

BEZELYE PROTEİNİ VE SİRULİNA İLAVESİNİN İKİLİ HİDROJEL FORMLARININ REOLOJİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Gülce Bedis KAYNARCA*

Kırklareli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kırklareli, Türkiye

Geliş/Received: 02.08.2024; Kabul /Accepted: 24.09.2024; Online baskı /Published online: 26.09.2024

Kaynarca, G. B. (2024). Bezelye proteini ve spirulina ilavesinin ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri üzerine etkisi. GIDA (2024) 49 (5) 903-919 doi: 10.15237/ gida.GD24078

Kaynarca, G. B. (2024). The effect of pea protein and spirulina addition on the rheological properties of binary hydrogel forms. GIDA (2024) 49 (5) 903-919 doi: 10.15237/ gida.GD24078

ÖZ

Bu çalışma, bezelye proteini ve spirulina bazlı pektin-jelatin ikili hidrojellerinin yüksek su içeriği, düşük kalori ve tokluk hissi sağlama avantajları nedeniyle geliştirilmesi ve reolojik özelliklerinin incelenmesi üzerine odaklanmaktadır. Rotasyonel ve salınım testlerine göre kıvam katsayıları, 6P1B örneğinde (%6 pektin-%0.5 jelatin-%1 bezelye proteini) 6P1S örneğine (%6 pektin-%0.5 jelatin-%1 spirulina) göre sırasıyla %25 ve %20 daha yüksek bulunmuştur. Örneklerin akış davranış indeksleri 0.22 ± 0.01 ile 0.29 ± 0.02 aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca, bezelye proteini formülasyonlarının termal stabilitesi, spirulina içerenlerden daha iyi performans göstermiştir. Moleküler kenetleme analizi, pektin-jelatin, pektin-spirulina ve pektin-bezelye proteini arasındaki bağlanma enerjilerinin sırasıyla -6.53; -7.85 ve -8.30 kcal/mol ile nispeten kararlı ve etkili olduğunu işaret etmektedir. Bezelye proteini ve spirulina bazlı hidrojeller, 3D baskı teknolojisi ve yağ ikamesi olarak potansiyele sahip olup, besleyici ve işlevsel özellikleriyle yenilikçi gıda ürünlerinin geliştirilmesini destekleyebilirler.

Anahtar kelimeler: Hidrojel, pektin, bezelye proteini, jelatin, spirulina

THE EFFECT OF PEA PROTEIN AND SPIRULINA ADDITION ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BINARY HYDROGEL FORMS

ABSTRACT

This study focused on the development and rheological properties of pectin-gelatin binary hydrogels based on pea protein and spirulina due to their high water content, low calories, and satiety benefits. According to rotational and oscillatory tests, the consistency coefficients were 25% and 20% higher in the 6P1B sample (6% pectin, 0.5% gelatin, and 1% pea protein) compared to the 6P1S sample (6% pectin, 0.5% gelatin, and 1% spirulina), respectively. The flow behavior index ranged from 0.22 ± 0.01 to 0.29 ± 0.02 . Furthermore, the thermal stability of pea protein formulations outperformed those containing spirulina. Molecular docking analysis indicated that the binding energies between pectin-gelatin, pectin-spirulina, and pectin-pea protein were relatively stable and efficient, with values of -6.53, -7.85, and -8.30 kcal/mol, respectively. Pea protein and spirulina-based hydrogels show potential for use in 3D printing technology and as fat substitutes, and they can support the development of innovative food products with nutritional and functional properties.

Keywords: Hydrogel, pectin, pea protein, gelatin, spirulina

* Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: b.gulcebedis@klu.edu.tr

☎: (+90) 288 214 0514

Gülce Bedis Kaynarca; ORCID no: 0000-0001-7896-457X

GİRİŞ

Son dönemde, yüksek su içeriği, düşük kalorisi, cazip lezzeti ve tokluk hissini artırıcı etkisi sayesinde jelli gıdalar giderek daha fazla ilgi görmektedir. Polisakkarit ve protein karışımları, tek başına kullanılan polisakkarit veya protein sistemlerine kıyasla jel yapılarının düzenlenmesinde genellikle daha başarılıdır (Yang vd., 2021).

Tek bir biyopolimer kullanılarak hazırlanan hidrojenlerin düşük su tutma kapasitesi, zayıf jel mukavemeti ve fiziksel kararsızlık gibi sınırlamalarını aşmak amacıyla, proteinler ve polisakkaritlerden oluşan ikili hidrojenler geliştirilmiştir (Zha vd., 2021). İkili hidrojen oluşturmak için protein-protein, polisakkarit-polisakkarit ve protein-polisakkarit gibi farklı kombinasyonlar kullanılabilir. Proteinler ve polisakkaritler, kovalent ve kovalent olmayan etkileşim yetenekleri sayesinde daha etkili bir şekilde ikili hidrojenler oluşturabilmektedirler (Hilal vd., 2023). Son yıllarda, farklı kimyasal özelliklere sahip yapı bileşenleriyle hazırlanan hidrojenler, jel bazlı sistemlerin mekanik ve mikroyapısal özelliklerini iyileştirme potansiyelleri nedeniyle giderek artan bir araştırma konusu olmuştur (Liu vd., 2023).

Polisakkaritler ve proteinler farklı biyopolimer sınıflarına aittir ve kimyasal yapıları, fiziksel özellikleri ve işlevsellikleri açısından büyük farklılık göstermektedirler (Yang vd., 2021). Bu karışımlar polimerler ve çözücü arasındaki farklı afiniteleri sayesinde daha geniş bir faz davranış yelpazesine sahiptirler. Bu karışımlar polisakkaritlerin reolojik özellikleri ile proteinlerin besleyici işlevlerini birleştirerek çeşitli, fonksiyonel jel ağı yapılarının geliştirilmesine olanak sunmaktadır (Hou vd., 2015).

Hidrojenler, gıda ambalajlarında antimikrobiyal aktivite sağlayarak ve nem kontrolü yaparak gıda kalitesini ve güvenliğini artıran, depolama ömrünü uzatan aktif ambalajların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, hidrofobik biyoaktif bileşiklerin (vitaminler, diyet lifleri, yağ asitleri, proteinler, probiyotikler, polifenoller, karotenoidler vb.) düşük su çözünürlüğü, kimyasal bozulma ve zayıf biyoyararlanım gibi

sorunlarını aşmak amacıyla, bu bileşenlerin gıdalara enkapsülleme sistemleriyle dahil edilmesi ve gastrointestinal sistemde hedeflenen bölgelere taşınmasında da büyük rol oynamaktadırlar (Klein ve Poverenov, 2020). Protein bazlı hidrojenlerin oluşturulmasında jelatin (Wang vd., 2023), zein (Melzener vd., 2023), yumurta proteini (Alavi ve Çiftçi, 2023), peynir altı suyu proteini (Yan vd., 2023), soya ve bezelye proteini (De Berardinis vd., 2023) kullanılmaktadır. Karbonhidrat bazlı hidrojenlerin yapısında ise aljinat (Wang vd., 2023), karragenan (Mirzaei vd., 2023), ksantan gum (Kamer vd., 2024), gellan gum (Xu vd., 2024), guar gum (Tanvar vd., 2024), agar (Cebrián-Llore vd., 2024), selüloz (Mo vd., 2024), nişasta (Koshenaj ve Ferrari, 2024), gum arabik (Kan vd., 2024), kitosan (Li vd., 2024) ve pektin (Ishwarya ve Nisha, 2022) kullanılmaktadır.

Pektin, bitki hücre duvarlarında doğal olarak oluşan temel olarak α -(1-4)-bağlı D-galakturonik asit birimlerinin tekrar eden birimlerinden meydana gelen bir polisakkarittir (Said vd., 2023). Pektin hidrojenleri; doğal, yumuşak ve esnek yapıları, yüksek su içeriği, biyoyoumlulukları ve kendine özgü yapıları sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Ishwarya ve Nisha, 2022). Pektin, doğası gereği sert bir polimer olup, mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla modifiye edilmektedir (Gupta vd., 2014).

Jelatin, hayvan kollajeninden türetilen, suda çözünür ve yüksek moleküler ağırlıklı bir proteindir. Jelleşme, koyulaştırma, stabilizasyon, emülsifikasyon ve film oluşturma gibi işlevleri vardır. Bu özellikleri sayesinde jelatin, biyolojik olarak aktif bileşiklerin kapsüllemesi ve doku mühendisliği alanlarında da kullanılmaktadır (Günter vd., 2024).

Jelatin ve pektin, mekanik özelliklerini, su direncini ve stabiliteğini artırmak için çeşitli etkileşimler aracılığıyla birleştirilebilir. Negatif yüklü pektin molekülleri ile pozitif yüklü jelatin molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimler sayesinde tersinir hidrojenler oluşturulabilmektedir (Gupta vd., 2014).

