

Uso di polisaccaridi come modificatori per l'adsorbimento di proteine vegetali all'interfaccia olio/acqua

Roberta Faragò e Noemi Baldino

Department of Information, Modeling, Electronics and Systems, (D.I.M.E.S.) University of Calabria,
Via P. Bucci, Cubo 39C, I-87036 Rende (CS), Italy

Abstract

Lo scopo di questo lavoro è quello di indagare l'adsorbimento simultaneo di sistemi proteine vegetali/polisaccaridi all'interfaccia olio/acqua. È stata effettuata un'analisi interfacciale sia per soluzioni di proteine pure all'interfaccia con olio di girasole purificato e non, sia per miscele proteine/polisaccaride. È stato utilizzato un tensiometro a goccia a pendente per effettuare misure statiche di tensione interfacciale e misure dinamiche con oscillazioni di piccola ampiezza.

Sono state studiate le proteine della canapa e del riso nero e su entrambe è stata condotta un'ampia caratterizzazione interfacciale mediante analisi in cinematica dilatazionale. È stato scelto come agente stabilizzante il gellan gum, un polisaccaride di origine batterica, le cui proprietà interfacciali sono poco note in letteratura.

I risultati sperimentali hanno dimostrato che i valori di tensione interfacciale ottenuti non sembrano essere dipendenti dalla concentrazione di gellan gum, per cui è possibile concludere che il gellan gum non ha nessun effetto interfacciale, ma interagisce in modo diverso con le due proteine vegetali studiate e porta a comportamenti differenti delle due interfacce studiate.

Introduzione

Le proteine vegetali hanno un elevato valore nutrizionale e sono caratterizzate da un profilo amminoacidico completo. Queste caratteristiche le rendono una valida alternativa alle proteine animali in prodotti alimentari destinati a consumatori che, per motivi legati ad allergie od intolleranze alimentari o semplicemente per motivi etici, non consumano derivati dell'industria lattiero-casearia. Le proteine vegetali sono sempre più utilizzate nell'industria alimentare non solo per l'ottenimento di bevande di tipo vegetale, ma anche come base per la produzione di *soft food*.

Anche se ottenute da diverse fonti, le proteine vegetali sono costituite da quattro frazioni principali: glutenina, globulina, albumina e prolamina. Tutte queste proteine sono classificate come proteine semplici secondo la classificazione di Osborne (1909), in base alla loro solubilità in diversi solventi.

Hanno molte differenze nelle loro caratteristiche chimico-fisiche e sono presenti in diverse quantità nelle due proteine in analisi. Le proteine vegetali studiate sono costituite principalmente da glutenina e globulina mentre le frazioni rimanenti sono presenti in quantità più piccole.

In questo lavoro, sono state studiate le proprietà interfacciali di due proteine vegetali, le proteine della canapa e le proteine del riso nero, caratterizzate entrambe da un profilo amminoacidico completo, al fine di studiare un sostituto proteico completo sotto il profilo nutrizionale anche confrontate con proteine classicamente usate nell'industria alimentare, come ovalbumine, siero proteine etc.

Il consumo di prodotti a base di canapa è aumentato negli ultimi anni (House, Neufeld, & Leson, 2010) grazie al riconosciuto valore nutritivo e della bassa allergenicità dei semi di canapa. I semi di canapa contengono circa il 30% di olio e 25% di proteine (Callaway 2004). L'olio è ricco di acidi grassi polinsaturi (PUFA). Le frazioni proteiche presenti sono edestina (65%) e albumina (35%), e la composizione amminoacidica risulta completa e bilanciata (Girgih, Udenigwe, & Aluko, 2010). Inoltre, l'arginina è particolarmente abbondante nelle proteine della canapa (Bartkiene et al. 2016).

Le proteine del riso nero contengono, invece, circa il 76% di aminoacidi e il 36% di questi sono aminoacidi essenziali (come la lisina) (Kalman 2014, Santos et al. 2013).

Le proteine vegetali da sole non sono in grado di stabilizzare sistemi multifasici, come quelli dell'industria alimentare, pertanto è necessario l'impiego di agenti stabilizzanti, quali per esempio quelli di tipo polisaccaridico. I polisaccaridi sono ampiamente utilizzati per la formazione e la stabilizzazione di sistemi multifasici grazie alle loro proprietà ispessenti e gelificanti che originano dal loro carattere idrofilico e dal loro elevato peso molecolare e che ne determinano, quindi, un impiego mirato principalmente al controllo reologico della fase continua acquosa (Dickinson 2003, Dickinson 2011). Il polisaccaride scelto in questo lavoro è il gellan gum, la cui funzionalità è quella di aumentare la viscosità del sistema, strutturarne leggermente e rallentare i fenomeni di instabilità, come coalescenza e creaming. Il gellan gum è un tipo di polisaccaride extra cellulare microbico, di crescente importanza nell'industria alimentare, farmaceutica e chimica grazie alle sue nuove proprietà (Tako et al. 2009, Sosa-Herrera, Berli and Martinez-Padilla 2008, Bajaj et al. 2007).

La formazione dei complessi proteina-polisaccaride ha influenze, sia sulle cinetiche di adsorbimento delle molecole all'interfaccia, sia sulle proprietà meccaniche dei film interfacciali. Infatti, confrontando le proprietà di interfaccia, tra sistemi costituiti da sole proteine e sistemi bicomponente proteina-polisaccaride, è stato osservato che in presenza di polisaccaridi, la migrazione delle proteine all'interfaccia viene rallentata (Perez et al. 2009, Perez et al. 2011, Patino and Pilosof 2011, Martinez et al. 2007) ed i film interfacciali presentano proprietà meccaniche molto diverse, dipendenti dal tipo e contenuto di biopolimeri presenti in soluzione, che spesso comportano una riduzione dei moduli

interfacciali (Perez et al. 2009, Perez et al. 2011, Patino and Pilosof 2011, Bouyer et al. 2012, Lam and Nickerson 2013, Martinez et al. 2007).

Materiali e metodi

Materiali

Sono state analizzate inizialmente le proteine di *canapa (H)* e *riso nero (BR)* pure a diverse concentrazioni, all'interfaccia con olio di girasole (SF) e con olio di girasole purificato (PSF). Successivamente entrambe le proteine sono state studiate in presenza del *Gellan Gum Powder (G)* (Alfa Aesar, Thermo Fisher, Germania), del quale sono state preliminarmente valutate le proprietà interfacciali.

