

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΕΛΛΑΔΑΣ



**ΔΙΕΘΝΕΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ**

www.iyu.edu.gr | Θεσσαλονίκη

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ ΑΠΟ ΛΕΥΚΑ
ΦΑΣΟΛΙΑ: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**

Παρασκευή Λέντζη

Επιβλέπων Καθηγητής: Χρήστος Ριτζούλης

Θεσσαλονίκη 2023

**ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ ΑΠΟ ΛΕΥΚΑ ΦΑΣΟΛΙΑ:
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**

**EMULSIFIERS FROM WHITE BEANS: EXTRACTION AND
CHARACTERIZATION**

ABSTRACT

In this particular paper, the emulsifying capacity of aqueous extracts from white beans is studied and the relationships between the composition and structure of the macromolecular components of the extracts and their exerted emulsification ability are reported. The extracts are composed of three different populations: large polysaccharides (few MDa), proteins (tens of kDa) and smaller molecular entities (oligopeptides and oligosaccharides, polyphenols and salts, among other molecules). Proteins and smaller molecules adsorb onto oil-water interfaces, providing some emulsification capacity at pH 3 and sufficient emulsification at pH 7. Non-adsorbing polysaccharides, such as starch, cause depletion flocculation. In addition, Pickering phenomena are involved in the stabilization mechanism. SEC-MALLS/UV, confocal microscopy, zeta potential measurements and FT-IR data were used to obtain the results. Finally, there is a discussion of the particular characteristics of each population in emulsion stability, their relevance to culinary practice, and their potential as substitutes for artificial emulsifiers.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετάται η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των υδατικών εκχυλισμάτων από λευκά φασόλια και αναφέρονται οι σχέσεις μεταξύ της σύνθεσης και της δομής των μακρομοριακών συστατικών των εκχυλισμάτων και της ικανότητας γαλακτωματοποίησης τους. Τα εκχυλίσματα αποτελούνται από τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς: από μεγάλους πολυσακχαρίτες (λίγους MDa), από πρωτεΐνες (δεκάδες kDa) και από μικρότερες μοριακές οντότητες (ολιγοπεπτίδια και ολιγοσακχαρίτες, πολυφαινόλες και άλατα, μεταξύ άλλων μορίων). Παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες και τα μικρότερα μόρια προσροφούνται σε διεπιφάνειες λαδιού-νερού, παρέχοντας κάποια ικανότητα γαλακτωματοποίησης σε pH 3 και επαρκή γαλακτωματοποίηση σε pH 7. Οι πολυσακχαρίτες που δεν προσροφούνται, όπως για παράδειγμα το άμυλο, προκαλούν κροκίδωση εξάντλησης. Επιπλέον, φαινόμενα Pickering εμπλέκονται στο μηχανισμό σταθεροποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν SEC-MALLS/UV, συνεστιακή μικροσκοπία, μετρήσεις δυναμικού ζήτα και δεδομένα FT-IR για την απόκτηση των αποτελεσμάτων. Τέλος, γίνεται συζήτηση σχετικά με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε πληθυσμού στη σταθερότητα του γαλακτώματος, στη συνάφειά τους με τη μαγειρική πρακτική και στη δυνατότητά τους ως υποκατάστατα τεχνητών γαλακτωματοποιητών.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1. Γαλακτώματα	1
1.2. Γαλακτωματοποιητές	4
1.3. Όσπρια – Λευκά φασόλια	6
2. Υλικά και μέθοδοι	8
2.1. Εκχύλιση	8
2.2. Παρασκευή γαλακτώματος	8
2.3. Μετρήσεις δυναμικού ζήτη	9
2.4. Μέγεθος σωματιδίων.....	9
2.5. Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).....	9
2.6. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (CLSM)	10
2.7. Διεπιφανειακές μετρήσεις	10
2.8. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους	10
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	12
4. Συμπεράσματα	23
Βιβλιογραφία	24

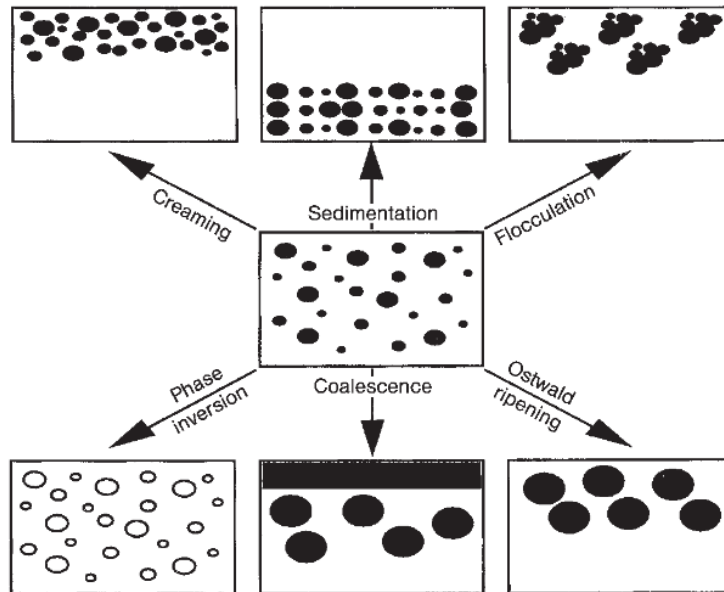
1. Εισαγωγή

1.1. Γαλακτώματα

Σύμφωνα με τον Tharwat F.Tadros, τα γαλακτώματα είναι μια κατηγορία συστημάτων διασποράς που αποτελούνται από δύο μη αναμίξιμα υγρά (Tadros & Vincent, 1983, Binks, 1998, Tadros, 2005). Τα υγρά σταγονίδια (φάση διασποράς) διασκορπίζονται σε ένα υγρό μέσο (συνεχής φάση). Μπορούν να διακριθούν διάφορες κατηγορίες γαλακτώματος, συγκεκριμένα λάδι σε νερό (O/W), νερό σε λάδι (W/O) και λάδι σε λάδι (O/O). Η τελευταία κατηγορία μπορεί να παραδειγματιστεί από ένα γαλάκτωμα που αποτελείται από ένα πολικό έλαιο (π.χ. προπυλενογλυκόλη) διασπαρμένο σε ένα μη πολικό έλαιο (παραφινέλαιο) και αντίστροφα. Για να διασκορπιστούν δύο μη αναμίξιμα υγρά απαιτείται ένα τρίτο συστατικό, δηλαδή ο γαλακτωματοποιητής. η επιλογή του γαλακτωματοποιητή είναι κρίσιμη όχι μόνο για τον σχηματισμό του γαλακτώματος αλλά και για τη μακροπρόθεσμη σταθερότητά του (Tadros & Vincent, 1983, Binks, 1998, Tadros, 2005). Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη φύση του γαλακτωματοποιητή ή τη δομή του συστήματος. Κατά την αποθήκευση ενδέχεται να προκύψουν διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με τη διάσπαση των γαλακτωμάτων, ανάλογα με:

- Την κατανομή μεγέθους σωματιδίων και τη διαφορά πυκνότητας μεταξύ των σταγονιδίων και του μέσου.
- Το μέγεθος των ελκτικών έναντι των απωστικών δυνάμεων, που καθορίζει την κροκίδωση.
- Τη διαλυτότητα των διασκορπισμένων σταγονιδίων και την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, η οποία με τη σειρά της καθορίζει την ωρίμανση του Ostwald.
- Η σταθερότητα του υγρού φιλμ μεταξύ των σταγονιδίων, η οποία καθορίζει τη συνένωση
- Αναστροφή φάσης.

Οι διάφορες διαδικασίες κατανομής απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 1. Τα φυσικά φαινόμενα που εμπλέκονται σε κάθε διαδικασία διάσπασης δεν είναι απλά και απαιτούν ανάλυση των διαφόρων επιφανειακών δυνάμεων που εμπλέκονται.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων διαδικασιών διάσπασης σε γαλακτώματα. (Tadros, 2009)

Οι διαδικασίες διάσπασης είναι η δημιουργία κρέμας, η καθίζηση, η κροκίδωση, η ωρίμανση του Ostwald, η συνένωση και η αντιστροφή φάσης.

Κρέμα και καθίζηση

Αυτή η διαδικασία προκύπτει από εξωτερικές δυνάμεις, συνήθως βαρυτικές ή φυγόκεντρες. Όταν τέτοιες δυνάμεις υπερβαίνουν τη θερμική κίνηση των σταγονιδίων (κίνηση Brown), δημιουργείται μια κλίση συγκέντρωσης στο σύστημα έτσι ώστε τα μεγαλύτερα σταγονίδια κινούνται πιο γρήγορα είτε προς την κορυφή (αν η πυκνότητά τους είναι μικρότερη από αυτή του μέσου) είτε προς το κάτω (αν η πυκνότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτή του μέσου) του δοχείου. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα σταγονίδια μπορεί να σχηματίσουν μια κλειστή (τυχαία ή διατεταγμένη) διάταξη στην κορυφή ή στο κάτω μέρος του συστήματος, με τον υπόλοιπο όγκο να καταλαμβάνεται από τη συνεχή υγρή φάση.

Κροκίδωση

Αυτή η διαδικασία αναφέρεται στη συσσώρευση των σταγονιδίων (χωρίς καμία αλλαγή στο μέγεθος των πρωτογενών σταγονιδίων) σε μεγαλύτερες μονάδες. Είναι το αποτέλεσμα των ελκτικών δυνάμεων των van der Waals που είναι καθολικά με όλα τα συστήματα διασποράς. Η κροκίδωση συμβαίνει όταν δεν υπάρχει επαρκής απόθεση για να κρατήσει τα σταγονίδια μακριά σε αποστάσεις όπου η έλξη van der Waals είναι

ασθενής. Η κροκίδωση μπορεί να είναι είτε «ισχυρή» ή «αδύναμη», ανάλογα με το μέγεθος της ελκτικής ενέργειας που εμπλέκεται.