Bezelye proteinleri, bitkisel protein bazlı gıdaların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni yüksek besin değerleri, genetik modifikasyona uğramamış olmaları, erişilebilir olmaları, hipoalerjenik yapıları ve antioksidan, antihipertansif özellikleri ile bağırsak bakterilerini modüle etme gibi sağlık yararlarına sahip olmalarıdır (Zhang ve ark. 2024). Zhang vd., (2022) yapmış oldukları çalışmada pektinin bezelye proteinlerinin molekülleri arasındaki itici kuvvetleri artırarak küçük agregatların oluşması sağlayarak daha kararlı yapılar meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Mikroalgler, üstün besin değerleriyle yüksek kaliteli yeni gıda ürünleri için umut verici bileşen ve biyoaktif bileşik kaynaklarıdır. *Spirulina platensis*, mineral, vitamin ve protein bakımından zengin olup, anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir (Wang vd., 2023b). Büyük oranda yapısal biyopolimer (Protein ve karbohidrat) içerdiklerinde gıda ürünlerinde ekstürize edici, stabilize edici veya emülgatör olarak potansiyel bir rol oynayabilirler (Bernaerts vd., 2019). C-fikosiyanin (cPC), *Spirulina platensis*' den elde edilen ışık tutucu bir pigment proteindir. Antioksidan, anti-enflamatuar, anti-obezite ve anti-kanser aktivitelere sahiptir ve ayrıca fotodinamik tedavide kullanılabilir (Shi vd., 2024).

Reolojik özellikler, gıda ürünlerinin en önemli kalite unsurlarından biridir. Bu özellikler, sadece fiziksel görünümü açısından değil (örneğin istenen bir doku oluşturmak veya depolama sırasında faz ayrımı olaylarını önlemek) aynı zamanda duysal algı açısından da (tüketim sırasında bir gıdanın ağızda bıraktığı his gibi) büyük öneme sahiptir (Bernaerts vd., 2019). Yukarıda da değinildiği üzere ikili hidrojel formları yapı geliştirilmesinde gelecek vadede oluşumlardır. Pektin-jelatin bazlı hidrojel literatürde çalışılmış olmasına karşın düşük jelatin konsantrasyonlu ve yapıyı stabilize etmek için bitkisel kaynaklı protein içeren hidrojel yapıları araştırılmamıştır. Bitkisel protein bazlı gıdaların geliştirilmesinde, yüksek besin değerine sahip bezelye proteini, ikincil hidrojel yapısının oluşturulması amacıyla tercih edilmiştir. Bezelye

proteinine alternatif olarak potansiyel taşıyan spirulina tozu ise, ikili hidrojel geliştirilmesinde yenilikçi bir protein kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Kolay erişilebilir ve ucuz kaynaklar kullanılarak kararlı ve stabil yapıların geliştirilmesi önem arz ettiği gibi geliştirilen ürünlerin besleyici ve fonksiyonel özellikler taşıması da bir o kadar önemli bir konudur. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada, kolay erişilebilir pektin ve jelatin ile hidrojel geliştirilmesi ve bu yapının bezelye proteini ve spirulina ile kuvvetlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu maksatla pektin konsantrasyonu değiştirilerek (%2, 4 ve 6) en stabil yapı reolojik olarak belirlenmeye çalışılacaktır. Geliştirilen hidrojel yapılarının moleküler etkileşimleri, moleküler kenetleme ile belirlenecektir. Çalışma neticesinde elde edilecek pektin-jelatin-bitkisel protein bazlı hidrojel yapılarının, 3D baskı teknolojisi ve yağ ikamesi olarak kullanılma potansiyeline ışık tutması hedeflenmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Hidrojel üretiminde Bloom değeri 220 olan ticari sığır jelatini (Tijda Gıda Medikal Şirketi, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Karbonhidrat kaynağı olarak orta metoksilli elma pektini (Kimbiotek Kimyevi Maddeler San. Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. %82 proteine sahip bezelye proteini ve %68 proteine sahip spirulina tozu Kimbiotek Kimyevi Maddeler San. Tic. A.Ş. (İstanbul, Türkiye)' den temin edilmiştir.

Yöntem

Hidrojel formlarının hazırlanması

İkili hidrojel geliştirilmesi için protein ve pektin solüsyonları ayrı bir şekilde hazırlanmış ve ardından 1:1 oranda birleştirilmiştir. Ön denemeler neticesinde belirlenen yüzde bezelye proteini ve spirulina oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Bezelye proteini ve spirulina %2 oranda olacak şekilde saf suda manyetik karıştırıcı (Heidolph Instruments GmbH, Co., P/N: 506-11100-00) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından protein solüsyonu sıcaklığı 50-55°C arasına ısıtılmıştır.

Karışıma jelatin ilave edilmiş ve tamamen çözünmesi için 30 dakika karıştırılmıştır.

Pektin solüsyonu %4, 8 ve 12 olacak şekilde saf su ile 80°C'de manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldürülmüştür (Liu vd., 2017). Oda sıcaklığına gelen protein ve pektin solüsyonları 1:1

oranda 50°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmış, ardından homojenizatör (Ultraturrax T18, IKA, Germany) yardımı ile yapının kuvvetlendirilmesi için 14000 rpm'de 2 dakika homojenize edilmiştir. Homojen hale gelen solüsyonlar hidrojel eldesi için 4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Formülasyon kodları çizelge 1'de belirtilmiştir.

Çizelge 1. Hidrojellerin pektin, jelatin ve doğal bitkisel protein içerikleri
Table 1. Pectin, gelatin and natural vegetable protein content of hydrogels

| Formülasyon Kodu | Pektin | Bezelye Proteini | Spirulina | Jelatin |
|------------------|--------|------------------|-----------|---------|
| 6P1B | %6 | %1 | - | %0.5 |
| 4P1B | %4 | %1 | - | %0.5 |
| 2P1B | %2 | %1 | - | %0.5 |
| 6P1S | %6 | - | %1 | %0.5 |
| 4P1S | %4 | - | %1 | %0.5 |
| 2P1S | %2 | - | %1 | %0.5 |

İkili jellerin reolojik karakterizasyonu

Hidrojellerin reolojik özellikleri, sıcaklığı kontrol eden bir Peltier sistemine sahip Discovery Hybrid Rheometer-2 (TA Instruments, New Castle, ABD) kullanılarak rotasyonel ve salınımlı iki farklı deformasyon testi ile incelenmiştir. Ekipmanın kontrolü ve reolojik parametrelerin ölçülmesi TRIOS Yazılımı (V3.0) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ise OriginPro 2016 yazılımı (OriginLab Corporation, ABD) kullanılarak analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir.

Hidrojellerin salınım testi ile akış davranışları incelenmiştir. Analizde paralel plaka (ölçüm yüksekliği 1 mm; çap 40 mm) kullanılmıştır ve 10 saniyelik aralıklarla toplam 100 veri noktası toplanmıştır. Sabit kayma testi, 20°C'de 0.1-100 1/s kayma hızı ile gerçekleştirilmiştir. Akış davranışı, kıvam katsayısı (K , Pa.sⁿ) ve akış davranışı indeksi (n) değerleri, en yüksek belirleme katsayısına (R^2) sahip, yatışkan kesme akış davranışlarını en iyi tanımlayan Power law modeli kullanılarak belirlenmiştir. Power law modeli (Ostwald-de Waele, denklem 1):

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Burada σ , kayma gerinimi (Pa) ve $\dot{\gamma}$ kayma hızıdır (1/s). K kıvamlilik indeksi (Pa.sⁿ) ve n akış davranışı indeksini ifade etmektedir.

Hidrojellerin sıcaklığa bağlı akış davranışları da incelenmiştir. Hidrojeller 10°C'den 50°C'ye 1°C/dakika hızla ısıtılmış ve viskozite ve kayma gerinimleri belirlenmiştir. Termo-viskoelastik özelliklerin belirlenmesi için sıcaklık taraması, sabit kayma koşulları altında ($f = 1$ Hz ve $\gamma = \%1$) gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin doğrusal viskoelastik bölgesi (LVR) belirlendikten sonra, LVR bölgesinde 20°C'de frekans tarama testi gerçekleştirilmiş ve frekans aralığı 0.1-100 rad/s olarak uygulanmıştır. Bu testler sonucunda depolama modülü (G' , elastik rijitlik ölçüsü) ve kayıp modülü (G'' , viskoz sertliğin bir ölçümü) değerleri ölçülmüştür. Örneklerin G' ve G'' değerlerinin karşılaştırılması için Ostwald de Waele (Power Law) modeli (denklem 2 ve 3) kullanılmıştır:

$$G' = K(\omega)^n \quad (2)$$

$$G'' = K(\omega)^{n''} \quad (3)$$

Burada G , kayma gerilimini; K , kıvam katsayısını (Pa.sⁿ); ω , açısal hızı; ve n , akış davranış indeksini göstermektedir. Kompleks viskozite, kompleks modül (denklem 4) üzerinden şu şekilde (denklem 5) hesaplanmıştır:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (4)$$

$$\eta^* = G^*/\omega \quad (5)$$

Moleküler kenetlenme

Geliştirilen hidrojel sistemlerinin protein- ligand molekülleri arasındaki interaksiyonu belirlemek için moleküler simülasyon kullanılmıştır. Moleküler yerleştirme (kenetleme) simülasyonları için AutoDock Vina (Pyrex; <https://pyrx.sourceforge.io>), Discovery Studio (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio>) ve UCSF Chimera (California Üniversitesi, San Francisco, CA, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Heterotrimer yapıya sahip, üçlü helikal bir molekül olan Tip I Kollajeni, jelatini modellemede (PDB ID: 5cti Protein Data Bank of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <https://www.rcsb.org>) kullanılmıştır. Bezelye proteininin ana bileşeni olan 11S Legumin (PDB ID: 3KSC) (Zhang vd., 2022) spirulina ana bileşeni olan c-fikosiyanın (PDB ID: 1CPC) diğer model proteinler olarak seçilmiştir. Pektin molekülünü yerleştirmeyi simüle etmek için çok büyük olduğundan, temsili bir ligand olarak galakturonan (tetragalakturonik asit, CID 5459352) seçilmiştir. PyMol yazılımı bağlanma bölgelerinin görselleştirilmesinde, 2 boyutlu diyagramların oluşturulmasında ise Proteins Plus (DoG Site Scorer) (<https://proteins.plus/>) kullanılmıştır. 3 boyutlu yapılar da ilgili protein-ligand temas bölgelerinin tam otomatik tespitinde PLIP algoritmasından (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) yararlanılmıştır.