Le proteine utilizzate sono state acquistate sotto forma di polvere dalla Bulk Powders (Unit 1 Gunfleet Business Parl, Colchester) con un grado di purezza del 47% per la canapa e dell'80% per il riso nero. L'acqua bi-distillata utilizzata per la preparazione delle soluzioni è stata ottenuta da un sistema di purificazione Milli-Q (Millipore, USA). Per le prove interfacciali l'olio usato è l'olio di girasole (Fabiano), purificato e non.

Metodiche di purificazione e di preparazione dei campioni

Prima di poter procedere alla preparazione delle soluzioni proteiche da studiare, entrambe le proteine sono state purificate al fine di eliminare le fibre naturalmente presenti in essa.

Per quanto riguarda la proteina della canapa, è stata preparata una soluzione all'1%w/w di polvere proteica (proteina pura al 47% w/w) in acqua bi-distillata MilliQ, la soluzione è stata messa in agitazione mediante piastra magnetica (AREX Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Italia) per un'ora in modo da favorire la solubilizzazione della proteina e successivamente è stata centrifugata a 2900 rpm (Centrifuga 5810 Eppendorf, Italia) per 30 min, come suggerito dalla letteratura per le diverse tecniche di isolamento delle proteine (Tang et al. 2006, Hadnadev et al. 2018).

Per quanto riguarda, invece, la proteina di riso nero, la soluzione all'1% w/w di polvere proteica in acqua bi-distillata MilliQ è stata messa in agitazione mediante piastra magnetica (AREX Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Italia). Vista la scarsa solubilità di questo tipo di proteine in soluzione acquosa, legato al valore di pH corrispondente (5.8 ± 0.1) (Cao et al. 2009), la soluzione è stata miscelata per 12 ore a 25°C al fine di massimizzare la solubilizzazione della proteina. Come per il campione di canapa, è stata effettuata una successiva centrifugazione a 2900 rpm (Centrifuga 5810 Eppendorf, Italia) per 30 min.

Le soluzioni polisaccaridiche sono state preparate solubilizzando il gellan gum a 90°C per 10 min in acqua bi-distillata (Sosa-Herrera et al. 2008).

Le miscele proteine-polisaccaride sono state ottenute preparando separatamente le due soluzioni di partenza, come spiegato in precedenza, e miscelandole successivamente su piastra magnetica a temperatura ambiente. La preparazione delle soluzioni separatamente si è resa necessaria per evitare il surriscaldamento delle soluzioni proteiche che avrebbe portato ad una possibile denaturazione delle proteine.

Partendo dall'utilizzo dell'acqua bidistillata, il cui valore di pH è 5.6 ± 0.1 , per tutte le soluzioni è stato misurato il pH, come riportato in Tab.1, essendoci un legame diretto tra la solubilità della proteina ed il valore del pH della soluzione, in accordo a quanto riportato in letteratura (Tang et al. 2006).

PROTEINE	PROTEINE ID	PUREZZA (w/w%)	pH (-)
<i>Canapa</i>	H	47	6.8 ± 0.1
<i>Riso nero</i>	BR	80	5.8 ± 0.1

Tab.1 Condizioni di purezza e pH delle proteine utilizzate

La purificazione dell'olio è stata effettuata sulla base delle informazioni ottenute dalla letteratura (Dopierala et al. 2011), al fine di eliminare l'effetto tensioattivo di qualsiasi altra specie surfattante naturalmente presente nella fase oleosa (Seta et al. 2012).

Analisi Interfacciale

Le misure di tensione interfacciale, γ , sono state effettuate all'interfaccia O/W in condizioni statiche sia per soluzioni pure che per miscele proteina/polisaccaride utilizzando un tensiometro a goccia pendente (FTA200, First Ten Angstroms, USA), tramite l'impiego del software (fta32 v2.0), che utilizza il metodo ADSA (Axisymmetric Drop Shape Analysis) in grado, mediante un sistema di acquisizione di immagine, di ricostruire il profilo di una goccia formata all'interno di una seconda fase e valutarne la tensione interfacciale (Biresaw et al (2008)). È stato utilizzato, per tutte le prove effettuate, l'ago ad uncino poiché la densità dell'olio, sia esso purificato o no, è inferiore alla densità della soluzione proteica con la quale viene formata la goccia.

Le prove sono state condotte per un tempo di 3 ore, tempo sufficiente a garantire l'adsorbimento delle molecole all'interfaccia e registrare un valore di tensione interfacciale d'equilibrio.

Le prove in statico sono state effettuate alle diverse concentrazioni così da costruire l'isoterma di adsorbimento e valutare la concentrazione di saturazione all'interfaccia per le molecole oggetto di studio. I dati di tensione interfacciale sono stati, infine, elaborati mediante le equazioni: di Ward and Tordai (Camino et al. 2009, Camino et al. 2012, Seta et al. 2012), e di Graham e Phillips (Graham

and Phillips (1979), (Perez et al. 2009, Perez et al. 2011, Seta et al. 2012, Camino et al. 2009), al fine di ricavare le la velocità di diffusione, di adsorbimento e di riarrangiamento.

Sia all'interfaccia con olio purificato che con olio commerciale, sono state condotte misure in oscillatorio per soluzioni proteiche pure all'1%w/w, e nella condizione di concentrazione di saturazione per le miscele gellan/proteina vegetale. Mediante time sweep tests a diverse ampiezze di deformazione (nel range di deformazione dall'8% al 15% $\Delta V/V$), è stata individuata la regione di linearità e, in tale condizione, a diverse frequenze, è stato costruito il frequency sweep test, nel range di 0.005-0.1 Hz. Saranno, pertanto, riportati i valori modulo dinamico complesso interfacciale, E_d^* , e angolo di fase δ , valutati come riportato in Eq.1-2.

$$E_d^* = \sqrt{E_d'^2 + E_d''^2} \quad (Eq. 1)$$

$$\delta = E_d''/E_d' \quad (Eq. 2)$$

Potenziale zeta

Sulle soluzioni con proteina pura e quelle con l'aggiunta di gellan gum sono state inoltre effettuate misure di potenziale ζ tramite Zetasizer Nano (Malvern, Germania) in condizione di saturazione dell'interfaccia.

Per condurre le prove di potenziale ζ i campioni diluiti vengono inseriti all'interno di un'apposita cella, dotata di due elettrodi, posti a due differenti estremità, alle quali viene applicato un potenziale. Sistemi con potenziale ζ più di +30mV o meno di -30 mV sono normalmente considerate stabili.

