

**YUMURTA KABUĞU ZARI PROTEİNLERİ VE GAM
ARABİK KOMPLEKSİNİN EMÜLSİYON STABİLİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATING THE EFFECT OF EGGSHELL
MEMBRANE PROTEINS AND GUM ARABIC COMPLEX
ON EMULSION STABILITY**

MERVE ERMAN

Doç. Dr. FAHRİYE CEYDA DUDAK ŞEKER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

YUMURTA KABUĞU ZARI PROTEİNLERİ VE GAM ARABİK KOMPLEKSİNİN EMÜLSİYON STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Merve ERMAN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

Ocak 2021, 59 sayfa

Emülgatörler, bir emülsiyonun oluşumunu ve stabilizasyonunu destekleyen yüzey aktif maddelerdir. Emülgatör olarak kullanılan katkı maddelerinin üretim yönteminin kolay ve ucuz olmasının yanı sıra bu yöntemle standart bir ürün elde edilmesi de gerekmektedir. Bu amaçla kompleks koaservasyon yöntemi ile yeni emülgatörlerin geliştirilmesine dayanan birçok çalışma yapılmıştır. Kompleks koaservasyon, pozitif yüklü moleküller ile negatif yüklü moleküller arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu koaservat oluşumuna dayanan bir yöntemdir. Gıda endüstrisinde genellikle pozitif yüklü molekül olarak proteinler, negatif yük bileşeni olarak da polisakkaritler kullanılmaktadır. Biyopolimer koaservatları spesifik mikroyapılar elde etmek ve gıdalara yeni fonksiyonel özellikler kazandırmak amacıyla potansiyel bir araç olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Tez kapsamında atık sınıfındaki yumurta kabuğu zarından elde edilen proteinlerin kompleks koaservatların oluşturulmasında kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Yumurta kabuğu zarı proteinleri sahip oldukları besleyici ve fonksiyonel özelliklerine rağmen değerlendirilmeyerek atılmakta, böylece hem çevre kirliliğine hem de potansiyel gelir kayıplarına neden olmaktadır. Koaservat oluşturmak için polisakkarit olarak emülgatör çalışmalarında sıklıkla kullanılan gam arabik seçilmiştir.

Tez çalışmasında yumurta kabuğu membranından izole edilen proteinler ile gam arabik kullanılarak kompleks koaservat oluşturulması ve oluşturulan koaservatların emülsifikasyon özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle yumurta kabuğu membranından protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen proteinler, gam arabikle farklı oranlarda ve pH değerlerinde etkileştirilmiş ve en yüksek etkileşimin görüldüğü parametreler belirlenmiştir. Kompleks koaservat oluşumu için optimum protein:gam arabik oranının 1:1 (a:a) ve pH değerinin 3.75 olduğu bulunmuştur. Hazırlanan kompleks koaservatların morfolojileri ışık mikroskobu ve çevresel taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Elde edilen koaservatların emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda koaservat içeren ve içermeyen su içinde yağ emülsiyonları hazırlanarak dokuz gün boyunca 4°C' de depolanmış ve emülsiyonların parçacık dağılım boyutları ve serum ayrışmaları değerlendirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre koaservat içermeyen kontrol grubunun ortalama damlacık çapı 2401 nm iken koaservatlarla hazırlanan emülsiyonların ortalama damlacık çapları kullanılan koaservat konsantrasyonuna bağlı olarak 462 - 982 nm aralığında değişmiştir. Ayrıca koaservat içeren emülsiyonlarda serum ayrışma değerlerinin daha küçük olduğu ve depolama süresi boyunca koaservat içeren emülsiyonların fiziksel görünümünün daha iyi korunduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kompleks koaservasyon yöntemiyle oluşturulan yumurta kabuğu zarı proteinleri-gam arabik koaservatının emülgatör olarak kullanılma potansiyeli ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: yumurta kabuğu zarı proteinleri, gam arabik, kompleks koaservasyon, koaservat, emülsiyon, emülgatör