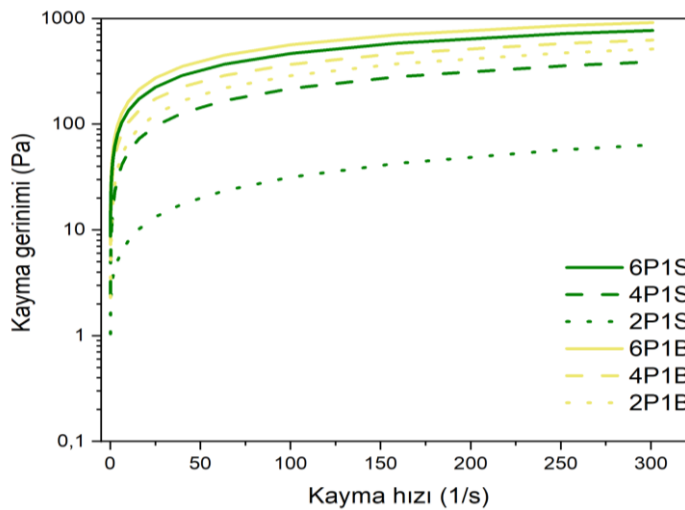
İstatistiksel analiz

Örneklerin istatistiksel anlamlılığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneyler üç tekrür halinde gerçekleştirilmiş ve numuneler arasındaki farklılıklar SPSS 17.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile Duncan'ın çoklu aralık testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak %95 seçilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Hidrojelilerin akış davranışlarının incelenmesi

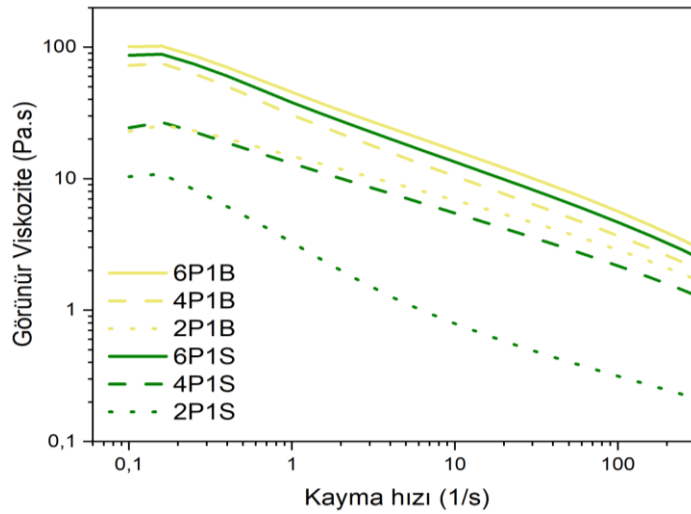
20°C'de, ikili jellerin reolojik karakterizasyonunu ortaya çıkarmak için viskozite ve kayma gerilimi değerleri sabit kaymada incelenmiştir. Farklı formülasyonlar için kayma gerilimi ve kayma hızı arasındaki ilişki Şekil 1'de gösterilmiştir. Kayma hızı arttıkça, kayma gerilimi tüm örneklerde artmaktadır. Bu durum ikili jellerin kayma ile incelen (shear thinning) davranış gösterdiğini belirtmektedir. 6P1B ve 6P1S formülasyonları için kayma gerilimi değerleri, kayma hızı arttırıldığında en yüksek olmuştur. Bu da pektin-spirulina ve pektin-bezelye proteini kombinasyonunun viskoziteyi arttırarak kalın ve tutarlı bir doku oluşturmak için birlikte çalıştığını kanıtlamaktadır. 2P1S formülasyonu daha az pektin içeriğine bağlı olarak, Şekil 1'de de görüldüğü gibi daha düşük bir başlangıç kayma gerilimi göstermiştir. Bu durum daha az yapısal stabilite ve sertliğe işaret etmektedir.



Şekil 1. Hidrojelilerin kayma hızına bağlı rotasyonel test reogramları
Figure 1 Shear rate dependent rotational test rheograms of hydrogels

Farklı pektin ve protein oranlarına sahip ikili jellerin kayma hızının bir fonksiyonu olarak görünür viskozitesi Şekil 2'de gösterilmektedir. Kayma hızının artmasıyla görünür viskozitedeki doğrusal olmayan düşüş, tüm jellerin kayma incelmesi davranışına sahip psödoplastik akışkanlar olduğunu göstermiştir. Kayma inceltici hareketlilik esas olarak kayma hızındaki artış ve moleküler zincir dolanıklığındaki azalmadan kaynaklanmaktadır (Cai vd., 2019; Wu vd., 2009).

Moleküller akış yönüne göre kolayca yeniden yönlendirilmekte ve bu da görünür viskozitede önemli bir düşüşe neden olmaktadır (Zhou vd., 2021). Kayma hızı arttıkça daha yüksek oleojel fraksiyonlarına sahip bigellerin viskozitesindeki benzer düşüş, sodyum aljinat hidrojel ve balmumu oleojeli ile oluşturulan diğer bigelerde de gözlenmiştir (Martin vd., 2019). 2P1S en düşük görünür viskoziteye sahip formülasyon olmuştur.



Şekil 2. Kayma hızına bağlı olarak hidrojel jellerin görünür viskozite (n_{app}) değişimleri
Figure 2. Apparent viscosity (n_{app}) changes of hydrogels depending on shear rate

Ostwald-de Waele Power Law modeli, psödoplastisiteyi ve viskozitedeki değişiklikleri (Tablo 2) K ve n değerleri ile karakterize etmek için kullanılmıştır. Çizelge 2'de görüldüğü gibi, tüm formülasyonlarda n değeri 1'den küçük bulunmuştur. Bu durum geliştirilen ikili jellerin güçlü kesme inceltme davranışı sergilediğini göstermektedir. Pektin içeriği arttıkça n değeri azalmıştır. Bezelye proteini içeren formülasyonlar daha düşük n değerine sahiptir ($p < 0.05$). Bu durum bezelye proteini ilaveli örneklerin daha güçlü psödoplastisiteye ve daha iyi ekstrüde edilebilirliğe sahip olduklarını göstermektedir. İkili jellerin kayma inceltme özelliklerine hem pektin hem de proteinler katkıda bulunmuştur. Pektin ve protein hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri aracılığıyla üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturmuştur (Swe ve Asavapichayont, 2018). Yüksek bir kesme hızı uygulandığında, her iki fazın ağları hızla tahrip olmuş ve düşük

viskozite sergilemiştir (Şekil 2). Örneklerin farklı viskoziteleri K değeri ile açıklanabilir. Örneklerin, K değeri pektin ilavesiyle artmış ($p < 0.05$) ve 6P1B formülasyonu en yüksek $54.79 \pm 2.22 K$ (Pa.sⁿ) değeri göstermiştir. Protein ilavesinin K değerini önemli ölçüde ($P < 0.05$) yükselttiği, proteinler için de ise bezelye proteininin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 3D baskı için kullanılacak bir gıda mürekkebinin uygun reolojik özelliklere sahip olması gerekir. Kesme incelmesi davranışı, bir nozülde ekstrüde edilirken iyi akışkanlık (daha yüksek kesme hızlarında daha düşük viskozite) ve basıldıktan sonra iyi bir stabilite ve şekil tutma kapasitesi (daha düşük kesme hızlarında daha yüksek viskozite) sağladığı için bu davranışı sergileyen polisakaritler ve proteinler gibi biyopolimerler tercih edilmektedir (Lenie vd., 2024). 3D baskı teknolojisi açısından pektin-jelatin ikili jellerinin reolojik özellikleri önemlidir. Pektin, ek baskı sonrası işlemlere ihtiyaç

duymadan stabil yapılar oluşturma kabiliyeti nedeniyle 3D baskılı iskelelerin geliştirilmesinde kilit bir bileşen olarak bildirilmiştir (Lapomarda vd., 2021). Jelatin ise kendi kendini destekleme özellikleri sunar ve jelleşme sürecinde önemli bir rol oynar (Varela vd., 2023). Hidrojellerdeki

pektin ve jelatin kombinasyonu, doku mühendisliği uygulamaları için uygun birbirine bağlı gözeneklere sahip karmaşık şekilli 3D yapılar oluşturmada umut vaat ettiğini göstermiştir (Lapomarda vd., 2021).