Risultati e discussione

Le misure di tensione interfacciale sono state effettuate, dapprima, sulle due proteine pure, canapa e riso nero, all'interfaccia olio purificato e non purificato alle diverse concentrazioni, ottenendo, per ciascuna proteina, l'isoterma di adsorbimento (Fig.1 A e B).

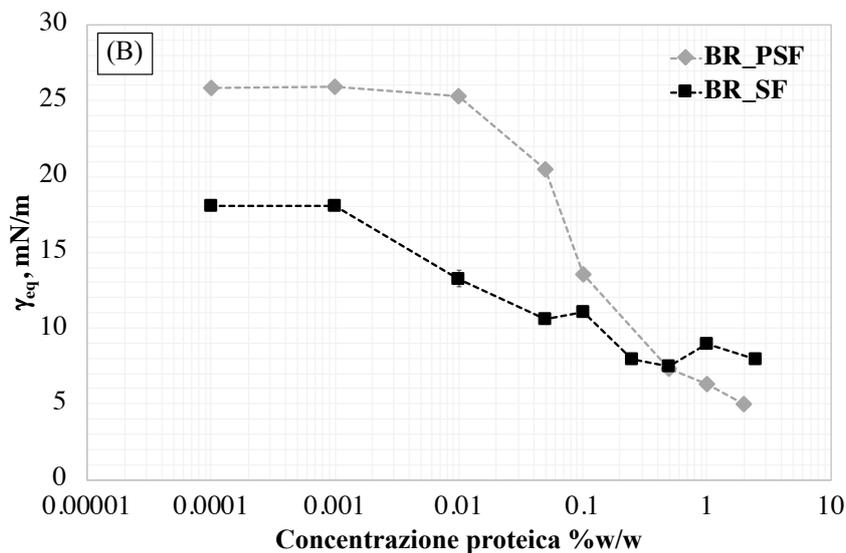
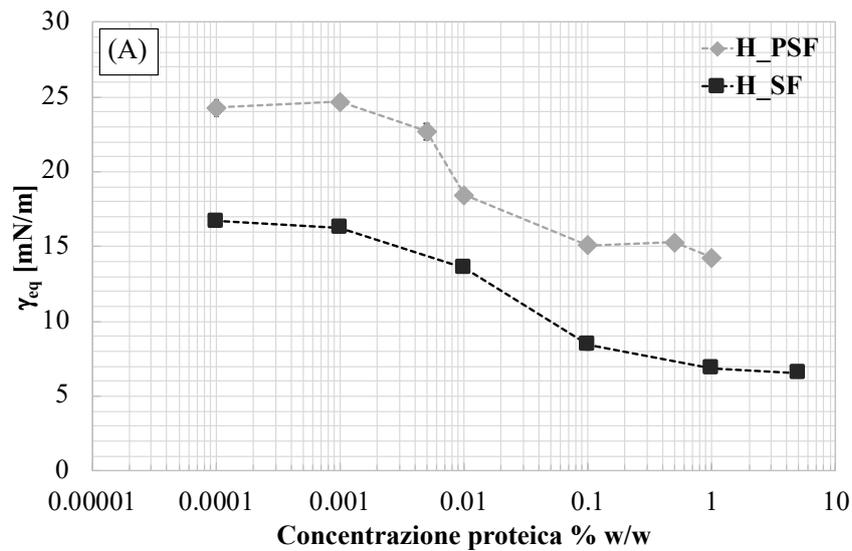


Fig.1: Isoterma di adsorbimento della proteina di canapa (A) e riso nero (B) all'interfaccia con olio di girasole purificato e non purificato

È possibile osservare per tutti i campioni proteici analizzati un trend sigmoidale tipico di molte specie biopolimeriche superficialmente attive, caratterizzato da due regioni di plateau, a basse e ad alte concentrazioni in soluzione di proteina. Per la proteina di canapa si osserva come i valori di tensione interfacciale siano nettamente distinti tra le due interfacce studiate e più alti all'interfaccia con olio purificato, probabilmente per effetto della rimozione dei surfattanti naturalmente presenti nell'olio. Per le proteine di riso nero, invece, si osservano valori ben distinti a basse concentrazioni di proteina, ma, ad alte concentrazioni, l'effetto surfattante alle due interfacce è abbastanza simile.

In (Tab.2), vengono riportate le CMC ed i valori di tensione, γ , alla concentrazione di saturazione, ricavate dalle isoterme di adsorbimento, per le rispettive proteine pure.

	C_{sat} [% w/w]	γ_{eq} [mN/m]
<i>H_SF</i>	1	6.9 ± 0.2
<i>H_PSF</i>	0.5	15.3 ± 0.1
<i>BR_SF</i>	0.25	7.9 ± 0.1
<i>BR_PSF</i>	1	6.3 ± 0.1

Tab.2: valori di CMC e γ_{eq} per le proteine pure all'interfaccia con olio purificato e non.

Dai valori ricavati si osserva come la tensione interfaciale di equilibrio sia nettamente diversa per le proteine di canapa alle due interfacce studiate e, in particolare, il valore risulta essere più basso nel caso dell'interfaccia con l'olio commerciale non purificato. Al contrario, i valori ottenuti a saturazione per il riso nero, sono più simili tra di loro e l'effetto surfattante della proteina è maggiore in assenza dei contaminanti dell'olio commerciale.

Anche per il Gellan Gum puro, all'interfaccia olio purificato e non, sono state valutate le proprietà interfaciali alle diverse concentrazioni e in Fig.2 vengono riportati i risultati.