Ostwald Ripening (Ωρίμανση του Ostwald)

Αυτή η επίδραση προκύπτει από την πεπερασμένη διαλυτότητα (κ.λπ.) των υγρών φάσεων. Τα υγρά που αναφέρονται ως "μη αναμίξιμα" έχουν συχνά αμοιβαίες διαλυτότητες που δεν είναι αμελητέα. Με τα γαλακτώματα που είναι συνήθως πολυδιασπαρμένα, τα μικρότερα σταγονίδια θα έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα σταγονίδια (λόγω φαινομένων καμπυλότητας). Με τον καιρό, τα μικρότερα σταγονίδια εξαφανίζονται και τα μόριά τους διαχέονται στο μεγαλύτερο μέρος και εναποτίθενται στα μεγαλύτερα σταγονίδια. Με τον καιρό, η κατανομή μεγέθους σταγονιδίων μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές.

Συνένωση

Αυτό αναφέρεται στη διαδικασία λέπτυνσης και διάσπασης του υγρού φιλμ μεταξύ των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα να συμβαίνει σύντηξη δύο ή περισσότερων σταγονιδίων για να σχηματιστούν μεγαλύτερα σταγονίδια. Η περιοριστική περίπτωση για τη συνένωση είναι ο πλήρης διαχωρισμός του γαλακτώματος σε δύο διακριτές υγρές φάσεις. Η κινητήρια δύναμη για τη συνένωση είναι οι διακυμάνσεις της επιφάνειας ή του φιλμ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια στενή προσέγγιση των σταγονιδίων, όπου οι δυνάμεις van der Waals είναι ισχυρές και εμποδίζουν τον διαχωρισμό τους.

Αναστροφή Φάσης

Αυτό αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία θα υπάρξει ανταλλαγή μεταξύ της φάσης διασποράς και του μέσου. Για παράδειγμα, ένα γαλάκτωμα O/W μπορεί με το χρόνο ή την αλλαγή των συνθηκών να αναστραφεί σε ένα γαλάκτωμα W/O. Σε πολλές περιπτώσεις, η αναστροφή φάσης διέρχεται από μια μεταβατική κατάσταση όπου παράγονται πολλαπλά γαλακτώματα.

1.2. Γαλακτωματοποιητές

Ο σχηματισμός σταθερών γαλακτωμάτων τυπικά απαιτεί τη χρήση γαλακτωματοποιητών ή επιφανειοδραστικών. Οι γαλακτωματοποιητές είναι μόρια που έχουν τόσο υδρόφοβα όσο και υδρόφιλα μέρη. Αυτά τα μόρια μπορούν να προσροφηθούν στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μη αναμίξιμων υγρών, μειώνοντας την επιφανειακή τάση και σταθεροποιώντας το γαλάκτωμα αποτρέποντας τη συνένωση σταγονιδίων.

Η χημεία πίσω από τους γαλακτωματοποιητές περιλαμβάνει την ύπαρξη υδρόφιλων και λιπόφιλων ιδιοτήτων. Αυτή η μοναδική διπλή φύση επιτρέπει στους γαλακτωματοποιητές να σχηματίζουν μια σταθερή διεπαφή μεταξύ των φάσεων λαδιού και νερού, μειώνοντας την επιφανειακή τάση και εμποδίζοντας τον διαχωρισμό των υγρών. Με απλά λόγια, οι γαλακτωματοποιητές λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ του λαδιού και του νερού, επιτρέποντάς τους να αναμειχθούν ομοιόμορφα.

Οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τύπους:

1. Γαλακτωματοποιητές επιφανειοδραστικών: Οι γαλακτωματοποιητές με βάση τα επιφανειοδραστικά έχουν και υδρόφιλες και υδρόφοβες ιδιότητες. Λειτουργούν σχηματίζοντας ένα στρώμα γύρω από σταγονίδια λαδιού, επιτρέποντάς τους να διασκορπίζονται ομοιόμορφα στο νερό. Οι συνήθεις επιφανειοδραστικοί γαλακτωματοποιητές περιλαμβάνουν:

- Λεκιθίνη: Η λεκιθίνη είναι ένας φυσικός γαλακτωματοποιητής που βρίσκεται στους κρόκους των αυγών και τη σόγια. Χρησιμοποιείται ευρέως σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα.
- Πολυσορβικά: Τα πολυσορβικά, όπως το Polysorbate 80, είναι συνθετικοί γαλακτωματοποιητές που προέρχονται από σορβιτόλη και λιπαρά οξέα. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα.
- Στεαροϋλολακτυλικό νάτριο (SSL): Το SSL είναι ένας γαλακτωματοποιητής ποιότητας τροφίμων που παράγεται από την αντίδραση γαλακτικού οξέος και στεατικού οξέος. Χρησιμοποιείται σε προϊόντα αρτοποιίας, γαλακτοκομικά προϊόντα και άλλα επεξεργασμένα τρόφιμα.

- Span και Tween: Το Span και το Tween είναι σειρές εστέρων λιπαρών οξέων σορβιτάνης και γαλακτωματοποιητές με βάση πολυσορβικό, αντίστοιχα. Χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας.
2. Φυσικοί γαλακτωματοποιητές: Οι φυσικοί γαλακτωματοποιητές προέρχονται από φυσικές πηγές και προτιμώνται από καταναλωτές που αναζητούν πιο φυσικές εναλλακτικές λύσεις. Μερικά παραδείγματα περιλαμβάνουν:
- Αραβικό κόμμι: Το αραβικό κόμμι, γνωστό και ως κόμμι ακακίας, είναι ένα φυσικό κόμμι που λαμβάνεται από το δέντρο της Ακακίας της Σενεγάλης. Χρησιμοποιείται συνήθως στη βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητής, σταθεροποιητής και παχυντικός παράγοντας.
 - Κόμμι ξανθάνης: Το κόμμι ξανθάνης είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από τη ζύμωση σακχάρων από το βακτήριο *Xanthomonas campestris*. Χρησιμοποιείται ευρέως ως παχυντικός και σταθεροποιητικός παράγοντας σε τρόφιμα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας.
 - Κερί μέλισσας: Το κερί μέλισσας είναι ένα φυσικό κερί που παράγεται από τις μέλισσες. Χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής και παχυντικός παράγοντας σε διάφορα καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής περιποίησης.
 - Λεκιθίνη σόγιας: Η λεκιθίνη σόγιας είναι υποπροϊόν της εκχύλισης σογιέλαιου. Χρησιμοποιείται συνήθως ως γαλακτωματοποιητής σε προϊόντα διατροφής και χρησιμοποιείται επίσης σε φαρμακευτικές και καλλυντικές συνθέσεις.

Οι γαλακτωματοποιητές παίζουν καθοριστικό ρόλο σε πολλά προϊόντα, επιτρέποντας τη δημιουργία σταθερών και οπτικά ελκυστικών συνθέσεων που διαφορετικά θα διαχωρίζονταν ή θα είχαν ανομοιόμορφη υφή.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες γαλακτωματοποιητές από φυσικές πηγές μπορούν να ληφθούν από στερεά απόβλητα επεξεργασίας σταφυλιών αλλά και από την ελιά και των υποπροϊόντων του καρπού της. Πιο συγκεκριμένα, γαλακτωματοποιητές από τα στερεά απόβλητα επεξεργασίας σταφυλιών παράγουν γαλακτώματα λαδιού – νερού με σταγονίδια μεγέθους αρκετών δεκάδων έως εκατό νανόμετρων. Το pH αυτών των γαλακτωμάτων μπορεί να είναι είτε ουδέτερο (pH 7)

είτε όξινο (pH 3). Παρά το σημαντικό μέγεθός τους, αυτά τα σταγονίδια είναι αξιoσημείωτα σταθερά με την πάροδο του χρόνου (Pavlou et al., 2015).

Οι γαλακτωματοποιητές προερχόμενοι από τα κομποστοποιημένα απόβλητα επεξεργασίας της ελιάς και των υποπροϊόντων του καρπού της είναι αποτελεσματικοί και κατάλληλοι για γαλακτώματα ουδέτερου pH. Στην έρευνα που έγινε από τα εκχύλισματα που δημιουργήθηκαν σε pH 5, 7 και 9, δείχνουν όλα σημαντική διεπιφανειακή δραστηριότητα λαδιού-νερού, με το εκχύλισμα σε pH 7 να δείχνει την υψηλότερη διεπιφανειακή δραστηριότητα n-δεκαεξανίου-νερού. Αυτοί οι γαλακτωματοποιητές προσφέρουν καλύτερη προστασία από τη συνένωση σε σύγκριση με τους γαλακτωματοποιητές που απομονώνονται από μη κομποστοποιημένα απόβλητα ελιάς, κάτι που μπορεί να αποδοθεί στη διάσπαση των αρχικών μακρομορίων σε μικρότερους πληθυσμούς, οι οποίοι μπορούν να προσφέρουν καλύτερη διεπιφανειακή κάλυψη και επακόλουθη προστασία από τη συνένωση (Koliastasi et al., 2020).

