsorción de la proteína se ve favorecida a bajas concentraciones de inulina (2,5; 5 %), debido a la sugerida incompatibilidad termodinámica. Este efecto parece amortiguarse a mayores contenidos de inulina (7,5; 10 %) que hacen que predomine el efecto espesante del polisacárido. La emulsión que contiene un 2,5 % de inulina muestra una presión interfacial en equilibrio ligeramente mayor que el resto, así como tamaños de gota más parecidos a los del sistema que no tiene inulina.

A raíz de los presentes resultados, cabe subrayar la importancia de la inclusión de polisacáridos como la inulina que, además de poseer probadas propiedades prebióticas, ejercen un papel estabilizador en emulsiones alimentarias.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda recibida por la Universidad de Sevilla a través del III Plan Propio de Docencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sandrou, D. K.; Arvanityannis, I. S. Low-Fat/Calorie Foods: Current State and Perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, 40 (5), 427–447 DOI: 10.1080/10408690091189211.
- Warrand, J. Healthy polysaccharides the next chapter in food products. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (3), 355–370.
- McClements, D. J. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*; CRC Press, USA: Boca Raton, **2015**.
- Tcholakova, S.; Denkov, N. D.; Ivanov, I. B.; Campbell, B. Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 123–126, 259–293 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.021>.
- Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* **2003**, 17 (1), 25–39 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00120-5).
- Paraskevopoulou, A.; Boskou, D.; Kiosseoglou, V. Stabilization of olive oil – lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chem.* **2005**, 90 (4), 627–634 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.023>.
- Franck, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, 87 (S2), S287–S291 DOI: DOI: 10.1079/BJN/2002550.
- Cooper, P. D.; Carter, M. The anti-melanoma activity of inulin in mice. *Mol. Immunol.* **1986**, 23 (8), 903–908 DOI: [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(86\)90076-3](https://doi.org/10.1016/0161-5890(86)90076-3).
- Korbelik, M.; Cooper, P. D. Potentiation of photodynamic therapy of cancer by complement: the effect of  $\gamma$ -inulin. *Br. J. Cancer* **2007**, 96 (1), 67–72 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603508.
- Cooper, P. D.; Steele, E. J. The adjuvanticity of gamma inulin. *Immunol. Cell Biol.* **1988**, 66, 345.
- Cooper, P. D.; Steele, E. J. Algammulin, a new vaccine adjuvant comprising gamma inulin particles containing alum: preparation and in vitro properties. *Vaccine* **1991**, 9 (5), 351–357 DOI: [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90063-C](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90063-C).
- Silva, D. G.; Cooper, P. D.; Petrovsky, N. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunol. Cell Biol.* **2004**, 82, 611.
- Kolida, S.; Tuohy, K.; Gibson, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, 87 (S2), S193–S197 DOI: DOI: 10.1079/BJN/2002537.
- Roberfroid, M. B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, 87 (S2), S139–S143 DOI: DOI: 10.1079/BJN/2002529.
- V.B.Tolstoguzov. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.* **1991**, 4 (6), 429–468 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80196-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80196-3).
- Norton, I. T.; Frith, W. J. Phase separation in mixed biopolymer systems. In *Food Colloids, Biopolymers and Materials*; Dickinson, E., van Vliet, T., Eds.; The Royal Society of Chemistry, **2003**; pp 282–297.
- Schaller-Povolny, L. A.; Smith, D. E. Interaction of milk proteins with inulin. *Milchwissenschaft* **2002**, 57 (9–10), 494–497.
- An introduction to rheology*; Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Amsterdam, **1991**; Vol. 25.
- Xu, J.-L.; Zhang, J.-C.; Liu, Y.; Sun, H.-J.; Wang, J.-H. Rheological properties of a polysaccharide from floral mushrooms cultivated in Huangshan Mountain. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 139, 43–49 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.011>.
- Abu-Jdayil, B.; Shaker, R. R.; Jumah, R. Y. Rheological behavior of concentrated yogurt (Labneh). *Int. J. Food Prop.* **2000**, 3 (2), 207–216 DOI: 10.1080/10942910009524628.
- Perez, A. A.; Carrara, C. R.; Sánchez, C. C.; Santiago, L. G.; Rodríguez Patino, J. M. Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23 (5), 1253–1262 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.013>.
- Baeza, R.; Carrera Sanchez, C.; Pilosof, A. M. R.; Rodríguez Patino, J. M. Interactions of polysaccharides with  $\beta$ -lactoglobulin adsorbed