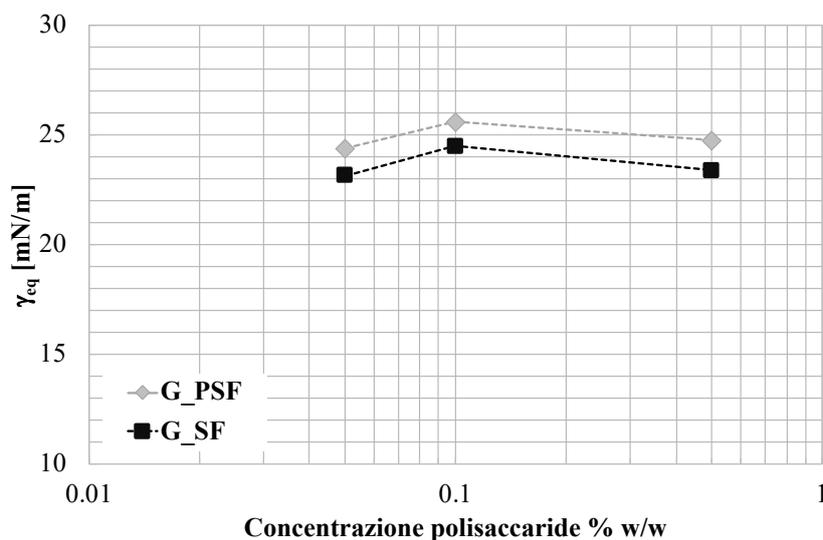


Fig.2: Isoterma di adsorbimento del polisaccaride all'interfaccia olio di girasole purificato e non purificato

Si osserva come i valori di tensione interfaciale non dipendano dalla concentrazione di gellan gum e come il valore sia prossimo a quello dell'olio ($\gamma_{eq} = 24.3 \pm 0.9$ mN/m), per cui è possibile concludere

che il gellan gum presente da solo all'interfaccia olio/acqua non modifica in alcun modo i valori di tensione interfacciale.

Stesse misure di tensione interfacciale sono state eseguite per le miscele proteina/polisaccaride all'interfaccia olio purificato e non, utilizzando una percentuale di gellan gum costante e pari allo 0.05%w/w. Tutte le miscele analizzate sono state riportate in Fig.3 in termini di tensione di equilibrio interfacciale verso la concentrazione di proteina/gellan gum.

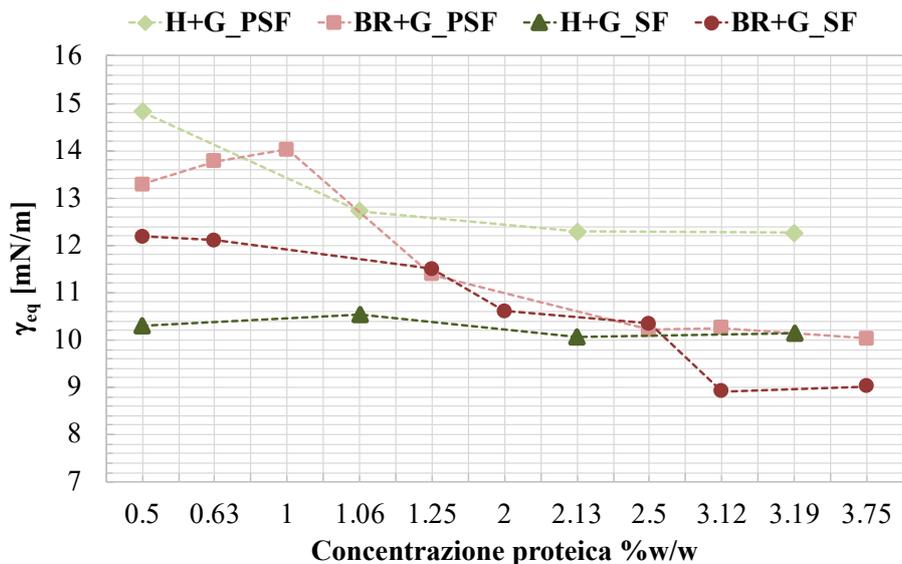


Fig.3: Isoterme di adsorbimento: confronto tra le due proteine in presenza dello 0.05%w/w di gellan gum in soluzione acquosa all'interfaccia olio purificato e non purificato

In presenza di gellan gum è possibile osservare una diminuzione dell'attività interfacciale per le proteine di riso nero, mentre per le proteine di canapa, in particolare all'interfaccia con l'olio commerciale, si osserva una leggera diminuzione dell'attività interfacciale, meno accentuata rispetto a quanto si verifichi nel caso delle proteine di riso nero.

Anche in questo caso, l'utilizzo dell'olio purificato porta a valori di tensione interfacciale più alti sia nel caso di utilizzo della proteina di canapa sia nel caso della proteina di riso nero. In quest'ultimo caso, però, sembra che le differenze tra i valori registrati all'interfaccia con l'olio purificato e non siano meno marcate rispetto a quanto si verifichi nel caso delle proteine di canapa.

Quindi si osserva un maggiore effetto dell'interfaccia sulla proteina di canapa e un minore effetto sul riso nero, probabilmente determinato da interazioni che si verificano tra le proteine di canapa e le specie surfattanti dell'olio.

Dall'analisi cinetica sono state valutate la velocità di diffusione, di adsorbimento e di riarrangiamento delle proteine pure (Fig.4) e delle miscele (Fig.5 e Fig.6).

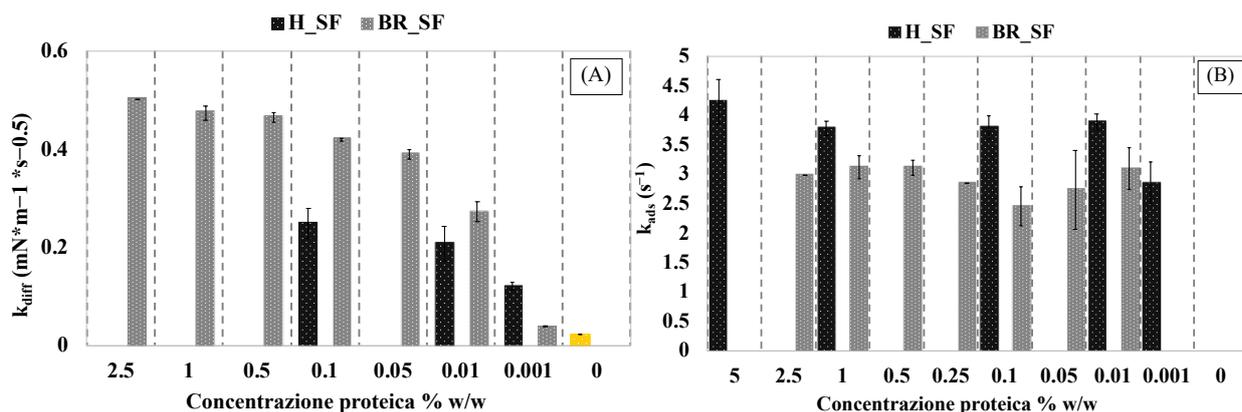


Fig.4: Cinetica delle proteine pure all'interfaccia olio di girasole

Per entrambe le proteine la velocità di diffusione diminuisce al diminuire della concentrazione proteica e la velocità di diffusione raggiunge un valore minimo in corrispondenza della completa assenza di proteina, per effetto delle specie surfattanti naturalmente presenti nell'olio (dato riportato in giallo in Fig.4).