Çizelge 2. İkili jellerin Power-Law modeline ait parametreleri
Table 2. Parameters of the Power-Law model for binary hydrogels

| Örnek | K (Pa.s ⁿ) | n | R ² |
|-------|--------------------------|------------------------|----------------|
| 6P1B | 54.79±2.22 ^a | 0.49±0.01 ^d | 0.998±0.00 |
| 4P1B | 33.04±0.86 ^c | 0.52±0.01 ^c | 0.999±0.00 |
| 2P1B | 19.49±0.81 ^{cd} | 0.58±0.01 ^b | 0.998±0.00 |
| 6P1S | 43.91±1.51 ^b | 0.51±0.01 ^c | 0.998±0.00 |
| 4P1S | 15.61±0.49 ^e | 0.57±0.01 ^b | 0.999±0.00 |
| 2P1S | 1.89±0.12 ^f | 0.62±0.01 ^a | 0.997±0.00 |

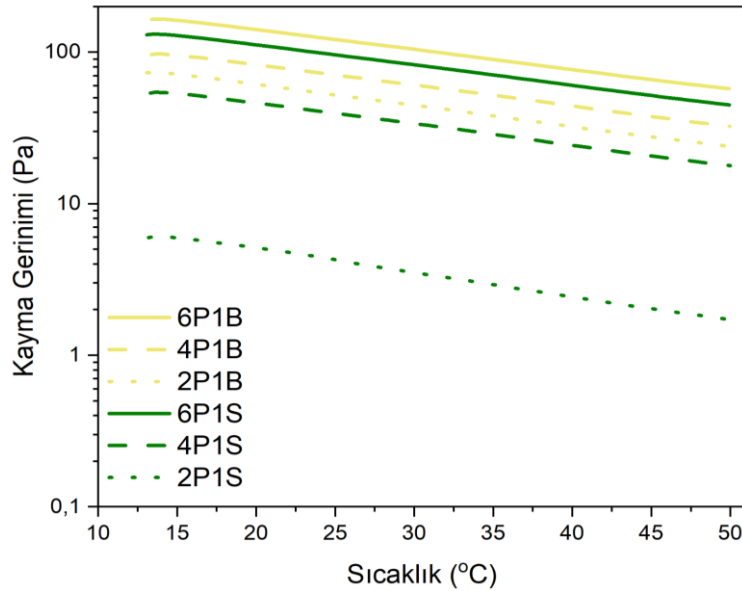
^{a-f} Aynı sütunda ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

^{a-f} It shows the statistical differences between the means in the same column ($P < 0.05$).

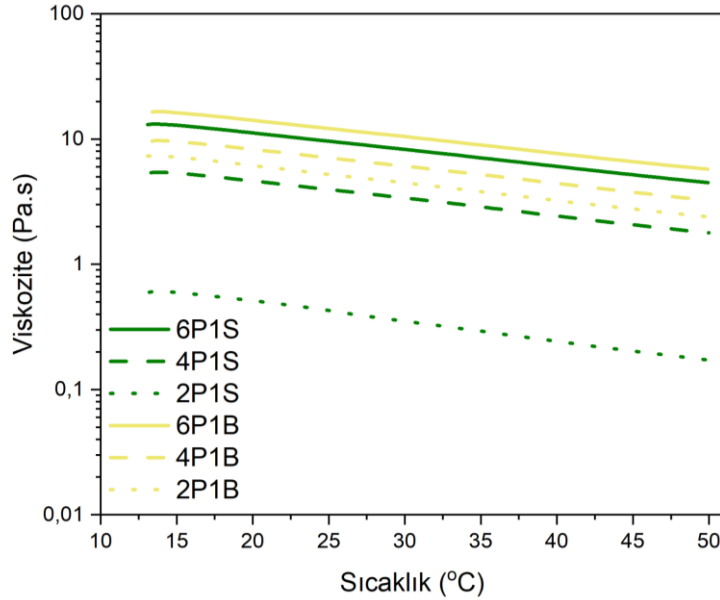
Sıcaklığa bağlı olarak hidrojellerin termoreolojik özellikleri

Hidrojellerin sıcaklıkla ilgili termoreolojik özellikleri viskozite ve kayma gerilimi açısından incelenmiştir. Jel formülasyonlarının sıcaklığa bağlı davranışları Şekil 3 ve Şekil 4'te gösterilmiştir. Jellerin başlangıçtaki kesme mukavemeti sıcaklıktaki artışla birlikte azalma

göstermiştir. Tüm formülasyonlarda benzer eğilim gözlenmiştir. Bu durum sıcaklık arttıkça jel yapısında genel bir yumuşama olduğunu gösterir. 6P1B ve 6P1S gibi daha yüksek pektin seviyelerine sahip formülasyonlar, daha düşük sıcaklıklarda daha yüksek başlangıç kesme mukavemetleri göstererek daha sert ve kararlı bir jel ağı oluşturmuşlardır.



Şekil 3. İkili jellerin sıcaklığa bağlı mukavemet değişimleri
Figure 3. Temperature dependent dynamic changes of binary gels



Şekil 4. Hidrojellerin viskozitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi
Figure 4. Temperature-dependent change in viscosity of hydrogels

Şekil 4'te gösterildiği gibi, 13°C ile 50°C arasında değişen sıcaklık taraması emülsiyon viskozitesinin sıcaklığa bağımlılığını göstermektedir. Tüm formülasyonlar, artan sıcaklıkla birlikte viskozitede düşüş eğilimi sergilemiştir. Jel sistemlerinde gözlenen artan sıcaklıkla viskozitedeki düşüş, termal enerji uygulandıkça jel ağı içindeki moleküller arası etkileşimlerin bozulmasına atfedilen yaygın bir olgudur (Yu vd., 2023). Daha yüksek pektin içeriğine sahip formülasyonlar (6P1B ve 6P1S) sıcaklık aralığı boyunca daha yüksek viskozite değerlerini koruyarak pektinin jel viskozitesini korumadaki rolünü vurgulamaktadır. Sıcaklıkla birlikte viskozitede hafif bir düşüş olduğunda, bu durum jel sisteminin genel özellikleri üzerinde minimal bir etki olduğunu gösterebilir. Benzer bulgular pektin jelleri ile yapılan araştırmalarda viskozitede 5 ila 2 mPas gibi küçük düşüşler bildirilmiştir (Morris vd., 2010). Aynı zamanda protein-protein interaksiyonuna bağlı olarak jelatin bazlı formüle spirulina ve bezelye proteininin ilavesi ile sıcaklık artışına bağlı olarak viskozitede önemli bir düşüş görülmemiştir. Bu olgu, protein-protein etkileşimlerinin doğasına ve proteinlerin farklı sıcaklıklarda geçirdiği yapısal değişikliklere bağlanabilir. Woldeyes vd., (2020) tarafından yapılan araştırma, protein-protein etkileşimlerinin

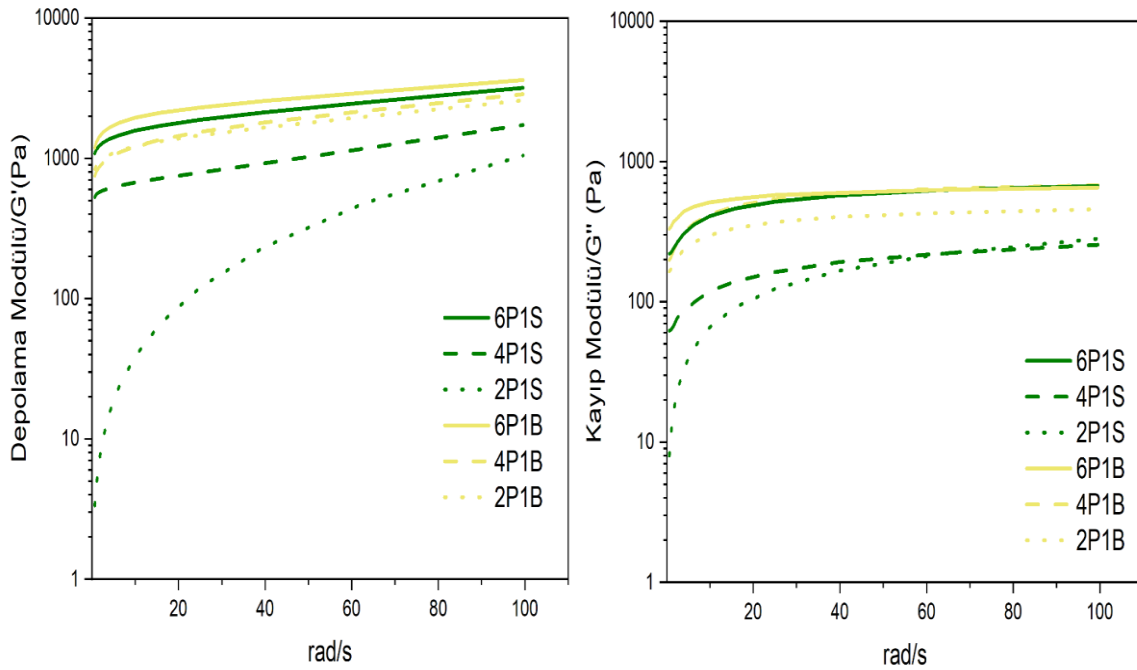
güçlü bir sıcaklık bağımlılığı sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca, Santos vd., (2022) çalışması soya ve bezelye proteinlerinin emülsiyonlarla uyumluluğunu vurgulayarak, bu proteinlerin iyi stabiliteye sahip yapışkan ağlar oluşturabileceğini ve bunun da formülasyonlarda gözlemlenen viskozite davranışında rol oynayabileceğini göstermektedir. Spirulina (6P1S ve 4P1S) ile stabilize edilen jeller, aynı sıcaklıkta bezelye proteini (6P1B ve 4P1B) içerenlere kıyasla daha düşük viskozite değerleri göstermektedir. Bu da bezelye proteininin jel sisteminin viskozitesine daha fazla katkıda bulunduğunu göstermektedir. Sahagún vd., (2018), protein ilavesinin genellikle viskoziteyi artırdığını ve bezelye proteininin en yüksek etkiyi gösterdiğini ortaya koyarak, formülasyonlarda kullanılan spesifik protein kaynağının sıcaklıkla viskozite değişikliklerini etkileyebileceğini bildirmiştir. 2P1S formülasyonu, düşük pektin ve spirulina içeriğine bağlı olarak stabilize edici etkisini yansıttak şekilde, sıcaklık aralığı boyunca en düşük viskoziteyi göstermiş ve sıcaklık değişiminden daha çok etkilenmiştir. Daha yüksek pektin ve protein içeriğine sahip formülasyonlar daha iyi termal stabilite göstermiştir. Termal stabilitesi yüksek hidrojel formları, 3D baskı ve püskürtmeli