1.3. Όσπρια – Λευκά φασόλια

Τα όσπρια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου γιατί είναι πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, υδατανθράκων και διαιτητικών ινών. Οι πρωτεΐνες συμβάλλουν στην παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας προϊόντων διατροφής, κυρίως μέσω της σύνθεσης και της σταθεροποίησης γαλακτωμάτων. Έτσι, για την πιθανή ενσωμάτωση πρωτεϊνών από όσπρια σε προϊόντα διατροφής θα πρέπει να μελετηθούν οι γαλακτωματοποιητικές τους ιδιότητες. Τα φασόλια είναι ένα από τα πιο γνωστά και καταναλώσιμα όσπρια παγκοσμίως. Περιέχουν 20 - 30% σε ξηρό βάρος, με ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων (Augustin & Klein, 1992, Deshpande & Cheryan, 1983). Κατέχουν σημαντική θέση στην ανθρώπινη διατροφή ως κύρια πηγή πρωτεΐνης, συνεισφέροντας περίπου το 5% της παρεχόμενης ενέργειας κατά κεφαλήν παγκοσμίως (FAO, 2012).

Αρκετές πρωτεΐνες φασολιών, έχουν εξαιρετικές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες (υψηλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης και καλό σταθεροποιητικό αποτέλεσμα) και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την παρασκευή γαλακτωμάτων τροφίμων. Η ικανότητα μιας πρωτεΐνης να βοηθά στην παρασκευή ενός

γαλακτώματος εξαρτάται από τα μοριακά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης όπως το μέγεθος, η διαλυτότητα, η υδροφοβικότητα της επιφάνειας και η δομική ευκαμψία, καθώς αυτά τα χαρακτηριστικά καθορίζουν τις ιδιότητες προσρόφησης πρωτεΐνης. Οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες των πρωτεϊνών των φασολιών εξαρτώνται επίσης από περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως το pH.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των λευκών φασολιών υπάρχουν ευρέως στις διατροφικές συνήθειες πολλών πολιτισμών σε περιοχές της Νότιας Ευρώπης, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής και έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηκτικά μέσα και (σε μεγάλο βαθμό εν αγνοία τους) ως γαλακτωματοποιητές. Αυτή η ικανότητα γαλακτωματοποίησης έχει τονιστεί σε πρόσφατες μελέτες (Gundogan & Can Karaca, 2020, Abdel-Haleem, 2022). Ωστόσο, σύμφωνα με την καλύτερη κατανόηση των παρόντων συγγραφέων, δεν υπάρχει συστηματική μελέτη με βάση τη γαλακτωματοποιητική δράση των γαλακτωματοποιητών αυτών των κύριων καλλιεργειών, δηλαδή τη συσχέτιση των χαρακτηριστικών μακρομοριακής σύνθεσης των εκχυλισμάτων με τις διεπιφανειακές τους ιδιότητες, και ως εκ τούτου με την ικανότητα γαλακτωματοποίησης συγκεκριμένων πληθυσμών εκχυλίσματος και τη σταθερότητα γαλακτώματος τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος αυτής της εργασίας είναι

- i. να ληφθούν εκχυλίσματα με δυνατότητα γαλακτωματοποίησης από λευκά φασόλια,
- ii. να προσδιορίσει τις κύριες ομάδες συστατικών στα εκχυλίσματα,
- iii. να αξιολογήσει την ικανότητα γαλακτωματοποίησης των εκχυλισμάτων σε σχέση με το pH, προσομοιώνοντας την εφαρμογή τους σε ουδέτερα και όξινα προϊόντα και
- iv. να αποδώσει τις όποιες ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και σταθεροποίησης γαλακτώματος σε συγκεκριμένες ομάδες συστατικών των εκχυλισμάτων.

2. Υλικά και μέθοδοι

Τα φασόλια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία προέρχονται από την τοπική αγορά και όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τη Sigma Aldrich (St Louis, MO, ΗΠΑ).

2.1. Εκχύλιση

Αρχικά τα φασόλια επεξεργάστηκαν με blender οικιακής χρήσης και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν με μύλο Pulverisette (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Γερμανία). 150g από το στερεό αναμείχθηκαν με 500 ml απιονισμένου νερού και αναδεύτηκαν για 30 λεπτά στους 60-80 °C. Το υπερκείμενο υγρό του εκχυλίσματος που δημιουργήθηκε διαχωρίστηκε και αποθηκεύτηκε και το υπόλοιπο υπόλειμμα (στερεό) εκχυλίστηκε ξανά στις ίδιες συνθήκες (30 λεπτά στους 60-80 °C) με 500 ml νερό. Το υπερκείμενο υγρό, όπως και προηγουμένως, διαχωρίστηκε, αναμείχθηκε με αυτό που είχε αποθηκευτεί, καταψύχθηκε και λυοφιλοποιήθηκε στους -80 °C. Τέλος, το ληφθέν εκχύλισμα φασολιών αποθηκεύτηκε και αεροστεγές δοχείο.

2.2. Παρασκευή γαλακτώματος

Παρασκευάστηκαν γαλακτώματα με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φασολιού διαλυμένα σε ρυθμιστικά διαλύματα ρυθμισμένα σε pH 3 και 7 (10m κιτρικό και τρις αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, έγιναν σε συγκεντρώσεις από 0.1% έως 2%, συνολικού διαλύματος, διαλυμένα και στα δύο ρυθμιστικά διαλύματα. Στα διαλύματα προστέθηκε μιγλυόλη, η οποία ενεργεί ως ελαιώδης φάση με σκοπό να επιτευχθεί κλάσμα όγκου ελαίου $\phi=0,2$. Η μιγλυόλη στο συνολικό διάλυμα αποτελούσε το 20%. Αυτά, αρχικά αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για να παρασκευαστεί ένα προ-μίγμα γαλακτώματος. Στη συνέχεια, το κάθε ένα υποβλήθηκε σε υπερήχους χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή υπερήχων Hielscher UP-100H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) για 60 δευτερόλεπτα έως 25 λεπτά αναλόγως τη διαλυμένη συγκέντρωση του εκχυλίσματος φασολιού.

2.3. Μετρήσεις δυναμικού ζήτα

Για τη μέτρηση του δυναμικού ζήτα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY, ΗΠΑ). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν στους 25° C, με δείκτη διάθλασης 1.33 και μέσο ιξώδες 0.89 mPa s. Τα δείγματα αραιώθηκαν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα πριν από τη μέτρηση ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις της πολλαπλής σκέδασης.

2.4. Μέγεθος σωματιδίων

Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των σταγονιδίων ελαίου/κροκίδων σταγονιδίων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μια συσκευή Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instrument, Malvern, Worcestershire, UK), με το δείγμα να τροφοδοτείται στη συσκευή μέτρησης από έναν δειγματολήπτη υγρού Hydro MU (Malvern Instrument, Malvern, Worcestershire, UK). Ο δείκτης διάθλασης συνεχούς φάσης ορίστηκε στο 1.33, ενώ ο δείκτης διάθλασης διεσπαρμένης φάσης ορίστηκε στο 1.42. Η τιμή απορρόφησης 0.1 χρησιμοποιήθηκε για τα σωματίδια. Ο υπολογισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων από τα δεδομένα γωνιακής σκέδασης έγινε με βάση τις εξισώσεις Mie. Τα δείγματα αραιώθηκαν ώστε να επιτευχθεί συσκότιση μεταξύ 7% και 10%, χρησιμοποιώντας κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα πριν από τη μέτρηση, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις της πολλαπλής σκέδασης.

2.5. Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Τα εκχυλίσματα φασολιών αναλύθηκαν με φασματόμετρο FT-IR 6700 (JASCO, Essex, UK). Μια μικρή ποσότητα του δείγματος τοποθετήθηκε στην επιφάνεια ενός αντικειμένου Attenuated Total Reflectance (ATR) MIRacle™-Universal ATR (Pike Technologies, Madison, WI, USA) εξοπλισμένο με κρυστάλλινη πλάκα 3-Reflection Diamond/ZnSe Performance. Τα Φάσματα ελήφθησαν εις τριπλούν σε ένα εύρος από 4000 έως 400 cm⁻¹ σε λειτουργία μετάδοσης. Αποκτήθηκαν συνολικά 64 σαρώσεις με ανάλυση 4 cm⁻¹ για κάθε φάσμα σε φόντο στεγνής και καθαρής κυψέλης. Τα φάσματα διορθώθηκαν για επιδράσεις CO₂, H₂O και ATR (με αυτή τη σειρά) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Spectra Manager (V.2.15.01, JASCO, Essex, UK). Αυτά στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε εξομάλυνση Savitsky–Golay και διορθώσεις βασικής γραμμής με το ίδιο λογισμικό.

2.6. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (CLSM)

Ανεστραμμένο συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, CZ Microscopy GmbH, Jena, Germany) χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των μικρογραφιών. Σε κάθε γαλακτώμα που μελετήθηκε προστέθηκε 0.1 w/v Nile Red με ήπια ανάδευση. Τέλος, τα γαλακτώματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία στη συνέχεια καλύφθηκε με καλυπτρίδα πριν από την εξέταση.

2.7. Διεπιφανειακές μετρήσεις

Οι μετρήσεις δυναμικής διεπιφανειακής τάσης λαδιού-νερού πραγματοποιήθηκαν με τασίμετρο κρεμάμενης σταγόνας (CAM 200, KSV, Biolin Scientific, Στοκχόλμη, Σουηδία). Στη συνέχεια, 1 g L^{-1} των εκχυλισμάτων διαλύθηκαν σε 5 mL υπερκαθαρού νερού, όπως ελήφθη από μια συσκευή Ultraclear Ro DI 30 (Envoqua Lab, Pittsburgh, PA, USA). Αυτά στη συνέχεια διηθήθηκαν με φίλτρο σύριγγας $1 \mu\text{m}$ ή $0,2 \mu\text{m}$. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ένα λογισμικό ανάλυσης σχήματος σταγόνας (Attension Theta Software, V. 4.1.9.8, Biolin Scientific, Στοκχόλμη, Σουηδία). Οι καμπύλες προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Young–Laplace.