La velocità di adsorbimento, invece, si mantiene costante e non mostra marcate dipendenze dalla concentrazione proteica. Si osserva, inoltre, come la velocità di diffusione del riso nero sia sempre superiore a quella delle proteine di canapa, ciò probabilmente è riconducibile alla dimensione media delle frazioni proteiche più piccole contenute nel riso nero che rendono più rapido il processo di migrazione all'interfaccia.

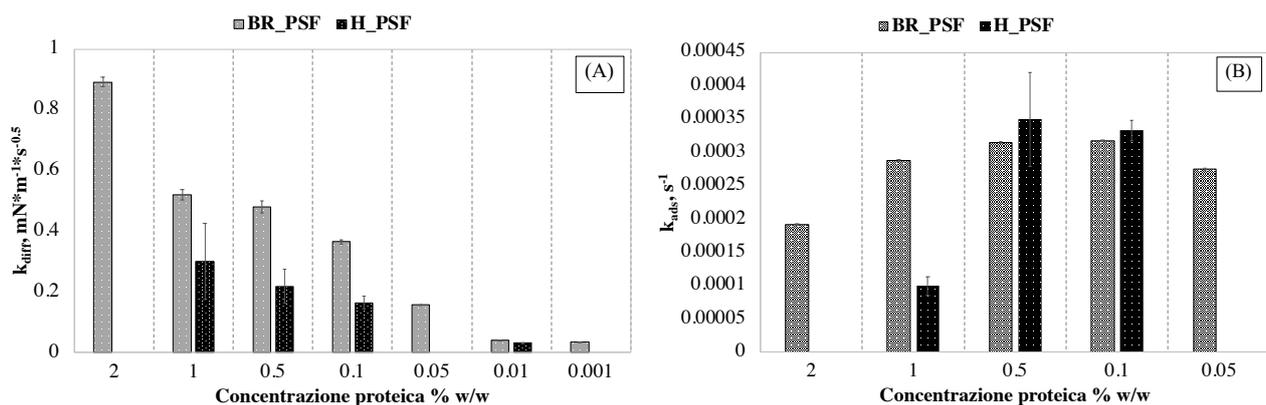


Fig. 5: Cinetiche di diffusione e adsorbimento per le proteine pure all'interfaccia con olio purificato

Anche all'interfaccia con l'olio di girasole purificato si osserva che all'aumentare della concentrazione di proteina presente, la velocità di diffusione aumenta, in particolare per le proteine del riso nero. Anche in questo caso, come per l'interfaccia con olio commerciale, la velocità di diffusione delle proteine di riso nero è superiore a quella della proteina di canapa. Per la velocità di

adsorbimento si osserva una crescita al diminuire della concentrazione proteica all'interfaccia, sia per le proteine di canapa che di riso nero. Per valori di concentrazione proteica inferiori allo 0.5%w/w la velocità si mantiene costante.

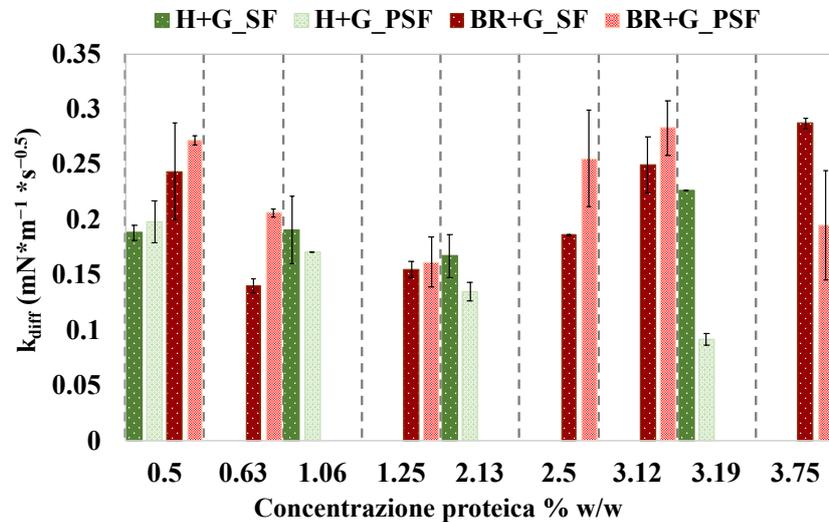


Fig.6: velocità di diffusione delle miscele proteina/polisaccaride all'interfaccia olio purificato e non

In presenza di gellan gum, la velocità di diffusione diminuisce all'aumentare della concentrazione di proteina di canapa all'interfaccia con olio purificato, effetto riconducibile ad una possibile formazione del complesso proteina-polisaccaride, che risulta più ingombrante e più lento nella cinetica di migrazione verso l'altra fase.

All'interfaccia con olio non purificato non si osservano importanti dipendenze dalla concentrazione proteica, probabilmente perché l'effetto cinetico del complesso proteina-polisaccaride è coperto dalla cinetica della fase oleosa.

Per la miscela con proteina di riso nero, invece, la velocità di diffusione diminuisce all'aumentare della concentrazione proteica, sia all'interfaccia con olio purificato che non, fino ad un valore critico, oltre il quale la velocità inizia ad aumentare. Probabilmente c'è una condizione massima di complessazione del gellan gum con le proteine di riso nero, oltre questa concentrazione l'ulteriore aggiunta di proteina corrisponde ad un incremento di proteina "libera" che, quindi, porta ad un aumento della velocità di diffusione.

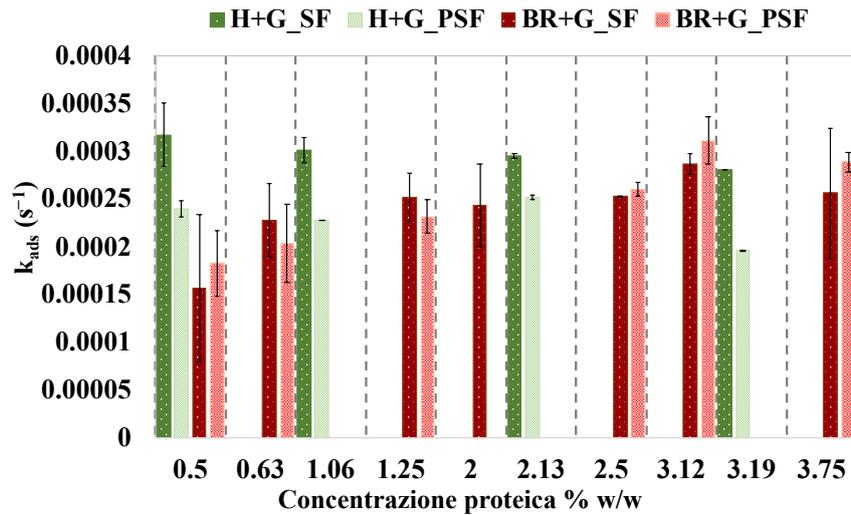


Fig.7: velocità di adsorbimento delle miscele proteina/polisaccaride all'interfaccia olio purificato e non.