kurutma ile enkapsülasyon gibi ısı işlem içeren gıda proseslerinde kullanım potansiyeline sahiptir.

Hidrojenlerin dinamik salınım davranışları

Frekans testi G' ve G'' değerini karşılaştırarak bir malzemenin viskoelastik özellikleri ve stabilitesi hakkında fikir vermektedir (Stojkov vd., 2021). Zamanla, partiküller veya moleküller arası bağlar hem uygulanan güçle hem de kendiliğinden oluşarak ya da kırılarak şekillenip yapısal değişikliklere neden olabilmektedir (Anvari ve Chung, 2016). 20°C ' de örneklerin çoğunluğunda depolama modülünün kayıp modülünden 2 log daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 5). Bu da hidrojenlerin katı benzeri davranış gösterdiklerine işaret etmektedir. Açıl hızın artmasına bağlı olarak 2P1S örneği hariç diğer hidrojenlerin depolama ve kayıp modüllerin de kademeli bir artış meydana gelirken 2P1S örneğinin birikim modülünde hızlı bir artış meydana gelmiştir. Bu

durum hidrojen yapısının kararlılığını koruyabilmesi için %2 pektin miktarının yetersiz kalması ile açıklanabilir. Farklı pektin konsantrasyonlarından bağımsız olarak bezelye proteini ilaveli örneklerin reolojik modüllerinin spirulina ilaveli örneklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bezelye proteini ilaveli hidrojenlerin kararlılıklarını gösteren $\tan\delta$ (G''/G') değerleri 0.24 ile 0.13 arasında değişiklik göstermektedir. Bu değer spirulina ilaveli örneklerde 0.18 ile 1.28 arasındadır. Pektin konsantrasyonunun artması ile bezelye proteini ile olan interaksiyonun arttığı gözlenmektedir. Bezelye proteini jellerinin yapısını geliştirmek için güçlendirici bir ajan olarak pektinin kullanıldığı bir çalışmada pektin konsantrasyonu arttıkça çalışmamızla benzer şekilde reolojik olarak yapının olumlu yönde değiştiği tespit edilmiştir (Zhang vd., 2022b).



Şekil 5. Hidrojenlerin açıl hızına bağlı depolama ve kayıp modüllerindeki değişimler

Figure 5. Changes in storage and loss modulus of hydrogels due to angular frequency

Yapısal sıkılık ve kararlılıklarının değerlendirilmesi amacıyla açıl hızının bir fonksiyonu olarak birikim ve kayıp modülünün Power-Law modeline uyumunu gösteren parametreler Tablo

3'te verilmiştir. Hidrojenlerin elastik ve viskoz modüllerinin kıvam katsayıları (K' ve K'') karşılaştırıldığında en yüksek değerler 1210.09 ± 52.54 ve $359.66 \pm 6.58 \text{ Pa.s}^n$ ile 6P1B

örneğinde bulunurken bunu 6P1S örneği takip etmiştir. Pektin konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak K' ve K'' değerlerinde azalma meydana gelmektedir. Örneklerin tümünde K' değerinin K'' değerinden yüksek olması katı benzeri davranışı destekler niteliktedir. Yüksek kıvam katsayısına (K) karşılık düşük akış indeksi (n) daha büyük moleküler dolaşımı ve iç içe

geçmeyi temsil etmektedir (Ghica vd., 2016). Elastik modülde en düşük akış davranışının 6P1B ve 6P1S viskoz modülde ise 6P1B örneğinde olduğu belirlenmiştir. Kayma incelmeleri davranışı sergileyen yapılarda n değerinin 0 ile 1 arasında çıkması ve bu değerın sifıra yakın olması beklenmektedir (Ghanbari vd., 2017). Buna uymayan tek örnek 2P1S örneği olmuştur.

Çizelge 3. Hidrojellerin açısız hıza bağılı birikim modülü parametrelerindeki değişimler
Table 3. Changes in storage modulus parameters of hydrogels depending on angular frequency

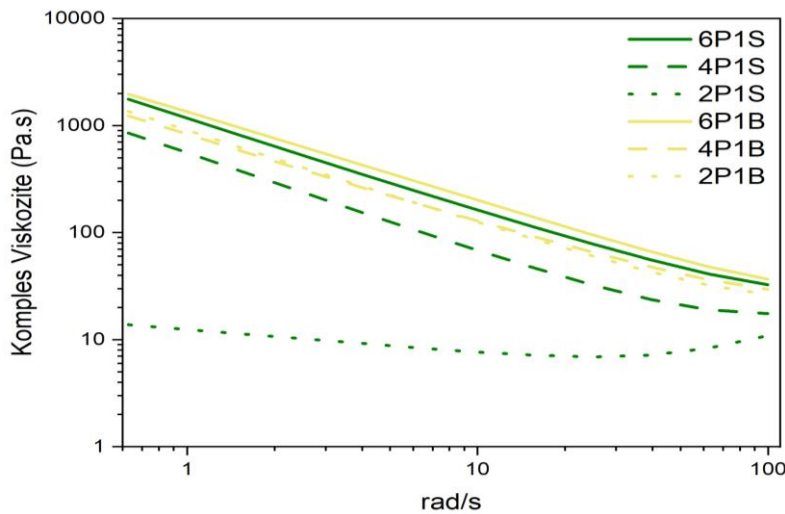
| Örnek | K' | n' | R^2 | K'' | n'' | R^2 |
|-------|----------------------------|------------------------|-----------|--------------------------|------------------------|-----------|
| 6P1B | 1210.09±52.54 ^a | 0.22±0.01 ^c | 0.97±0.00 | 359.66±6.58 ^a | 0.14±0.01 ^c | 0.98±0.00 |
| 4P1B | 961.99±55.89 ^d | 0.29±0.02 ^b | 0.95±0.00 | 226.30±8.99 ^b | 0.25±0.01 ^c | 0.98±0.00 |
| 2P1B | 759.03±61.21 ^c | 0.24±0.02 ^d | 0.92±0.00 | 178.55±4.46 ^c | 0.21±0.01 ^d | 0.99±0.00 |
| 6P1S | 1006.03±68.73 ^b | 0.22±0.02 ^c | 0.93±0.00 | 228.67±6.32 ^b | 0.24±0.01 ^c | 0.99±0.00 |
| 4P1S | 415.85±61.68 ^e | 0.26±0.04 ^c | 0.80±0.00 | 58.03±1.81 ^d | 0.32±0.01 ^b | 0.99±0.00 |
| 2P1SB | 0.60±0.08 ^f | 1.62±0.03 ^a | 0.99±0.00 | 15.46±0.85 ^e | 0.65±0.01 ^a | 0.99±0.00 |

^{a-f} Aynı sütunda ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

^{a-f} It shows the statistical differences between the means in the same column ($P < 0.05$)

Şekil 6'da görüleceği üzere açısız hız 0.1- 40 rad/s aralığında örneklerin tümü azalan bir kompleks viskozite sergilemişlerdir. Bu durum, makromoleküler bağlantıların ve zincir donanımlarının açısız hız etkisiyle bozulması sonucu gözlemlenen psödoplastik (kayma incelmeleri) davranışa işaret etmektedir. Ancak 2P1S örneğinde 40 rad/s açısız hızdan sonra hafifte olsa viskozitede bir artış görülmektedir. Bu tip bir kalınlaşma akışkanlarda, parçacıklar daha sık ve yoğun çarpışmaları neticesinde geçici

yapıların veya kümelerin oluşmasına yol açarak akışa karşı direnci ve dolayısıyla viskoziteyi artmasından kaynaklı olabilmektedir (Rosti ve Takagi 2021). Bu durum düşük pektin konsantrasyonlarında spirulinanın yapının kararlılığını sağlamada yetersiz kaldığını göstermektedir. Gıda ambalajlama sistemlerinde, daha dayanıklı ve plastik türevlerine alternatif film yapıların geliştirilmesinde pektin-jelatin-bezelye proteini bazlı karışımların kullanılabilceği öne sürülebilir.