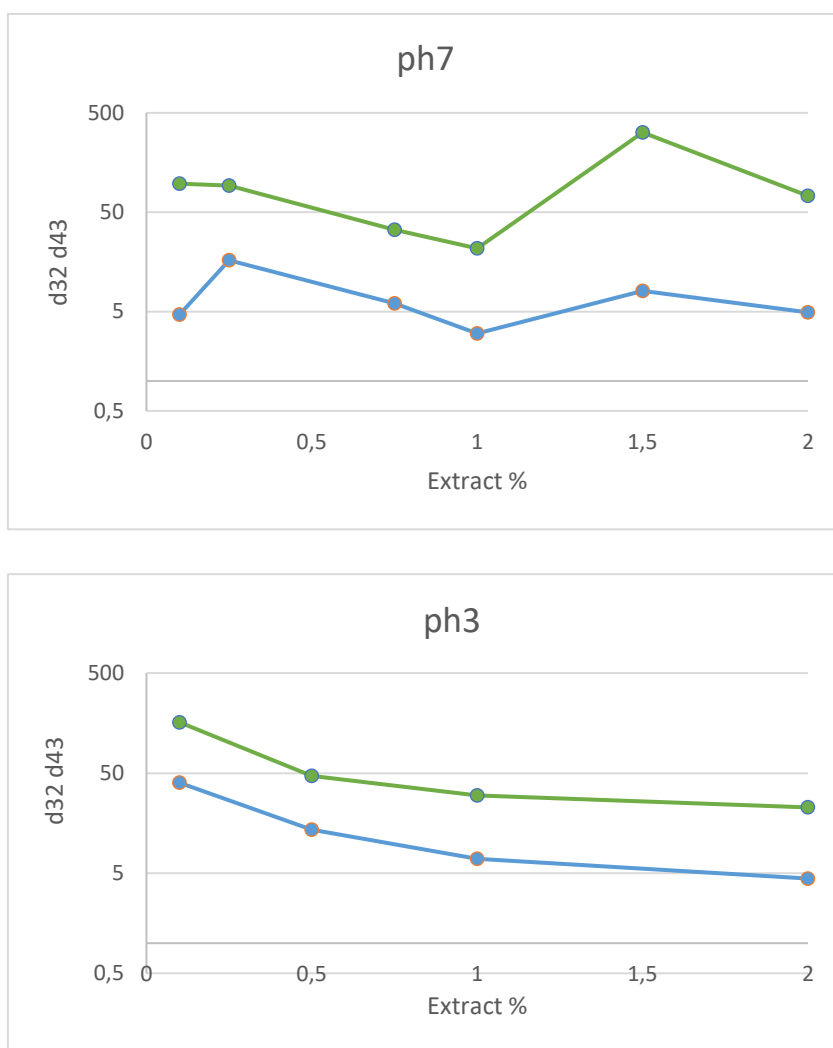
2.8. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Ο χρωματογράφος αποκλεισμού μεγέθους (SEC) αποτελούνταν από τα ακόλουθα στοιχεία, σε σειρά: έναν απαερωτή SpectraSystem SCM 1000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA), αντλία Shimadzu LC-20AR (Shimadzu Corporation, Τόκιο, Ιαπωνία); frit $2 \mu\text{m}$ (Idex, Oak Harbor, WA, ΗΠΑ), μια προστατευτική στήλη GPC/SEC PL-Aquagel-OH $50 * 7,5$ ($8 \mu\text{m}$) (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA), δύο διαδοχικές αναλυτικές στήλες GPC/SEC PL-Aquagel-OH $300 * 7,5 \text{ mm}$ (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA), έναν φούρνο στήλης Model 605 (Scientific Systems Incorporated, State College, PA, USA) που λειτουργεί σε θερμοκρασία $30 \text{ }^\circ\text{C}$, έναν ανιχνευτή UV (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα) και έναν ανιχνευτή σκέδασης φωτός λέιζερ πολλαπλών γωνιών BI-MwA (MALLS) (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY, ΗΠΑ). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης χρωματογραφίας/σκέδασης (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ). Κάθε εκτέλεση περιλάμβανε

την έγχυση του δείγματος χρησιμοποιώντας βρόχο 200 μL με ρυθμό ροής υγρού έκλουσης (υπερκαθαρό νερό) $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

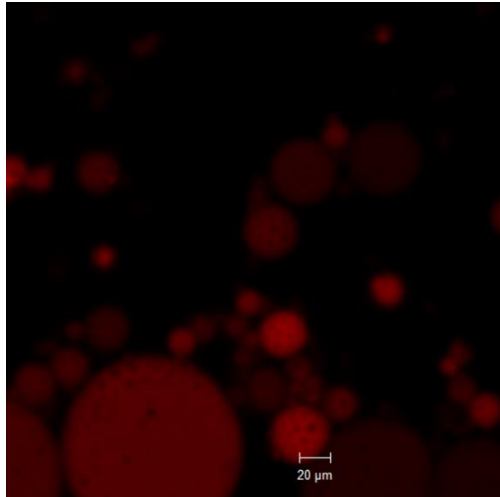
Τα εκχυλίσματα των φασολιών που δημιουργήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές σε γαλακτώματα λάδι-σε-νερό, ρυθμισμένα σε pH 3 (προσομοίωση όξινων τροφίμων) και pH 7 (προσομοίωση ουδέτερων τροφίμων).



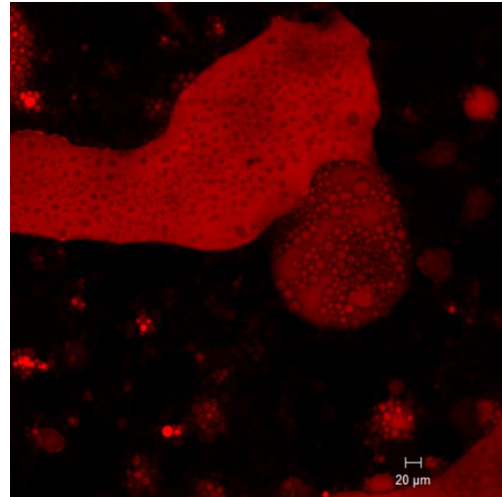
Σχήμα 1. Οι μέσες διάμετροι d32 (πράσινο χρώμα) και d43 (μπλε χρώμα) γαλακτωμάτων σταθεροποιημένες με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων φασολιών σε pH 7 (πάνω) και σε pH 3 (κάτω).

Στο Σχήμα 1β φαίνεται η εξάρτηση των μετρούμενων d32 και d43 με την αυξανόμενη συγκέντρωση εκχυλισμάτων φασολιών. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων

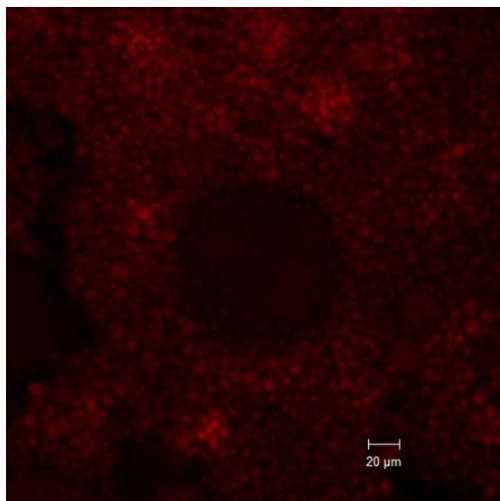
φασολιών 1% w/v και άνω επιτρέπουν τη μείωση των μετρούμενων μεγεθών σωματιδίων κάτω από 10 μm , με το 2% να οδηγεί σε σωματίδια $d_{32} = 5 \mu\text{m}$.