La velocità di adsorbimento si mantiene costante per entrambe le miscele proteiche. In particolare, per la miscela con le proteine di riso nero in olio purificato si osserva, ad alte concentrazioni, un leggero aumento all'aumentare della concentrazione di proteina.

Per tutte le miscele non è stato riscontrato un meccanismo di riarrangiamento significativo.

Dalle misure in oscillatorio sono stati ricavati i frequency sweep test di tutti i campioni investigati.

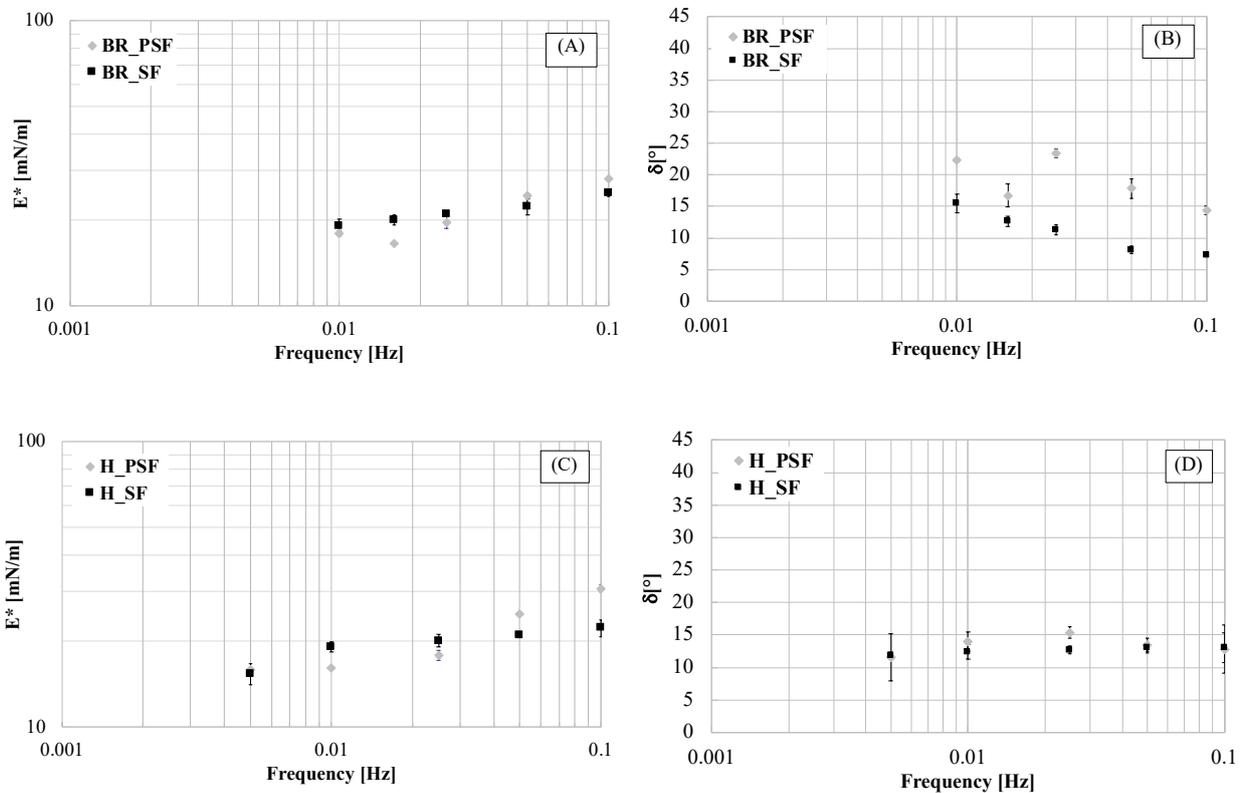


Figura 8: Frequency sweep tests dei campioni di proteina vegetale BR (A-B) e H (C-D) all'1%w/w alle due interfacce O/W investigate

Si osserva dall'analisi in frequenza dei campioni puri di proteine vegetali una buona resistenza meccanica degli strati interfacciali, con valori simili per le due proteine investigate e con comportamento solid-like per tutte le condizioni studiate. Tra l'interfaccia con olio purificato e quello commerciale, non si riscontrano importanti differenze soprattutto per le soluzioni con proteina di canapa, mentre per il riso nero osserva un leggero incremento dell'angolo di fase. Inoltre, la proteina di riso nero mostra una maggiore dipendenza della frequenza nell'interno del range investigato di frequenze.