- films at the air–water interface. *Food Hydrocoll.* **2005**, 19 (2), 239–248 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.002>.
23. Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R.; Sánchez, C. C. Adsorption of Whey Protein Isolate at the Oil–Water Interface as a Function of Processing Conditions: A Rheokinetic Study. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (6), 2241–2248 DOI: 10.1021/jf981119i.
  24. Puppo, M. C.; Speroni, F.; Chapleau, N.; de Lamballerie, M.; Añón, M. C.; Anton, M. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocoll.* **2005**, 19 (2), 289–296 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.07.001>.
  25. Mengual, O.; Meunier, G.; Cayré, I.; Puech, K.; Snabre, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta* **1999**, 50 (2), 445–456 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0).
  26. McClements, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24 (6), 621–625 DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2006.07.003.
  27. de Kruif, C. ; Tuinier, R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocoll.* **2001**, 15 (4–6), 555–563 DOI: 10.1016/S0268-005X(01)00076-5.
  28. Tolstoguzov, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocoll.* **2003**, 17 (1), 1–23 DOI: 10.1016/S0268-005X(01)00111-4.
  29. Engelhardt, K.; Lexis, M.; Gochev, G.; Konnerth, C.; Miller, R.; Willenbacher, N.; Peukert, W.; Braunschweig, B. pH Effects on the Molecular Structure of  $\beta$ -Lactoglobulin Modified Air–Water Interfaces and Its Impact on Foam Rheology. *Langmuir* **2013**, 29 (37), 11646–11655 DOI: 10.1021/la402729g.
  30. Mensink, M. A.; Frijlink, H. W.; van der Voort Maarschalk, K.; Hinrichs, W. L. J. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 130, 405–419 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>.
  31. Camino, N. A.; Sanchez, C. C.; Rodríguez Patino, J. M.; Pilosof, A. M. R. Hydroxypropylmethylcellulose– $\beta$ -lactoglobulin mixtures at the oil–water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocoll.* **2012**, 27 (2), 464–474 DOI: 10.1016/J.FOODHYD.2011.09.006.
  32. Santipanichwong, R.; Suphantharika, M.; Weiss, J.; McClements, D. J. Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatured beta-lactoglobulin aggregates. *J. Food Sci.* **2008**, 73 (6), N23–30.
  33. Gu, Y. S.; Decker, A. E.; McClements, D. J. Production and Characterization of Oil-in-Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Multilayer Membranes Consisting of  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\iota$ -Carrageenan and Gelatin. *Langmuir* **2005**, 21 (13), 5752–5760 DOI: 10.1021/la046888c.
  34. Robinson, R. K. The potential of inulin as a functional ingredient. *Br. Food J.* **1995**, 97 (4), 30–32 DOI: 10.1108/00070709510085657.
  35. Syrbe, A.; Bauer, W. J.; Klostermeyer, H. Polymer Science Concepts in Dairy Systems—an Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *Int. Dairy J.* **1998**, 8 (3), 179–193 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00041-7).
  36. Fernandez-Garcia, E.; McGregor, J. U.; Traylor, S. The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. *J. Dairy Sci.* **1998**, 81 (3), 655–663.
  37. De Vuyst, L.; Degeest, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, 23 (2), 153–177 DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x.
  38. Dickinson, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23 (6), 1473–1482 DOI: 10.1016/J.FOODHYD.2008.08.005.
  39. Ward, A. F. H.; Tordai, L. Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *J. Chem. Phys.* **1946**, 14 (7), 453–461 DOI: 10.1063/1.1724167.
  40. (Xu, S.; Damodaran, S. Kinetics of Adsorption of Proteins at the Air-Water Interface From a Binary Mixture. *Langmuir* **1994**, 10 (2), 472–480 DOI: 10.1021/la00014a022.
  41. MacRitchie, F. 8 - Physical Processes at Interfaces BT - Chemistry At Interfaces; Academic Press: San Diego, **1990**; pp 156–185.
  42. (Graham, D. E.; Phillips, M. C. Proteins at liquid interfaces: III. Molecular structures of adsorbed films. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, 70 (3), 427–439 DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90050-X).
  43. Liu, L.; Zhao, Q.; Liu, T.; Zhao, M. Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate/xanthan gum mixtures at the oil–water interface. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25 (5), 921–927 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.023>.
  44. Perez, A. A.; Sánchez, C. C.; Patino, J. M. R.; Rubiolo, A. C.; Santiago, L. G. Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air–water interface: A rheokinetic study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, 81 (1), 50–57 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.021>.
  45. Relkin, P.; Sourdet, S. Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll.* **2005**, 19 (3), 503–511 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.015>.
  46. Dickinson, E. *An introduction to food colloids*; Oxford : Oxford university press, **1992**.

47. Murray, B. S. Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2002**, 7 (5), 426–431 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00077-8).
48. Karaca, A. C.; Low, N.; Nickerson, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (9), 2742–2750 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
49. Silva, H. D.; Cerqueira, M. Â.; Vicente, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, 5 (3), 854–867 DOI: [10.1007/s11947-011-0683-7](https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7).