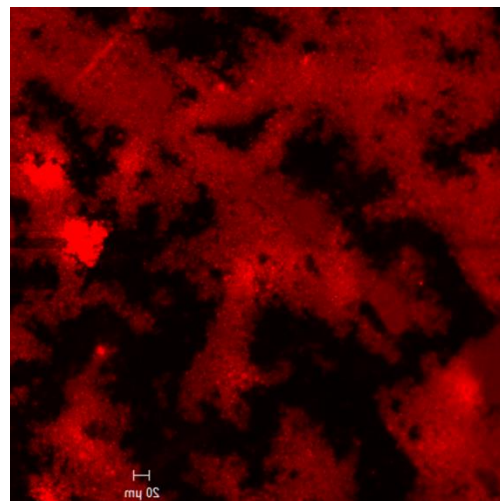
pH 7, 0.25 g dL



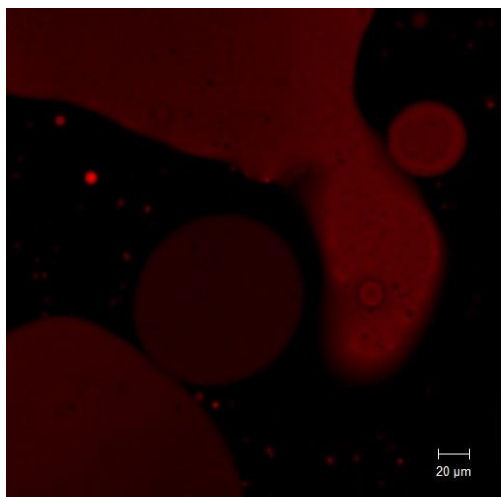
pH 7, 0.75 g dL



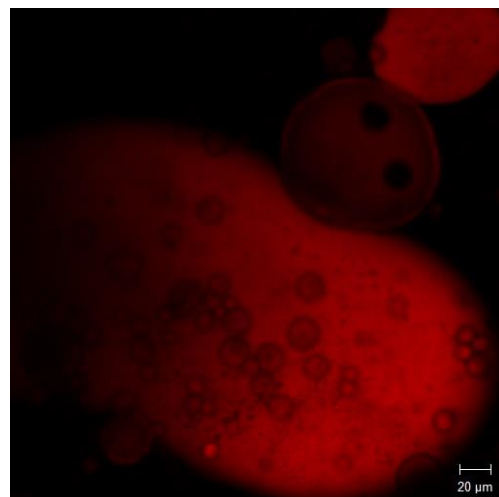
pH 7, 1 g dL



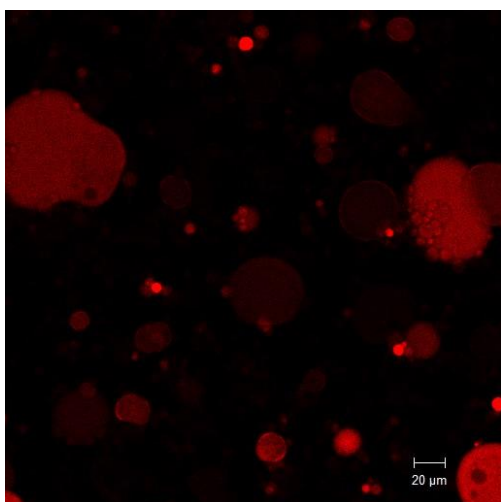
pH 7, 1.5 g dL



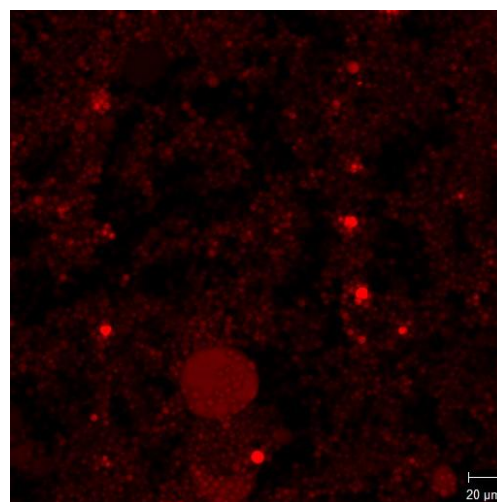
pH 3, 0.1 g dL



pH 3, 0.5 g dL



pH 3, 1 g dL

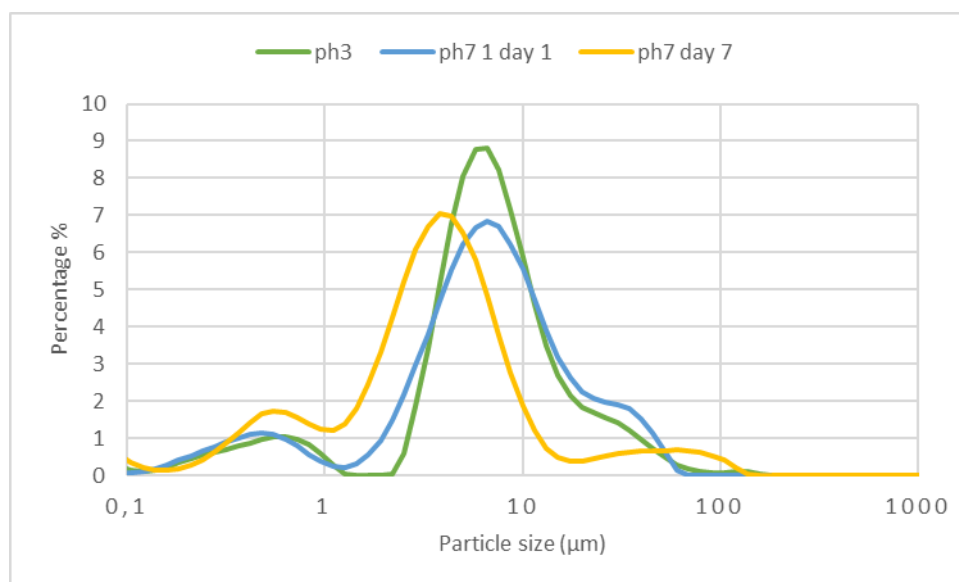


pH 3, 2 g dL

Σχήμα 2. Συνεστιακές μικρογραφίες γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με χρήση εκχυλίσματος φασολιών σε pH 7 και σε pH 3. Χρησιμοποιήθηκε Nile red για να κηλιδωθεί η ελαιώδης φάση (απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα).

Στην εξέταση των συνεστιακών μικρογραφιών των γαλακτωμάτων (Σχήμα 2) φαίνεται πως το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων φασολιών συγκεντρώσεων 0,5-0,75%, δεν είναι επαρκές για να επιτρέψει το σχηματισμό πολύ μικρών σταγονιδίων. Το συγκεκριμένο παρατηρήθηκε επίσης, από τη μακροσκοπική εικόνα του γαλακτώματος και από τα δεδομένα σκέδασης φωτός. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη συμπλεγμάτων νερού σε λάδι (μαύρες/υδατικές σφαίρες σε κόκκινα μεγάλα σταγονίδια ερυθρού/ελαίου διαχωρισμένα με φάση), υποδηλώνοντας ύπαρξη συστατικών χαμηλού HLB

(ισορροπία υδρόφιλου-λιπόφιλου) στα εκχυλίσματα φασολιών. Δεν υπάρχει γνώση για κάποιο άλλο φυσικό εκχύλισμα που έχει τη δυνατότητα να σταθεροποιεί αποτελεσματικά τα γαλακτώματα νερό σε λάδι. Αυτό το χαρακτηριστικό του εκχυλίσματος από φασόλια θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω στο εγγύς μέλλον, καθώς δείχνει υπόσχεση για την ανάπτυξη «πράσινων» γαλακτωματοποιητών χαμηλής περιεκτικότητας σε HLB, μια συνεχή ανάγκη της βιομηχανίας σοκολάτας και καρυκευμάτων, μεταξύ άλλων ενδιαφερομένων. Ωστόσο, δεν θα συζητηθεί περαιτέρω εδώ, καθώς θα αποσπάσει την εστίαση από τους καθορισμένους στόχους αυτής της εργασίας. Μια περαιτέρω αύξηση του εκχυλίσματος οδηγεί σε μικρότερα σταγονίδια, ενώ μια ενδιαφέρουσα τάση είναι η προσκόλληση μικρότερων σταγονιδίων με τη μεσολάβηση γαλακτωματοποιητή γύρω από τα μεγαλύτερα. Αυτό είναι στην πραγματικότητα κροκίδωση μεταξύ σταγονιδίων διαφορετικών μεγεθών και φέρνει στο μυαλό τα πρόσφατα ευρήματα του Ye και των συναδέλφων του σχετικά με τη σταθεροποίηση των μικρών σταγονιδίων λαδιού Pickering στα μεγαλύτερα (Okubanjo S.S. et al., 2019 & Cheng, L. et al., 2019). Δεδομένης της δυνατότητας των σταθεροποιημένων με σταγονίδια γαλακτωμάτων να καθυστερούν την *in vitro* πέψη του ελαίου (Cheng L. et al., 2022) αυτό αναδεικνύει μια άλλη πιθανή λειτουργικότητα των εκχυλισμάτων φασολιών, τα οποία φαίνεται να παράγουν εύκολα τέτοια γαλακτώματα.



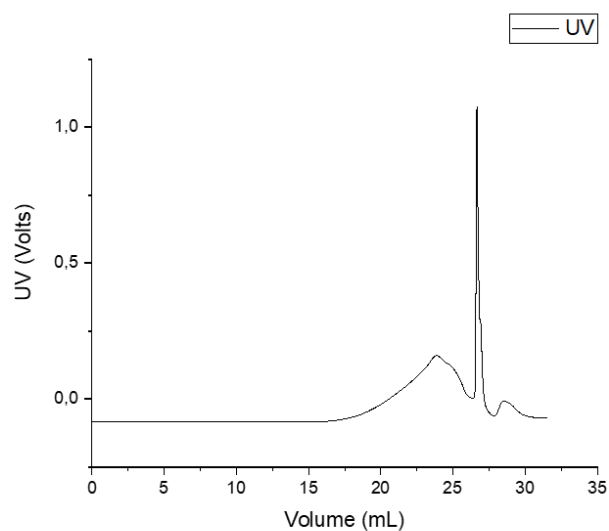
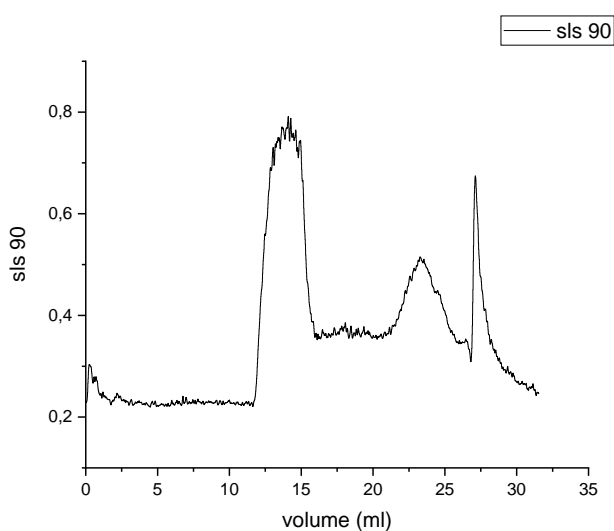
Σχήμα 3. Κατανομές μεγέθους σωματιδίων για γαλακτώματα παρασκευασμένα με 1% εκχύλισμα φασολιών σε pH 7 (μπλε) και σε pH 3 (πράσινο). Η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων σε pH 7, 7 ημέρες μετά την παρασκευή εμφανίζεται επίσης με κίτρινο χρώμα.