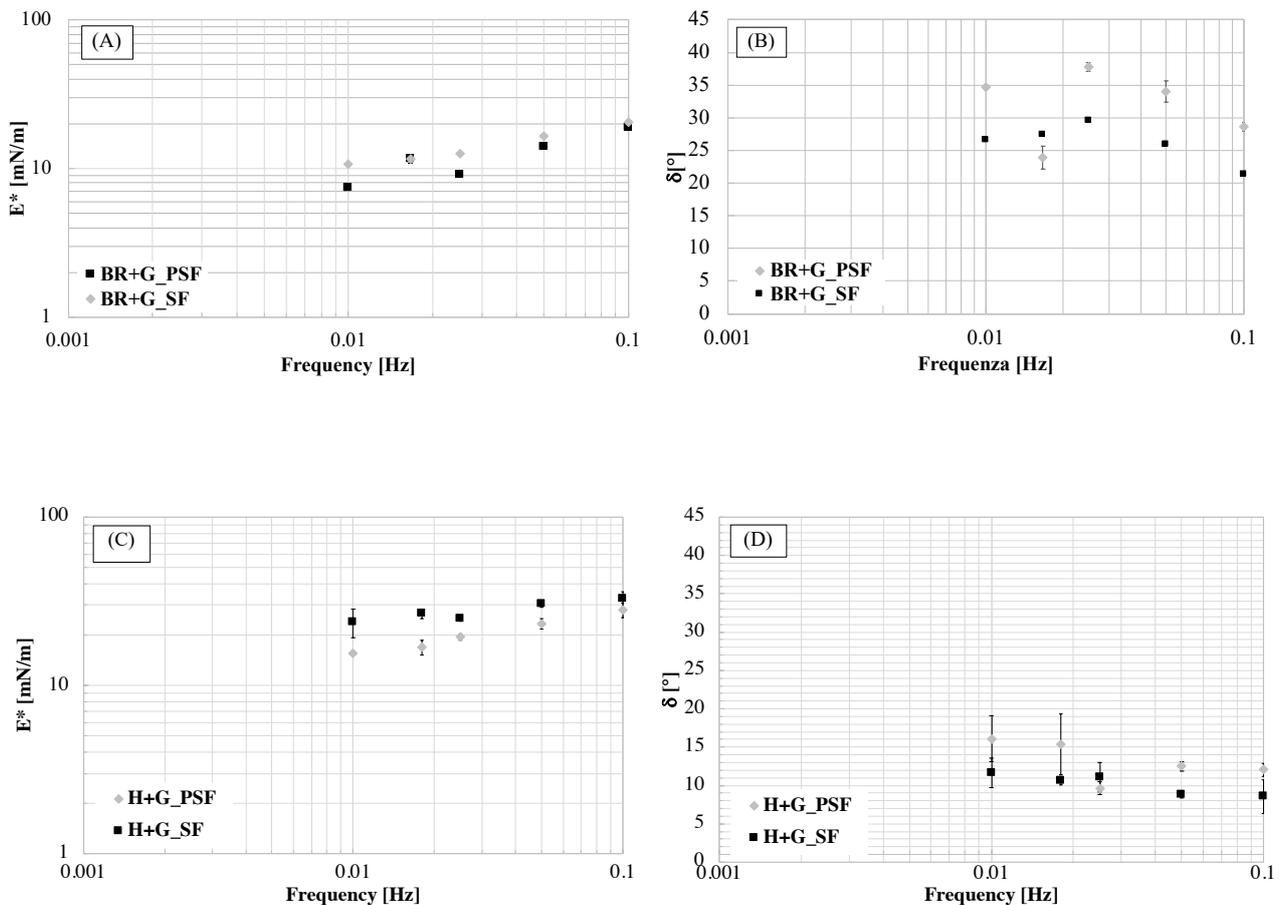


Figura 9: Frequency sweep tests dei campioni di proteina vegetale e gellan gum BR+G (A-B) e H+G (C-D) all'1%w/w alle due interfacce O/W investigate

La presenza di gellan gum non incide molto sull'effetto interfacciale delle proteine di canapa, sia in termini di E_d^* che di angolo di fase, mentre la sua presenza diminuisce la resistenza meccanica delle interfacce rivestite da proteine di riso nero, creando strati interfacciali più deboli. Le miscele BR/gellan gum mostrano, pertanto, moduli complessi più bassi e valori di angolo di fase più alti rispetto ai valori riscontrati alle interfacce con solo proteina.

Per stimare la stabilità degli strati interfacciali sono state effettuate delle misure di potenziale zeta, effettuando le misure sia sulla soluzione di proteina pura sia in miscela con il polisaccaride (Fig.10),

mantenendo il rapporto proteina/polisaccaride costante e pari a 50 (utilizzando 0.05%w/w di gellan e 2.5%w/w di proteina).

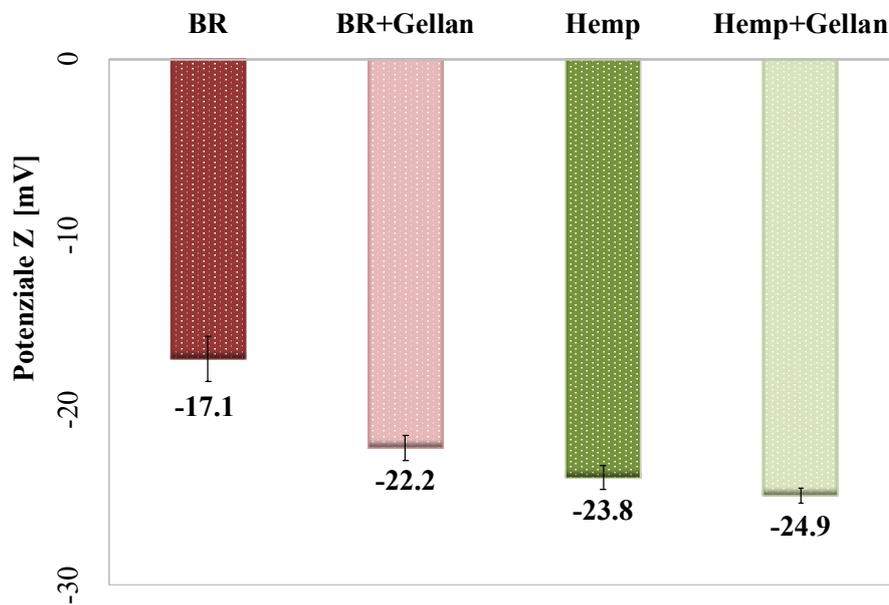


Fig.10: Misure di potenziale zeta delle proteine pure ed delle miscele

Si osserva come il valore assoluto del potenziale zeta sia più alto per le soluzioni con proteina di canapa. Questo suggerisce una maggiore tendenza alla stabilità rispetto a quelle preparate con riso nero (Prakash et al. 2014).

L'aggiunta di gellan gum alle soluzioni di canapa non sembra alterare significativamente i valori di potenziale zeta di queste soluzioni. Al contrario la proteina di riso nero risente fortemente della presenza del gellan gum e il valore di potenziale zeta aumenta, in valore assoluto, suggerendo un aumento di stabilità della proteina in presenza del polisaccaride.

Conclusioni

In questo lavoro è stato studiato il comportamento delle proteine vegetali in presenza di agenti stabilizzanti polisaccaridici come il gellan gum, all'interfaccia con l'olio di girasole commerciale, sia tal quale che purificato dalle impurezze dell'olio.