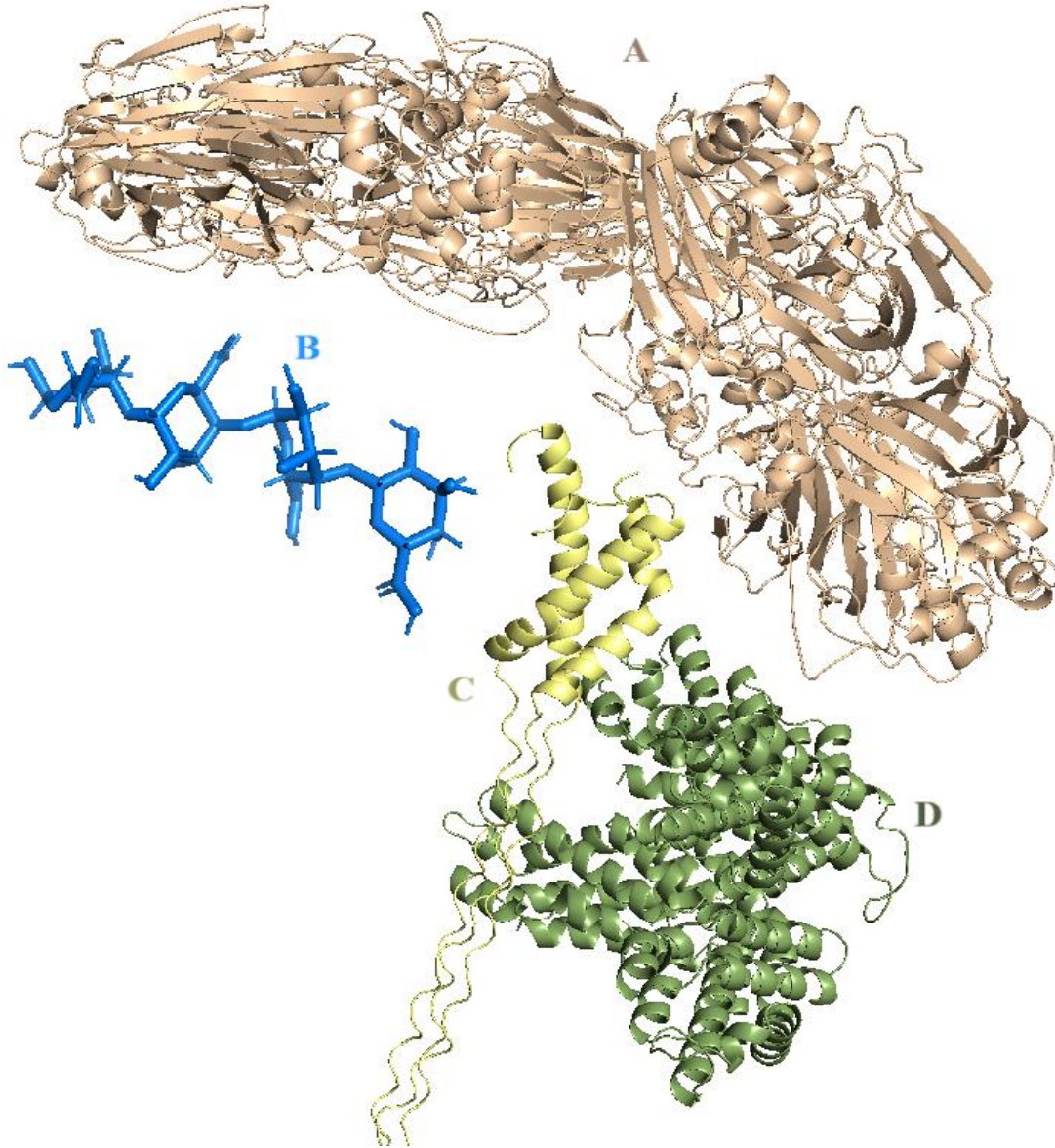


Şekil 6. Açısız hızın hidrojellerin kompleks viskozite (n^*) değerleri üzerine etkisi
Figure 6. Effect of angular frequency on complex viscosity (n^*) values of hydrogels

Moleküler kenetleme ile pektin ve proteinler arasındaki etkileşim

Bezelye proteini (Şekil 7A), jelatin (Şekil 7C) ve spirulina (Şekil 7D) ile pektin (Şekil 7B) arasındaki etkileşim olasılıklarını araştırmak ve potansiyel bağlanma yerlerini belirlemek amacıyla moleküler kenetleme gerçekleştirilmiştir. En yüksek kenetlenme skoru, en düşük bağlanma enerjisine

karşılık gelmektedir. Ve bu da en güçlü protein-ligand bağlanma afinitesini göstermektedir. AutoDock Vina, kenetlenme skorunu, van der Waals, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerin katkıda bulunduğu enerjiye dayalı olarak, kcal/mol cinsinden tahmin edilen bağlanma afinitesi olarak vermektedir (Yin vd., 2020).

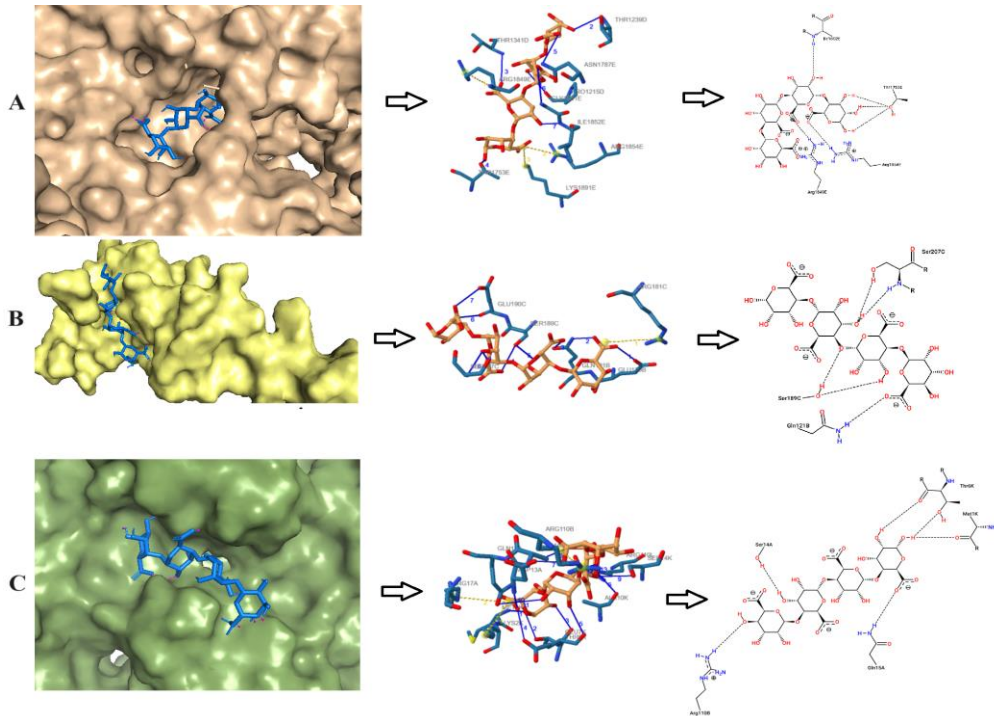


Şekil 7. A: Bezelye Proteini (11S legumin), B: Pektin (Tetragalakturanik asit), C: Jelatin (Tip 1 Kollajen) ve D: Spirulina (cPC) 3D simülasyonu

Figure 7. 3D simulation of A: Pea Protein (11S legumin), B: Pectin (Tetragalacturonic acid), C: Gelatin (Type 1 Collagen) and D: Spirulina (cPC)

Bezelye proteini-pektin, jelatin- pektin ve spirulina-pektin bağlanma bölgelerinin 3D ve 2D simülasyonu sırasıyla Şekil 8A, B ve C' de gösterilmiştir. Bezelye proteininin ana bileşeni olan 11S legumin ile pektin arasındaki bağlanma enerjisi ve mesafesi -8.30 kcal/mol ve 1.93 Å olarak belirlenmiştir. Treonin (Thr) kalıntı amino asidi ile 1239D, 1341D ve 1753E bölgelerinden sırasıyla 3.35, 2.74 ve 2.33 Å bağlanma mesafesinde hidrojen bağı oluşturduğu tespit edilmiştir. Treonin, yan zincirinde bulunan hidroksil grubu sayesinde hem hidrojen bağı vericisi hem de alıcısı olarak işlev görmektedir. Bu özellik, ligand ile güçlü hidrojen bağları kurarak ligand-protein kompleksinin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Smith vd., 2002). 11S legumin ile tetragalakturanik asit (TGT) arasında Pro-1215D, Asn-1787E, Gly-1851E ve Ile-1852E kalıntı amino asitleri ve bağlanma konumlarında 2.58, 3.02, 3.55 ve 1.90 Å mesafede diğer hidrojen bağları tespit edilmiştir. Hidrojen bağlarının genel olarak yakın mesafede ve yüksek çözünürlükte olduğu görülmektedir. Tuz köprüsü,

zıt yüklü kimyasal gruplar veya atomlar arasındaki elektrostatik çekim ile hidrojen bağı birleştiren kovalent olmayan bir etkileşimdir. Bu nedenle, bu etkileşimin gücü sıradan bir hidrojen bağının gücünden daha fazladır (Ferreira de Freitas ve Schapira, 2017). TGT'nin karboksil grupları ile Arg-1849 (4.83), Arg-1854 (3.64) ve Lys-1891 (3.92) kalıntı amino asitleri arasında elektrostatik etkileşimler ile tuz köprüleri olduğu tespit edilmiştir. Peptit hidrojenlerin etkili jelleşme stratejilerinde Lysin ve argininin (Arg) elektrostatik etkileşimleri önemli rol oynamaktadır (Sedighi vd., 2023). Bu nedenle Arginin (Arg), yüksek bağlanma afinitesi ile elektrostatik etkileşimleri hidrojenlerin stabilitesine katkıda bulunabilir (Cao vd., 2022). Protein ve ligand (pektin) arasındaki ara yüzeydeki amino asit kalıntılarının analizi, bezelye proteinin pozitif yüklü amino asitlerinin galakturonanın negatif yüklü karboksil gruplarıyla elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı kurabileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2022b).