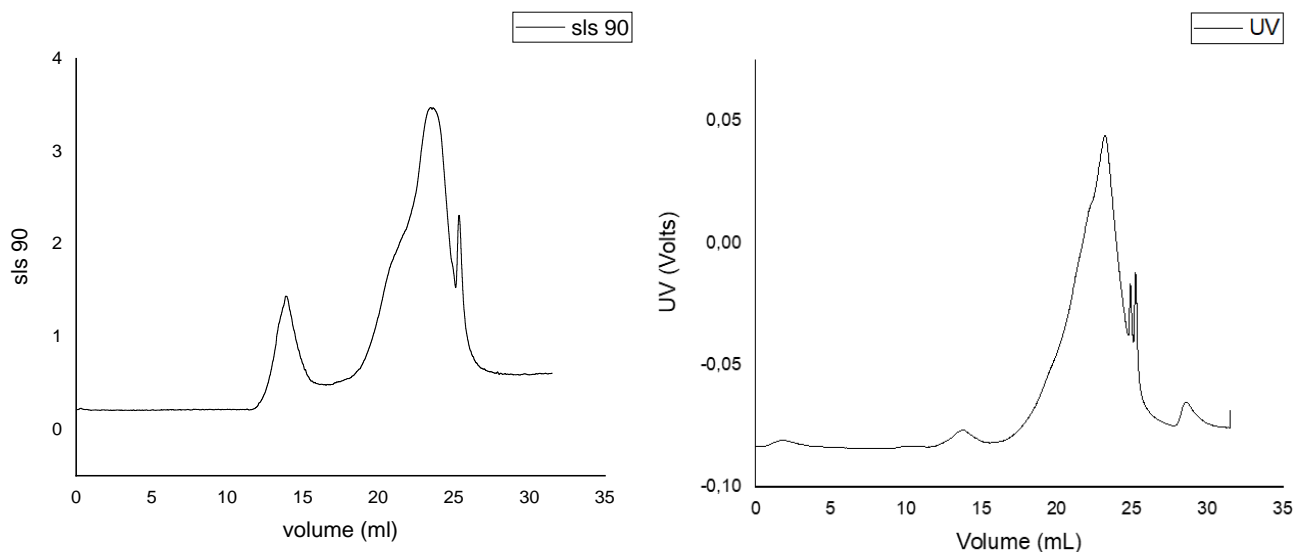
Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται η τυπική κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτώματος παρασκευασμένο με 1% εκχυλίσμα φασολιών. Δείχνει επιπλέον τυπική κατανομή μεγέθους σωματιδίων γαλακτώματος που μετρήθηκε ύστερα από 7 μέρες (συντηρημένο με αζίδιο του νατρίου 0,1%). Αν και σχηματίζονται ορισμένα συσσωματώματα, τα οποία φαίνονται ως κορυφές άνω των 100 μm, οι κύριοι πληθυσμοί παραμένουν σταθεροί στα 10 μm περίπου. Μια δεύτερη κορυφή στα 100 μm περίπου την ημέρα 7 υποδεικνύει κροκίδωση σε pH 7.

Η διάλυση του εκχυλίσματος φασολιών και η γαλακτωματοποίηση σε pH 7 παράγει αρκετά σταθερά γαλακτώματα, ιδιαίτερα πάνω από 1% εκχυλίσματος. Αυτά είναι σταθερά για αρκετές ημέρες, παρά τα σχετικά μεγάλα σωματίδια που παράγονται. Από αυτή την άποψη, θυμίζουν γαλακτώματα που παράγονται με απόβλητα επεξεργασίας ελιάς (Filotheou A. et al. 2015). Το ζ δυναμικό τέτοιων γαλακτωμάτων είναι κοντά στο μηδέν. Αυτό θα πρέπει να σχετίζεται με την παρουσία μη φορτισμένων μακρομορίων, πιθανώς αμύλου, στη διεπιφάνεια, επιπλέον των πρωτεϊνών ή οποιασδήποτε άλλης αμφιφιλικής οντότητας. Τα καλυμμένα με σταγονίδια (δυνητικά σταθεροποιημένα με σταγονίδια) γαλακτώματα που παρατηρούνται σε pH 3, παρατηρούνται επίσης σε pH 7, με χαρακτηριστικά παραδείγματα που παρουσιάζονται για 0,75% v/v εκχυλίσματος φασολιών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, η προσκόλληση μεταξύ των σταγονιδίων οδηγεί στον σχηματισμό κροκιδωμένων γαλακτωμάτων. Αυτό παρακολουθείται ως αύξηση στο d₄₃ στα αποτελέσματα σκέδασης φωτός μεταξύ 1% και 1,5% εκχυλίσματος φασολιών (Σχήματα 1β και 3), τα οποία θα πρέπει να αποδοθούν στις κροκίδες που παρατηρούνται στο Σχήμα 2. Η κάλυψη μεγαλύτερων σταγονιδίων από μικρότερα στο 0,75%, η ίδια μια μορφή κροκίδωσης, δεν πρέπει να αποδοθεί σε εκκένωση αυτής, καθώς δεν υπάρχει περίσσεια μη απορροφηθέντος υλικού σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Η εκκένωση, ωστόσο, δεν θα πρέπει να αποκλείεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φασολιών. Η αραίωση του δείγματος εκχυλίσματος 2% με ρυθμιστικό διάλυμα ρυθμισμένο σε pH 7 οδηγεί στη μείωση της κροκίδωσης, ενώ τα σταγονίδια που καλύπτονται από σταγονίδια εξακολουθούν να υπάρχουν. Αυτό υποδηλώνει ότι συνυπάρχουν δύο τρόποι κροκίδωσης: μια συσσώρευση σταγονιδίων λόγω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υλικών που έχουν προσροφηθεί με σταγονίδια (σταγονίδια που καλύπτονται από σταγονίδια) και μια κροκίδωση εξάντλησης που προκαλείται από

περίσσεια μη απορροφημένων συστατικών του εκχυλίσματος φασολιών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Για να ληφθεί υπόψη η κροκίδωση υπό εκκένωση, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μέρος των εκχυλισμάτων φασολιών είναι άμυλο, αν και, όπως φαίνεται στο SEC, δεν είναι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος. Το άμυλο φαίνεται να δρά ως επιδραστικός γαλακτωματοποιητής Pickering, ειδικά μετά από κατάλληλες φυσικοχημικές τροποποιήσεις (Guida C. et al. 2021), αλλά γενικά θεωρείται ότι είναι διαεπιφανειακά αδρανές. Η παρουσία του στη χύδην φάση, ως μη απορροφημένο συστατικό του εκχυλίσματος φασολιών, αναμένεται εύλογα να προκαλέσει κροκίδωση υπό εκκένωση όπως οι περισσότεροι μη απορροφημένοι πολυσακχαρίτες (φάση όγκου).





Σχήμα 4. Χρωματογραφήματα αποκλεισμού μεγέθους των εκχυλισμάτων φασολιών σε pH 7, που δείχνουν δεδομένα από έναν ανιχνευτή στατικής σκέδασης φωτός (SLS) (γωνιακή ένταση στις 90°) και έναν ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους (UV) (απορρόφηση στα 280 nm). Τα άνω χρωματογραφήματα αντιστοιχούν σε διάλυμα 2% του εκχυλίσματος και τα κάτω στο υλικό που εκροφήθηκε από την επεξεργασία SDS της κρέμας ενός σταθεροποιημένου με γαλακτώματος εκχυλίσματος φασολιού λάδι σε νερό σε pH 7