Le misure di tensione interfacciale sono state effettuate sia sulle proteine pure all'interfaccia olio purificato e non, sia sulle miscele proteina/polisaccaride all'interfaccia olio purificato e non, ed i risultati hanno mostrato che i valori di tensione interfacciale non sono dipendenti dalla concentrazione di gellan gum nel caso della proteina di canapa, mentre nel caso della proteina di riso nero la presenza di gellan gum porta a valori di tensione interfacciale più alti, diminuendone il potere surfattante.

Il gellan gum modifica i parametri interfacciali della proteina del riso nero con la quale probabilmente si lega. Al contrario l'analisi interfacciale delle proteine di canapa risulta meno dipendente dalla presenza di gellan gum, suggerendo una minore affinità tra le due specie.

L'utilizzo dell'olio non purificato ha portato proprietà interfacciali migliori che suggeriscono una maggiore stabilità per future applicazioni alimentari.

L'analisi cinetica ha mostrato che la presenza di gellan gum rallenta i fenomeni diffusivi caratteristici delle proteine analizzate per effetto della formazione di complessi proteina/polisaccaride. Probabilmente in presenza delle proteine di riso nero si realizza un effetto di legame più spiccato rispetto a quanto si verifica in presenza delle proteine di canapa.

Il fatto che si osservi un piccolo ritardo nella cinetica delle miscele proteina/polisaccaride, che diminuisce all'aumentare del rapporto di miscelazione, suggerisce che non tutte le proteine sono legate al polisaccaride, il che implica che l'affinità di legame è limitata. La minore densità di carica di questo polisaccaride lo spiega.

Dalle misure in oscillatorio in cinematica dilatazionale, i sistemi studiati mostrano tutti una buona resistenza meccanica con comportamento solid-like in tutti i casi. La presenza di gellan gum non altera in modo significativo il comportamento delle proteine di canapa, mentre incide sul comportamento esibito dalle proteine di riso nero ad entrambe le interfacce, diminuendo i valori di modulo complesso ed incrementandone l'angolo di fase. Anche l'analisi in oscillatorio, pertanto, lascia pensare ad un effetto di complessazione tra proteine del riso nero e gellan gum, che incide sulla resistenza meccanica dei film interfacciali formati.

In conclusione, è possibile che la proteina di riso nero, essendo una molecola piccola, si leghi con il gellan gum e ne modifichi le sue proprietà interfacciali, mentre la proteina di canapa, essendo una molecola più grande, non si lega con il polisaccaride lasciando inalterate le proprietà interfacciali anche in sua presenza.

Bibliografia

Bajaj, I. B., S. A. Survase, P. S. Saudagar & R. S. Singhal (2007) Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 341-354.

Bartkiene E., Schleining G., Krungleviciute V., Zadeike D., Zavistanaviciute P., Dimaite I., Kuzmaite I., Riskeviciene V., Juodeikien G., (2016), Development and quality evaluation of lacto-

fermented product based on hulled and not hulled hempseed (*Cannabis sativa*L.). *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 544-551

- Biresaw, G., Liu, Z. S. & Erhan, S. Z. (2008) Investigation of the surface properties of polymeric soaps obtained by ring-opening polymerization of epoxidized soybean oil. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(3), 1976-1985.
- Bouyer, E., G. Mekhloufi, V. Rosilio, J. L. Grossiord & F. Agnely (2012) Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 359-378.
- Callaway, J. C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 65-72.
- Camino, N. A., C. Carrera Sanchez, J. M. Rodriguez Patino & A. M. R. Pilosof (2012) Hydroxypropylmethylcellulose-beta-lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27, 464-474.
- Camino, N. A., O. E. Perez, C. Carrera Sanchez, J. M. Rodriguez Patino & A. M. R. Pilosof (2009) Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air-water and oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23, 2359-2368.
- Cao X., Wen H. , Li C., Gu Z. (2009) Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of Cereal Science*, 50 184–189.
- Dickinson, E. (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Dickinson, E. (2011) Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1966-1983.
- Dopierala, K., A. Javadi, J. Kraegel, K. H. Schano, E. P. Kalogianni, M. E. Leser & R. Miller (2011) Dynamic interfacial tensions of dietary oils. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 382, 261-265.
- Girgih, A. T., C. C. Udenigwe & R. E. Aluko (2011) In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 381-389.
- Graham D. E., & Phillips M. C. (1979). Proteins at liquid interface III Molecular structures of adsorbed films, *Journal of Colloid and Interface Science* 70, 427-439
- Hadnadev M. , Dapcevic-Hadnadev T., Lazaridou A., Moschakis T. , M. Michaelidou A., Popovic S., Biliaderis C. G. (2018) Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocolloids* 79, 526-533.

- House, J. D., J. Neufeld & G. Leson (2010) Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801-11807.
- Kalman D. S. (2014), Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates, *Foods*, 3, 394-402.
- Lam, R. S. H. & M. T. Nickerson (2013) Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141, 975-984.
- Martinez, K. D., C. C. Sanchez, V. P. Ruiz-Henestrosa, J. M. R. Patino & A. M. R. Pilosof (2007) Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 804-812.
- Patino, J. M. R. & A. M. R. Pilosof (2011) Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25, 1925-1937.
- Perez, A. A., C. R. Carrara, C. C. Sanchez, L. G. Santiago & J. M. R. Patino (2009) Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23, 1253-1262.
- Perez, A. A., C. C. Sanchez, J. M. R. Patino, A. C. Rubiolo & L. G. Santiago (2011) Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air-water interface saturation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 85, 306-315.
- Prakash S., Mishra R., Malviya R., Sharma P. K. (2014) Measurement Techniques and Pharmaceutical Applications of Zeta Potential: A Review . *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery*, 5, 33-40.
- Santos, K., R. D. D. Silveira, C. C. G. Martin-Didonet & C. Brondani (2013) Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48, 66-72.
- Seta, L., N. Baldino, D. Gabriele, F. R. Lupi & B. de Cindio (2012) The effect of surfactant type on the rheology of ovalbumin layers at the air/water and oil/water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 29, 247-257.
- Sosa-Herrera, M. G., C. L. A. Berli & L. P. Martinez-Padilla (2008) Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22, 934-942.
- Tako, M., T. Teruya, Y. Tamaki & T. Konishi (2009) Molecular origin for rheological characteristics of native gellan gum. *Colloid and Polymer Science*, 287, 1445-1454.

- Tang, C. H., Z. Ten, X. S. Wang & X. Q. Yang (2006) Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8945-8950.
- Wang, Q. L., J. Jiang & Y. L. L. Xiong (2018) High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk. *Food Research International*, 106, 487-494.