Şekil 8. A: Bezelye proteini (11S legumin) ve pektin (TGT), B: Jelatin (Tip 1 kollajen) ve pektin, C: Spirulina (cPC) ve pektin arasındaki moleküler kenetlenmenin 3D ve 2D simülasyonu
Figure 8. 3D and 2D simulation of molecular docking. A: Pea protein (11S legumin) and pectin (TGT), B: gelatin (type 1 collagen) and pectin, C: Spirulina (cPC) and pectin

Jelatin-pektin ve spirulina-pektin arasındaki etkileşim skorları sırasıyla -6.53 ve -7.85 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan proteinlerin TGT ile bağlanma enerjileri -5.00 kcal/mol'den daha düşük bulunmuştur. Bu da pektin ile protein bağlanmasının hidrojel formülasyonları için nispeten kararlı ve etkili olduğunu işaret eder (Zhang vd., 2023). Jelatin-pektin etkileşiminde Glu-120B (2,94 Å), Gln-121B (2.20 Å), Gln-121B (3.22 Å), Ser-189C (2.28 Å), Ser-189C (2.99 Å), Glu-190C (3.59 Å), Glu-190C (3.18 Å), Ser-207C (1.99 Å) ve Ser-207C (2.23 Å) kalıntı amino asitleri ile 9 adet hidrojen bağı Arg-181C (5.30 Å) ile ise tuz köprüsü kurulmuştur. Serinler membran proteinlerinin transmembran alanlarında bulunan en yaygın polar kalıntılardır ve treonin gibi ligand-protein kompleksinin stabilizasyonuna katkı sunarlar (Smith vd., 2002). Jelatin-pektin etkileşiminde kalıntı aminoasit olarak en fazla serin ile yakın mesafede etkileşim olması güçlü interaksiyona ışık tutmaktadır.

C-fikosiyanin (cPC) ile TGT etkileşimi incelendiğinde en fazla bağlanma bölgesinin bu etkileşimde olduğu görülmektedir. Lys-2K, Arg-17A, Arg-110B ve Arg-110L kalıntı amino asitler ile 4.51, 5.23, 4.60 ve 5.43 Å mesafeden 4 adet tuz köprüsü ile elektrostatik etkileşim tespit edilmiştir. Bununla beraber Met-1K (3.27 Å), Thr-6K (2.63 Å), Thr-6K (2.35 Å), Glu-7K (3.17 Å), Glu-7K (2.75 Å), Ala-10K (2.32 Å), Asp-13A (3.38 Å), Ser-14A (2.13 Å), Ser-14K (2.82 Å), Gln-15A (2.26 Å), Gln-15A (3.17 Å), Arg-110B (2.44 Å) ve Arg-110B (2.24 Å) olacak şekilde oldukça yakın mesafeden 13 adet hidrojen bağı kurulmuştur. Diğer proteinlerden farklı olarak pektin kalıntı arginin ile hem elektrostatik hem de hidrojen bağı ile bağlanmıştır. Moleküler kenetleme sonuçlarının reolojik verilerle uyumlu olması, gıda matrislerinde kullanılacak formülasyonların önceden belirlenmesine olanak tanıyarak, zaman ve kaynak tasarrufu açısından büyük önem taşımaktadır. Kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip pigment protein ile pektin arasındaki bu kuvvetli etkileşim yapısal olarak stabil ve fonksiyonel hidrojel yapılarının geliştirilmesi için umut vaat etmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada bezelye proteini ve spirulina bazlı pektin-jelatin ikili jelleri başarıyla geliştirilmiş ve ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bezelye proteini ve spirulina ilavesi, hidrojelatin stabilitesini ve viskoelastik özelliklerini büyük ölçüde geliştirmiştir. Tüm formülasyonlar kesme inceltme davranışı gösterirken, bezelye proteini içerenler spirulina içeren formülasyonlara kıyasla daha belirgin psödoplastisite ve gelişmiş ekstrüde edilebilirlik sergilemiştir. Bezelye proteininin hidrojelatinin akış davranışı üzerinde daha büyük bir etkisi olmuştur. Bezelye proteini formülasyonlarının termal stabilitesi, spirulina içerenlerden daha iyi performans göstererek hidrojelatin termal davranışında protein türünün önemini vurgulamıştır. Dinamik salınım analizleri, bezelye proteini ile desteklenen hidrojelatin yüksek depolama ve kayıp modülleri sergilediğini ve bunun da gelişmiş stabilite ve elastikiyete işaret ettiğini göstermiştir. Moleküler yerleştirme analizleri, hidrojelatin stabilitesinin öncelikle bezelye proteini, jelatin ve spirulina dahil olmak üzere pektin ve proteinler arasındaki etkileşimlere bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Bezelye proteini ve pektin arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı, kompleksin korunmasında çok önemli bir rol oynamıştır. Sonuçlar, bezelye proteini ve spirulina bazlı ikili hidrojelatin 3D baskı teknolojisinde ve yağ ikamesi olarak kullanılmak üzere önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu hidrojelatin, besleyici ve işlevsel özellikleriyle yenilikçi gıda ürünlerinin ve ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesini kolaylaştırabilir.

KAYNAKLAR

- Alavi, F., Ciftci, O. N. (2023). Superlight macroporous aerogels produced from cold-set egg white protein hydrogels show superior oil structuring capacity. *Food Hydrocolloids*, 136, 108180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108180>
- Anvari, M., Chung, D. (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin-Gum Arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids*, 60, 516-524. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.028>

- Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., Van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107419. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419>
- Cai, W. D., Qiu, W. Y., Ding, Z. C., Wu, L. X., Yan, J. K. (2019). Conformational and rheological properties of a quaternary ammonium salt of curdlan. *Food Chemistry*, 280, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.059>
- Cao, Y., Li, Z., Fan, X., Liu, M., Han, X., Huang, J., Xiong, Y. L. (2022). Multifaceted functionality of L-arginine in modulating the emulsifying properties of pea protein isolate and the oxidation stability of its emulsions. *Food Function*, 13(3), 1336-1347. <https://doi.org/10.1039/D1FO03372G>
- Cebrián-Lloret, V., Martínez-Abad, A., López-Rubio, A., Martínez-Sanz, M. (2024). Exploring alternative red seaweed species for the production of agar-based hydrogels for food applications. *Food Hydrocolloids*, 146, 109177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109177>
- De Berardinis, L., Plazzotta, S., Manzocco, L. (2023). Optimising soy and pea protein gelation to obtain hydrogels intended as precursors of food-grade dried porous materials. *Gels*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.3390/gels9010062>
- dos Santos, M., da Rocha, D. A. V. F., Bernardinelli, O. D., Oliveira Júnior, F. D., de Sousa, D. G., Sabadini, E., Pollonio, M. A. R. (2022). Understanding the performance of plant protein concentrates as partial meat substitutes in hybrid meat emulsions. *Foods*, 11 (21), 3311. <https://doi.org/10.3390/foods11213311>
- Ferreira de Freitas, R., Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *Medchemcomm* 8 (10), 1970–1981. doi:10.1039/c7md00381a
- Ghanbari, M., Mortazavian, A. M., Ghasemi, J. B., Mohammadi, A., Hosseini, H. Nevestani, T. R. (2017). Formulation and development of a new prebiotic cereal-based dairy dessert: rheological, sensory and physical attributes. *Food Science and Technology Research*, 23(5), 637-649. DOI: 10.3136/fstr.23.637
- Ghica, M. V., Hirjău, M., Lupuleasa, D., Dinu-Pîrvu, C. E. (2016). Flow and thixotropic parameters for rheological characterization of hydrogels. *Molecules*, 21(6), 786. <https://doi.org/10.3390/molecules21060786>
- Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B. L., Alam, M. S. (2014). Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin-gelatin hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 106, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.019>
- Hilal, A., Florowska, A., Wroniak, M. (2023). Binary hydrogels: Induction methods and recent application progress as food matrices for bioactive compounds delivery—A bibliometric review. *Gels*, 9(1), 68. <https://doi.org/10.3390/gels9010068>
- Hou, J. J., Guo, J., Wang, J. M., He, X. T., Yuan, Y., Yin, S. W., Yang, X. Q. (2015). Edible double-network gels based on soy protein and sugar beet pectin with hierarchical microstructure. *Food Hydrocolloids*, 50, 94-101. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.012
- Ishwarya S, P., Nisha, P. (2022). Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (16), 4393-4417. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1875394>
- Kan, X., Zhang, S., Kwok, E., Chu, Y., Chen, L., Zeng, X. (2024). Granular hydrogels with tunable properties prepared from gum Arabic and protein microgels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132878. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132878>
- Klein, M., Poverenov, E. (2020). Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2337-2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>
- Koshenaj, K., Ferrari, G. (2024). A Comprehensive Review on Starch-Based Hydrogels: From Tradition to Innovation,