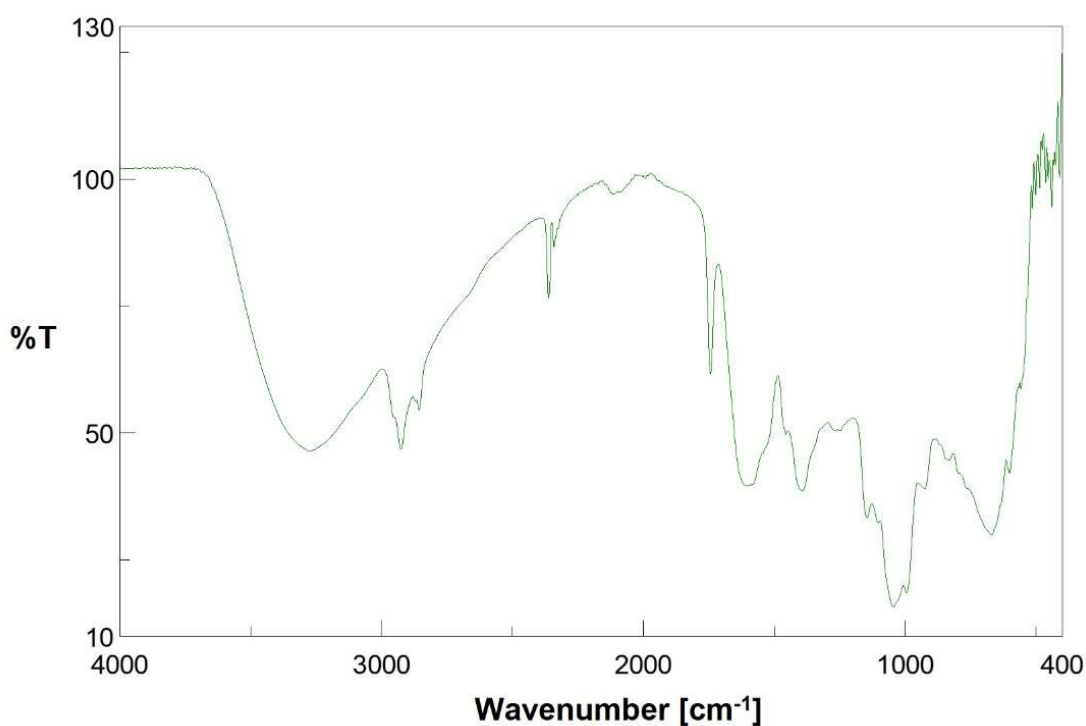
Το Σχήμα 4 (πάνω) δείχνει δεδομένα χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που λαμβάνονται από εκχύλιση φασολιών (BE) σε pH 7. Παρατηρούνται δύο χρωματογραφήματα, το ένα συλλέγεται σε γωνία σκέδασης 90°, χρησιμοποιώντας ανιχνευτή στατικής σκέδασης φωτός (SLS) και ένα δεύτερο που απεικονίζει την απορρόφηση της αύξησης του εκλούτη στα 280 nm. Τρεις κύριες κορυφές έκλουσης: Η πρώτη εκλούεται σε 15 λεπτά, χρόνο που αντιστοιχεί επίσης στην έκλυση δεξτρανών 2 MDa. Αν και η άμεση σύγκριση των χρόνων έκλυσης μεταξύ διαφορετικών μακρομορίων θα πρέπει να αποφεύγεται (Gaborieau M. & Castignolles P., 2011), είναι ασφαλές να αποδοθεί αυτή η κορυφή σε πολυσακχαριδικές αυτοσυναρμολογήσεις (θα πρέπει να έχουμε κατά νου ότι το άμυλο είναι συστατικό των υδατικών εκχυλισμάτων φασολιών). Μια δεύτερη κορυφή εμφανίζεται σε χρόνους έκλυσης που αντιστοιχεί σε δεξτράνες περίπου δεκάδων kDa (μεταξύ 20 και 25 mL). Αυτό μπορεί εύκολα να αποδοθεί στις πρωτεΐνες, κάτι που επαληθεύεται από την απορρόφηση στα 280 nm λόγω των αρωματικών αμινοξέων των εκχυλισμένων πρωτεϊνών. Μια τρίτη κορυφή εκλούεται μεταξύ 25 και 30 mL είναι το σύστημα και

θα πρέπει να αποδοθεί σε ολιγοσακχαρίτες και ολιγοπεπτίδια, μαζί με άλλα μικρότερα μόρια («αιχμή συστήματος» στην ορολογία SEC). Τα παραπάνω είναι μια περιγραφή των μακρομοριακών πληθυσμών του εκχυλίσματος φασολιών. Ένας πληθυσμός πολύ μεγάλων πολυσακχαριδικών οντοτήτων, ένας από πολύ μικρότερες πρωτεΐνες και ένας αριθμός μικρότερων μορίων που εκλούνται από τη μήτρα των φασολιών.

Η προσθήκη του ανιονικού τασιενεργού θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) οδηγεί σε μετατόπιση των πρωτεϊνών από τη διεπιφάνεια σταγονιδίων ελαίου (Dickinson & Ritzoulis, 2000). Για το σκοπό αυτό, ένα σταθεροποιημένο γαλάκτωμα εκχυλίσματος φασολιών σε pH 7 φυγοκεντρήθηκε ήπια για να διαχωριστεί η στιβάδα κρέμας και διασκορπίστηκε σε ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 1% SDS. Το γαλάκτωμα στη συνέχεια αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε. Ο ορός, που εκείνη τη στιγμή περιείχε τους μακρομοριακούς πληθυσμούς που είχαν προσροφηθεί διεπιφανειακά πριν από την εφαρμογή SDS, συλλέχθηκε και μετρήθηκε σε SEC, δίνοντας τα χρωματογραφήματα που φαίνονται στο Σχήμα 4 (κάτω). Αν και οι κλίμακες μεταξύ του Σχήματος 4 (πάνω) και του Σχήματος 4 (κάτω) είναι διαφορετικές, είναι σαφές ότι η σύνθεση του επιφανειακού στρώματος (που φαίνεται στο Σχήμα 4 (κάτω)) είναι εντελώς διαφορετική από τη συνολική σύνθεση του εκχυλίσματος (που φαίνεται στο Σχήμα 3 (πάνω)). Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες (24 mL) είναι κυρίαρχη στη διεπιφάνεια, ενώ η κορυφή πολυσακχαρίτη (15 mL) υπάρχει, αλλά ασθενώς. Αυτό υποδηλώνει ότι είτε ένα μεγάλο μέρος του πολυσακχαρίτη παραμένει μη απορροφημένο, είτε ότι ο εκροφημένος πολυσακχαρίτης άνοιξε τη διαμόρφωσή του και δεν διασκορπίζει πλέον το φως (όπως, δηλαδή, οι β-γλυκάνες). Προκειμένου να ελεγχθεί το τελευταίο σενάριο, συλλέχθηκαν διαγράμματα SEC από τον ορό ενός γαλακτώματος εκχυλίσματος φασολιών πριν από την προσθήκη SDS. Ο πολυσακχαρίτης βρέθηκε πράγματι στη χύδην φάση, επομένως μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι ένα μεγάλο μέρος του παραμένει μη απορροφημένο. Η παρουσία μη απορροφημένων πολυσακχαριτών στη φάση του όγκου μπορεί εύκολα να εξηγήσει την κροκίδωση εξάντλησης που προτάθηκε ως ο λόγος για τη συσσωμάτωση σταγονιδίων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων.

Οι πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο δεν είναι αμφίφιλοι και γενικά δεν θεωρούνται καλοί γαλακτωματοποιητές. Ωστόσο, πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση των γαλακτωματοποιητών Pickering με βάση το άμυλο (Li, 2013, Lu, 2018, Zhu, 2019] υποστηρίζουν την παρατήρηση ότι ένα μέρος του πολυσακχαρίτη παρέμεινε

προσροφημένο στη διεπιφάνεια (και, πιθανώς, δεν εκροφήθηκε με SDS). Έτσι, με βάση τη μικρή αλλά υπάρχουσα κορυφή SLS στα 15 mL (Σχήμα (4 κάτω)), μπορεί κανείς να ισχυριστεί με βεβαιότητα ότι η διεπαφή ελαίου-νερού των σταθεροποιημένων γαλακτωμάτων εκχυλίσματος φασολιών περιέχει επίσης άμυλο και/ή άλλους πολυσακχαρίτες φασολιών, μαζί με πρωτεΐνη. Η συμμετοχή μη φορτισμένων πολυσακχαριτών στη διεπιφάνεια μπορεί να εξηγήσει τη σχετική σταθερότητα των σταθεροποιημένων γαλακτωμάτων εκχυλίσματος φασολιών σε pH 3 που συζητήθηκε προηγουμένως. Ενώ οι πρωτεΐνες κάτω από τα ισοηλεκτρικά τους σημεία συνήθως οδηγούν σε εκτεταμένη κροκίδωση, οι πολυσακχαριδικοί γαλακτωματοποιητές είναι αποτελεσματικοί σε χαμηλό pH (Alba, 2013).

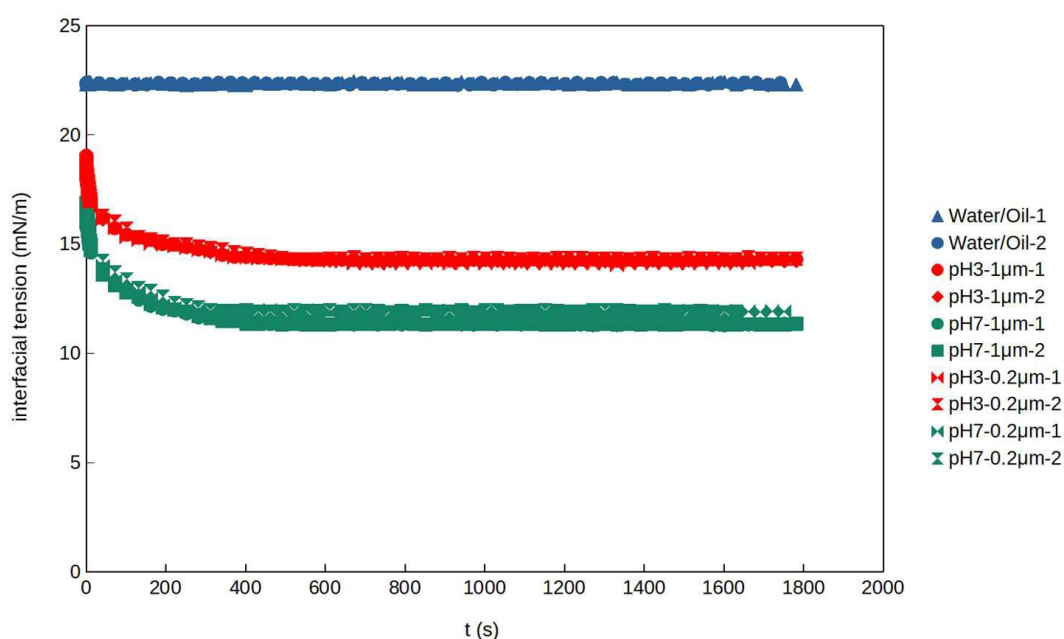


Σχήμα 5. Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος φασολιών

Τα δεδομένα που λήφθηκαν από το SEC για τη σύνθεση του εκχυλίσματος μπορούν να επικυρωθούν με μετρήσεις FT-IR. Το Σχήμα 5 δείχνει ένα τυπικό φάσμα FT-IR ενός εκχυλίσματος φασολιού. Σε αυτό, μπορεί κανείς να διακρίνει μεγάλες κορυφές πολυσακχαρίτη στα 1030 cm^{-1} (Kacurakova & Ebringerova, 2000), και κορυφές πρωτεΐνης που αντιστοιχούν στις περιοχές αμιδίου I και αμιδίου II (1500 έως 1650 cm^{-1}) (Ferreira, 2014). Οι κορυφές μεταξύ 2850 και 3000 cm^{-1} οφείλονται σε δεσμούς C–H,

ομάδες $-\text{CH}_2$ και $-\text{CH}_3$, ενώ η ευρεία κορυφή μεταξύ 3000 και 3500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε διάταση $\text{O}-\text{H}$ (Sun, 2005). Τα παραπάνω συμφωνούν με τη συνύπαρξη πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και των παραπροϊόντων τους (σάκχαρα, πεπτίδια) ως κύρια συστατικά στο υπό μελέτη εκχύλισμα.