ABSTRACT

INVESTIGATING THE EFFECT OF EGGSHELL MEMBRANE PROTEİNS AND GUM ARABIC COMPLEX ON EMULSION STABILITY

Merve ERMAN

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

January 2021, 59 pages

Emulsifiers are surface-active agents promoting the formation and stabilization of emulsions. The formation mechanism of additives used as emulsifiers also plays an important role. The production method of emulsifiers should be inexpensive, easy and create a standard product. For this purpose, a great number of studies have been carried out based on the development of new emulsifiers by complex coacervation method. Complex coacervation is a method based on the formation of coacervates as a result of the electrostatic interaction between positively and negatively charged molecules. In the food industry, proteins are used as positively charged molecules and polysaccharides as negatively charged components. Biopolymer coacervates are often used to fabricate specific microstructures providing new functional properties to foods.

In this thesis, the potential of the proteins isolated from the egg shell membrane in the formation of complex coacervates was investigated. Despite their nutritional and functional properties, eggshell membrane proteins are considered as waste causing both environmental pollution and potential income losses. Gum arabic, which is frequently used in emulsifier studies, was chosen as the polysaccharide in order to create coacervate.

The aim of this study was to produce a new emulsifying agent by complex coacervation method using eggshell membrane proteins and gum arabic and to examine the emulsification properties of the produced coacervates. Firstly, the proteins were isolated from eggshell membrane. Then, isolated proteins and gum arabic were mixed at different ratios and pH to determine the optimum conditions for coaservation. According to the turbidity results, the maximum interaction was found at pH 3.75 and protein:gum arabic ratio of 1:1 (w:w). The morphology of the coacervates were examined by optical microscope and environmental scanning electron microscope. In order to determine the effect of coaservates on emulsion stability, oil in water emulsions were prepared with different coacervate concentrations and stored at 4 °C for nine days. The particle size distributions and serum separations of the emulsions were examined. According to the measurement results, while the average droplet diameter of the control group without coacervate was 2401 nm, the average droplet diameter of the emulsions prepared with coacervates varied between 462 - 982 nm depending on the coacervate concentration used. In addition, serum separation percentage values of emulsions prepared with coacervates were found to be smaller than the control group which was prepared without coacervate, and the physical appearance of the coaservate incorporated emulsions were better during the storage. As a result, the potential of eggshell membrane proteins and gum arabic complex as an emulsifier has been demonstrated.

Keywords: eggshell membrane proteins, gum arabic, complex coacervation, coacervat, emulsion, emulsifier

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim süresi boyunca her türlü bilgi, deneyim ve tecrübelerinden yararlandığım ve karşılaştığım her soruna sabırla ve samimiyetle çözüm getiren tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e hem akademik hem de normal yaşamıma katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bilim alanında yollarımızın kesişmesinden mutluluk duyduğum, destek, görüş ve deneyimleriyle yüksek lisans hayatıma katkıları olan sevgili laboratuvar arkadaşlarım Berfin Ece ŞEN, Emine Merve ÇANGA, Hafize ÖZ, Nazım Sergen MISIRLI, Nurdan ERSÖZ' e her zaman moral ve motivasyon kaynağı oldukları için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresinde değerli düşüncelerini ve desteklerini benimle paylaşan başta Ar. Gör. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU ve Uz. Meltem ZENCİR olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün sayın öğretim üyeleri ve personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamda gerekli olan hammaddeyi temin ettiğim Hacettepe Üniversitesi Öğrenci Kafeteryası çalışanlarına gösterdikleri ilgiden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleri ve cesaretlendirmeleri ile her zaman yanımda olan sevgili annem Seval ERMAN, babam Senai ERMAN, abim Caner ERMAN ve eşi Aycan GERÇEKGİL ERMAN' a ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Emülsiyonlar	3
2.2. Emülsifikasyon	5
2.3.Kompleks Koaservasyon.....	9
2.3.1. Kompleks Koaservasyon Oluşum Mekanizması.....	10
2.3.2. Kompleks Koaservasyon Kullanım Alanları	12
2.3.3. Kompleks Koaservasyon Oluşumunu Etkileyen Parametreler.....	13
2.4.Yumurta Kabuğu Zarı	15
2.5.Gam Arabik	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	21
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Eldesi.....	21
3.2.2. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Miktar Tayini	22
3.2.3. Yumurta Kabuğu Zarı Protein Analizi	22
3.2.4. Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	25
3.2.5. Kompleks Koaservasyon Uygulaması	25