- Opportunities, and Drawbacks. *Polymers*, 16(14), 1991. <https://doi.org/10.3390/polym16141991>
- Lapomarda, A., Cerqueni, G., Geven, M. A., Chiesa, I., De Acutis, A., De Blasi, M., Vozzi, G. (2021). Physicochemical Characterization of Pectin-Gelatin Biomaterial Formulations for 3D Bioprinting. *Macromolecular Bioscience*, 21(9), 2100168. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100168>
- Lenie, M. D., Ahmadzadeh, S., Van Bockstaele, F., Ubeyitogullari, A. (2024). Development of a pH-responsive system based on starch and alginate-pectin hydrogels using coaxial 3D food printing. *Food Hydrocolloids*, 153, 109989. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109989>
- Li, C., Xu, Y., Zhang, Y., Shen, Y., Deng, X., Wang, F. (2024). Novel bigels based on walnut oil oleogel and chitosan hydrogel: Preparation, characterization, and application as food spread. *International Journal of Biological Macromolecules*, 260, 129530. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129530>
- Liu, L., Tian, W., Chen, M., Huang, Y., Xiao, J. (2023). Oral sensation and gastrointestinal digestive profiles of bigels tuned by the mass ratio of konjac glucomannan to gelatin in the binary hydrogel matrix. *Carbohydrate Polymers*, 312, 120765. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120765
- Martins, A. J., Silva, P., Maciel, F., Pastrana, L. M., Cunha, R. L., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A. (2019). Hybrid gels: Influence of oleogel/hydrogel ratio on rheological and textural properties. *Food Research International*, 116, 1298-1305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.019>
- Melzener, L., Spaans, S., Hauck, N., Pötgens, A. J., Flack, J. E., Post, M. J., Doğan, A. (2023). Short-Stranded Zein Fibers for Muscle Tissue Engineering in Alginate-Based Composite Hydrogels. *Gels*, 9(11), 914. <https://doi.org/10.3390/gels9110914>
- Mirzaei, A., Esmkhani, M., Zallaghi, M., Nezafat, Z., Javanshir, S. (2023). Biomedical and environmental applications of carrageenan-based hydrogels: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(5), 1679-1705. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02726-5>
- Mo, Q., Huang, L., Sheng, Y., Wei, Z., Zhang, S., Li, Y., Xue, M. (2024). Crosslinking strategy and promotion role of cellulose as a composite hydrogel component for three-dimensional printing—A review. *Food Hydrocolloids*, 110079. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110079>
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., Harding, S. E. (2010). The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectin solutions and gels. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2670-2673. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.013>
- Rosti, M. E., Takagi, S. (2021). Shear-thinning and shear-thickening emulsions in shear flows. *Physics of Fluids*, 33(8). <https://doi.org/10.1063/5.0063180>
- Sahagún, M., Bravo-Núñez, Á., Báscones, G., Gómez, M. (2018). Influence of protein source on the characteristics of gluten-free layer cakes. *LWT*, 94, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.014>
- Said, N. S., Olawuyi, I. F., Lee, W. Y. (2023). Pectin hydrogels: Gel-forming behaviors, mechanisms, and food applications. *Gels*, 9(9), 732. <https://doi.org/10.3390/gels9090732>
- Sedighi, M., Shrestha, N., Mahmoudi, Z., Khademi, Z., Ghasempour, A., Dehghan, H., Shahbazi, M. A. (2023). Multifunctional self-assembled peptide hydrogels for biomedical applications. *Polymers*, 15(5), 1160. <https://doi.org/10.3390/polym15051160>
- Shi, K., Wang, W., Sun, J., Jiang, C., Hao, J. (2024). A rapid one-step affinity purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Chromatography A*, 1720, 464801. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464801
- Smith, S. O., Eilers, M., Song, D., Crocker, E., Ying, W., Groesbeek, M., Aimoto, S. (2002). Implications of threonine hydrogen bonding in the glycophorin A transmembrane helix dimer. *Biophysical Journal*, 82(5), 2476-2486.

- [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75590-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75590-2)
- Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., Bose, R. K. (2021). Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. *Gels*, 7(4), 255. DOI: 10.3390/gels7040255
- Swe, M. T. H., Asavapichayont, P. (2018). Effect of silicone oil on the microstructure, gelation and rheological properties of sorbitan monostearate–sesame oil oleogels. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 485–497. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.04.006>
- Tanwar, M., Gupta, R. K., Rani, A. (2024). Natural gums and their derivatives based hydrogels: in biomedical, environment, agriculture, and food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(2), 275–301. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2157702>
- Varela, M. S., Palacio, M. A., Navarro, A. S., Yamul, D. K. (2023). Structural and functional properties and digital image texture analysis of gelatin, pectin, and carrageenan gels with honey addition. *Journal of Texture Studies*, 54(5), 646–658. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12774>
- Wang, L., Zhang, H. J., Wang, X., Zhao, W., Yan, W., Zhang, F., You, X. (2023). Edible hydrogel from gelatin and alginate as functional low-calorie noodle. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(2), e53281. <https://doi.org/10.1002/app.53281>
- Wang, M., Yin, Z., Sun, W., Zhong, Q., Zhang, Y., Zeng, M. (2023b). Microalgae play a structuring role in food: Effect of spirulina platensis on the rheological, gelling characteristics, and mechanical properties of soy protein isolate hydrogel. *Food Hydrocolloids*, 136, 108244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108244>
- Woldeyes, M. A., Qi, W., Razinkov, V. I., Furst, E. M., Roberts, C. J. (2020). Temperature dependence of protein solution viscosity and protein–protein interactions: insights into the origins of high-viscosity protein solutions. *Molecular Pharmaceutics*, 17(12), 4473–4482. [doi/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00552](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00552)
- Wu, Y., Cui, W., Eskin, N. A. M., Goff, H. D. (2009). An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International*, 42(8), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.015>
- Xu, S. Q., Du, Y. N., Zhang, Z. J., Yan, J. N., Sun, J. J., Zhang, L. C., Wu, H. T. (2024). Gel properties and interactions of hydrogels constructed with low acyl gellan gum and puerarin. *Carbohydrate Polymers*, 326, 121594. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121594>
- Yan, J., Li, S., Chen, G., Ma, C., McClements, D. J., Liu, X., Liu, F. (2023). Formation, physicochemical properties, and comparison of heat-and enzyme-induced whey protein-gelatin composite hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 137, 108384. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108384>
- Yang, X., Li, A., Li, D., Guo, Y., Sun, L. (2021). Applications of mixed polysaccharide-protein systems in fabricating multi-structures of binary food gels—A review. *Trends in Food Science and Technology*, 109, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.002>
- Yin, L., Fu, S., Wu, R., Wei, S., Yi, J., Zhang, L. M., Yang, L. (2020). Chain conformation of an acidic polysaccharide from green tea and related mechanism of α -amylase inhibitory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1124–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.125>
- Yu Deng, H., Ang Zheng, Z., Xie, A. M., Lin Chen, Z., Cao, P. (2024). Preparation and performance characterization of temperature-sensitive JP-3 kerosene gel propellant. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 49(1), e202300156. <https://doi.org/10.1002/prep.202300156>
- Zha, F., Rao, J., Chen, B. (2021). Plant-based food hydrogels: Constitutive characteristics, formation, and modulation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 56, 101505. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101505>
- Zhang, D., Chen, D., Campanella, O. H. (2024). Effect of pH on the gelling properties of pea

protein-pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 151, 109731. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109731>

Zhang, D., Chen, D., Patel, B., Campanella, O. H. (2022)b. Pectin as a natural agent for reinforcement of pea protein gel. *Carbohydrate Polymers*, 298, 120038. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120038>

Zhang, Q., Fan, W., Shi, Y., Tu, Z., Hu, Y., Zhang, J. (2023). Interaction between soy protein isolate/whey protein isolate and sucrose ester during microencapsulation: Multi-spectroscopy and molecular docking. *LWT*, 188, 115363. DOI: [10.1016/j.lwt.2023.115363](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115363)

Zhang, X., Wang, C., Qi, Z., Zhao, R., Wang, C., Zhang, T. (2022). Pea protein based nanocarriers for lipophilic polyphenols: Spectroscopic analysis, characterization, chemical stability, antioxidant and molecular docking. *Food Research International*, 160, 111713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111713>

Zhou, M., Bi, J., Chen, J., Wang, R., Richel, A. (2021). Impact of pectin characteristics on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of water-soluble pectins extracted from different sources. *Food Hydrocolloids*, 112, 106350. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106350>