Η απορρόφηση πρωτεϊνών και μικρότερων μορίων, όπως τα πεπτίδια κορυφής του συστήματος, τείνει να μειώνει τη διεπιφανειακή τάση ελαίου-νερού, ενώ η σταθεροποίηση Pickering δεν σχετίζεται συνήθως με σημαντικές αλλαγές στη διεπιφανειακή τάση, αξίζει να παρατηρηθεί η εξαρτώμενη από το χρόνο διεπιφανειακή τάση λάδι-νερό για συστήματα εκχυλίσματος φασολιών που προσομοιώνουν τις διεπαφές των μελετηθέντων γαλακτωμάτων. Το Σχήμα 6 παρουσιάζει τη δυναμική διεπιφανειακή τάση σε σχέση με τον χρόνο για τα εκχυλίσματα φασολιών. Αποδεικνύεται ότι τα εκχυλίσματα φασολιών μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση σε ενδιάμεσα επίπεδα. Η μείωση της διεπιφανειακής τάσης είναι υψηλότερη σε pH 7, και αυτό είναι σύμφωνο με την τάση που παρατηρείται για τις τιμές $d_{3,2}$ και $d_{4,3}$ για γαλακτώματα που παρασκευάζονται στις ίδιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φασολιών (1%). Το φιλτράρισμα του εκχυλίσματος με φίλτρο 1 μm και 0,2 μm δεν είχε καμία επίδραση στη διεπιφανειακή τάση υποδεικνύοντας την απουσία σημαντικής προσρόφησης σωματιδίων 0,2-1 μm στη διεπιφάνεια.



Σχήμα 6. Δυναμικές διεπιφανειακές τάσεις λαδιού-νερού που προκαλούνται από προσροφημένο εκχύλισμα φασολιών σε 1% w/w, διαφορετικό pH, και φιλτραρισμένα από φίλτρα διαφορετικού μεγέθους πόρων (1 μm και 0,2 μm) μετά τη διάλυση. 1, 2 δηλώνουν δύο επαναλήψεις των μετρήσεων.

4. Συμπεράσματα

Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι σημαντικές για την παραγωγή νέων προϊόντων για τη βιομηχανία τροφίμων. Σε πολλές συνθέσεις τροφίμων, οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων.

Τα εκχυλίσματα λευκών φασολιών παρουσιάζουν ικανότητα γαλακτωματοποίησης για γαλακτώματα λάδι σε νερό σε pH 7, ενώ έχουν επίσης μικρότερο αλλά υπάρχον δυναμικό σε pH 3. Η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των εκχυλισμάτων λευκών φασολιών βασίζεται σε συνδυασμό της διεπιφανειακής προσρόφησης πρωτεϊνών και μικρότερων μορίων (όπως φαίνεται από τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης και τις μελέτες εκρόφησης SEC) και της σταθεροποίησης Pickering που προκαλείται από πολυσακχαριδικά σωματίδια. Σε αυτούς τους μηχανισμούς βασίζεται η μαγειρική εμπειρική χρήση των φασολιών σε ζωμούς, ενώ η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των εκχυλισμάτων λευκών φασολιών τα αναδεικνύει ως εναλλακτική σε τεχνητούς γαλακτωματοποιητές στα τρόφιμα.

Τέλος, τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περεταίρω διερεύνηση, προκειμένου τα υδατικά εκχυλίσματα των λευκών φασολιών να χρησιμοποιηθούν ευρέως ως γαλακτωματοποιητές στη βιομηχανία τροφίμων και όχι μόνο, μιας και τα φασόλια είναι βασική πηγή πρωτεΐνης στη διατροφή του ανθρώπου παγκοσμίως.

Βιβλιογραφία

1. Abdel-Haleem A.M.H., Omran A.A., Hassan, H.E. (2022). Value addition of broken pulse proteins as emulsifying agents. *J. Food Meas. Charact*, 16, 1367–1382.
2. Alba K., Ritzoulis C., Georgiadis N., Kontogiorgos V. (2013). Okra extracts as emulsifiers for acidic emulsions. *Food Res. Int.*, 54, 1730–1737.
3. Augustin, J., & Klein, B. Nutrition composition of raw, cooked, canned and sprouted legumes. In R. Matthews (Ed.), *Legumes*. (1992). Chemistry, technology and human nutrition. New York: Marcell Dekker INC, 187–219
4. Cheng L., Ye A., Hemar Y. Gilbert E.P., de Campo L., Whitten A.E., Singh H. (2019). Interfacial structures of droplet-stabilized emulsions formed with whey protein microgel particles as revealed by small- and ultra-small-angle neutron scattering. *Langmuir*, 35, 12017–12027.
5. Cheng L., Ye A., Hemar Y., Singh H. (2022). Modification of the interfacial structure of droplet-stabilised emulsions during in vitro dynamic gastric digestion: Impact on in vitro intestinal lipid digestion. *J. Colloid Interface Sci.*, 608, 1286–1296.
6. Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1983). Functional properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 60, 740.
7. Dickinson E. & Ritzoulis C. (2000). Creaming and Rheology of Oil-in-Water Emulsions Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Caseinate. *J. Colloid Interface Sci.*, 224, 148–154.
8. FAO (2012). FAO, Statistical Year Book. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e02d.pdf>).
9. Ferreira A.S., Nunes A., Castro A., Ferreira P., Coimbra M.A. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydr. Polym.*, 113, 490–499.

10. Filotheou A., Ritzoulis C., Avgidou M., Kalogianni E., Pavlou A., Panayiotou C. (2015). Novel emulsifiers from olive processing solid waste. *Food Hydrocoll.*, 48, 274–281.
11. Gaborieau M. & Castignolles P. (2011). Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399, 1413–1423.
12. Guida C., Aguiar A.C., Cunha R.L. (2021). Green techniques for starch modification to stabilize Pickering emulsions: A current review and future perspectives. *Curr. Opin. Food Sci.*, 38, 52–61.
13. Gundogan R. & Can Karaca A. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. *LWT*, 130, 109609.
14. Kacurakova M.C. & Ebringerova A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.*, 43, 195–203.
15. Koliastasia A., Kompothekrab V., Giotisb C., Moustakasb A. K., Skottib E. P., Gerakisb A., Kalogiannia E. P., Georgioua D., Ritzoulis C., (2020). Novel emulsifiers from olive mill compost. *Food Hydrocolloids*, 99. 105373.
16. Li C., Li Y., Sun P., Yang C. (2013). Pickering emulsions stabilized by native starch granules. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 431, 142–149.
17. Lu X., Wang L., Li Y., Huang Q. (2018). Assembly of Pickering emulsions using milled starch particles with different amylose/ amylopectin ratios. *Food Hydrocolloids*, 84, 47–57.
18. Makri E. A., Doxastakis G. I. (2006). Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* or *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20, 1141–1152.
19. Okubanjo S.S., Loveday S.M., Ye A.M., Wilde P.J., Singh H. (2019). Droplet-stabilized oil-in-water emulsions protect unsaturated lipids from oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 2626–2636.
20. Pavlou A., Ritzoulis C., Filotheou A., Panayiotou C., (2016). Emulsifiers Extracted from Winery Waste. *Waste Biomass Valor.*, 7. 533–542
21. Sun X.F., Xu F., Zhao H., Sun R.C., Fowler P., Baird M.S. (2005). Physicochemical characterisation of residual hemicelluloses isolated with cyanamide-activated hydrogen peroxide from organosolv pre-treated wheat straw. *Bioresour. Technol.*, 96, 1342–1349.

22. Tadros, Th. F & Vincent, B. (1983). Encyclopedia of Emulsion Technology (ed. Becher, P.), Marcel Dekker, New York.
23. Tadros, Th.F. (2009) Emulsion Science and Technology. Weinheim ISBN: 978-3-527-32525-2
24. Tadros, Th.F. (2005). Applied Surfactants, Wiley-VCH, Weinheim. ISBN: 978-3-527-30629-9
25. Tang X., Shen Y., Zhang Y., Schilling M.W., Li Y. (2021). Parallel Comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins. LWT, 146, 111594.
26. Wani I. A., Sogi D. S., Shivhare U. S., Gill B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. Food Research International, 76, 11-18.
27. Zhu F. (2019). Starch based Pickering emulsions: Fabrication, properties, and applications. Trends Food Sci. Technol., 85, 129–137.