3.2.6. Bulanıklık Ölçümleri	26
3.2.7. Komplekslerin Optik Mikroskop ve Taramalı Elektron Mikroskobu İle Görüntülenmesi.....	26
3.2.8. Emülsifikasyon	27
3.2.9. Emülsiyon Damlacık Boyutu Ölçümü	27
3.2.10. Emülsiyonların Serum Ayrışmalarının İncelenmesi	28
3.2.11. İstatiksel Analiz	28
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Analizi	29
4.2. Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları	31
4.3. Bulanıklık Ölçüm Sonuçları.....	32
4.4. Işık Mikroskobu ve ESEM Görüntü Sonuçları	34
4.5. YKZP-GA Kompleksinin Emülsiyon Stabilitesi Üzerine Etkisi	35
5. YORUM.....	41
6. KAYNAKLAR.....	47
EKLER	58
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	58
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Y/S emülsiyon bozulmalarının şematik gösterimi.	4
Şekil 2.2. Protein-polisakkarit kompleksinin Y/S emülsiyon ortamında adsorplanmasının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.3. pH değişimiyle birlikte komplekse ait faz geçişlerinin şematik gösterimi	11
Şekil 4.1. İki farklı yöntemle ekstrakte edilen YKZP'nin SDS-PAGE jel görüntüleri. A) Asetik asit çözeltisi kullanılarak elde edilen YKZP'ye ait jel görüntüsü. Şerit 1: protein belirteci, Şerit 2: YKZP. B) Etanol/NaOH çözeltisi ile elde edilen YKZP'ye ait jel görüntüsü. Şerit 1: protein belirteci, Şerit 2: YKZP.....	30
Şekil 4.2. YZKP ve GA çözeltilerinin zeta potansiyellerinin pH'ya göre değişimi.	32
Şekil 4.3. Farklı YKZP:GA (a:a) oranlarında hazırlanan komplekslerin pH değişimine karşılık bulanıklık ölçümleri	33
Şekil 4.4. YKZP, GA ve YKZP-GA kompleksine ait optik mikroskop görüntüleri (100x objektif büyütme): A) YZKP, B) GA, C) YKZP-GA kompleksi.	34
Şekil 4.5. YKZP, GA, YKZP-GA kompleksine ait ESEM görüntüleri. A)YKZP(5000x Büyütme); B)GA(5000x Büyütme); YKZP-GA kompleksi C)1000x; D)5000x; E)8000x Büyütme	35
Şekil 4.6. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolamanın farklı günlerindeki görüntüleri. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0,25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi ve W; 0.5 g/mL PS-GA kompleksi içeren örneklerdir.	36
Şekil 4.7. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolamanın farklı günlerindeki ortalama damlacık çapları. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0,25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi ve W:G; 0.5 g/mL PS-GA kompleksi içeren örneklerdir.	38
Şekil 4.8. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolamanın farklı günlerindeki %SA (%serum ayrışması) değerleri. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0.25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi içeren örneklerdir.	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan seperasyon jel içeriği	23
Çizelge 3.2. SDS- PAGE örnek yükleme tamponu içeriği	24
Çizelge 3.3. SDS-PAGE protein belirteci yükleme tamponu içeriği	24
Çizelge 3.4. SDS-PAGE elektroforez tampon çözeltisi (5x)	24
Çizelge 3.5. SDS-PAGE jel boyama çözeltisi.....	25



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

r	karışım oranı
a/a	ağırlık/ağırlık

Kısaltmalar

Y/S	Su İçinde Yağ Emülsiyonu
S/Y	Yağ İçinde Su Emülsiyonu
YKZ	Yumurta Kabuğu Zarı
GA	Gam arabik
AA	Asetik Asit
YKZP	Yumurta Kabuğu Zarı Proteinleri
DB	Döner Buharlaştırıcı
APS	Amonyum persülfat
TEMED	Tetrametiletildiamin
SDS	Sodium dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez
KOH	Potasyum hidroksit
ESEM	Çevresel taramalı elektron mikroskobu
WHEY	Peynir Altı Suyu Proteinleri
RGD	Arginin-Glisin-Aspartik asit peptid motifi
AGP	Arabinogalacto-protein Kompleksi
mV	Milivolt
nm	Nanometre

1. GİRİŞ

Gıdalarda yapılar ve yapıları oluşturan birimler arasında emülsiyonlar önemli rol oynamaktadır. Yiyeceklere arzu edilen ağız hissi özelliklerini kazandırdıkları bilinmektedir. Buna ek olarak, çırpılmış soslar, dondurmalar ve işlenmiş peynirler gibi belirli ürünlerde yapının oluşumunda anahtar bileşenlerdir. Bu nedenle emülsiyonların oluşumunun, yapısının ve özelliklerinin anlaşılması gıdanın stabilitesinin ve tekstürünün sağlanması için önemlidir. Emülsiyonların kararlı halde olmalarını sağlamak için emülgatör içermeleri tercih edilmektedir. Bu emülgatörlerin toksik olmaması, biyouyumlu olması ve ekonomik şartlarda üretilmesi beklenmektedir. Son zamanlarda, bilimsel ve endüstriyel ilgi, biyopolimerlerden elde edilen emülsifiye edici materyaller geliştirmeye odaklanmıştır. Bu amaçla genellikle protein ve polisakkarit molekülleri üzerinde çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Genellikle sinerjik etkiye sahiptirler ve birbirlerinin fonksiyonel özelliklerini geliştirmektedirler. Protein moleküllerinin pozitif yüklere sahip olması, polisakkaritlerin ise negatif yüzey yüküne sahip olması bu polimerlerin kompleks koaservasyon metodunda kullanılması için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Kompleks koaservasyon, iki zıt yüklü polimerin elektrostatik çekimle etkileşime sokulan birleştirici bir interaksiyon yöntemidir. Kompleks koaservasyon sisteminde moleküller arası elektrostatik etkileşim sayesinde, protein ve polisakkaritlerin tek başlarına yeterli düzeyde sağlayamadığı özellikler daha kuvvetli hale getirilebilmektedir. Bundan dolayı biyopolimer etkileşimleri stabilite, doku ve yapının kontrolündeki rolleri sayesinde büyük önem taşımaktadırlar. Protein polisakkarit oranı, pH, biyopolimerlerin moleküler ağırlıkları ve iyonik kuvvetleri, protein-polisakkarit uyumluluğunu ve oluşturdıkları komplekslerin özelliklerini etkileyen ana faktörlerdir.

Bu çalışma kapsamında, doğal protein ve polisakkaritler kullanılarak kompleks koaservasyon yöntemi ile yeni bir emülsifiye edici ajan elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan proteinlerin atık olan yumurta kabuk zarlarından elde edilmesi sayesinde çevresel ve ekonomik değerlere katkı sağlamak hedeflenmiştir. Bu atıkların daha iyi yönetilmesi potansiyel gelir

kayıplarının ve ciddi çevre kirliliklerinin önüne geçilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla atık yumurta kabuklarından protein izole edilerek elde edilen proteinler tanımlanmıştır. Bir sonraki aşamada gum arabik ve yumurta proteinleri arasında kompleks koaservasyon yöntemiyle elektrostatik etkileşim sağlanarak potansiyel bir emülsifikasyon ajanı oluşturmak hedeflenmiştir. Oluşturulan koaservatların emülsifikasyon özelliklerinin tanımlanması için su içinde yağ emülsiyonları hazırlanarak, emülsiyon stabilite testleri uygulanmıştır.

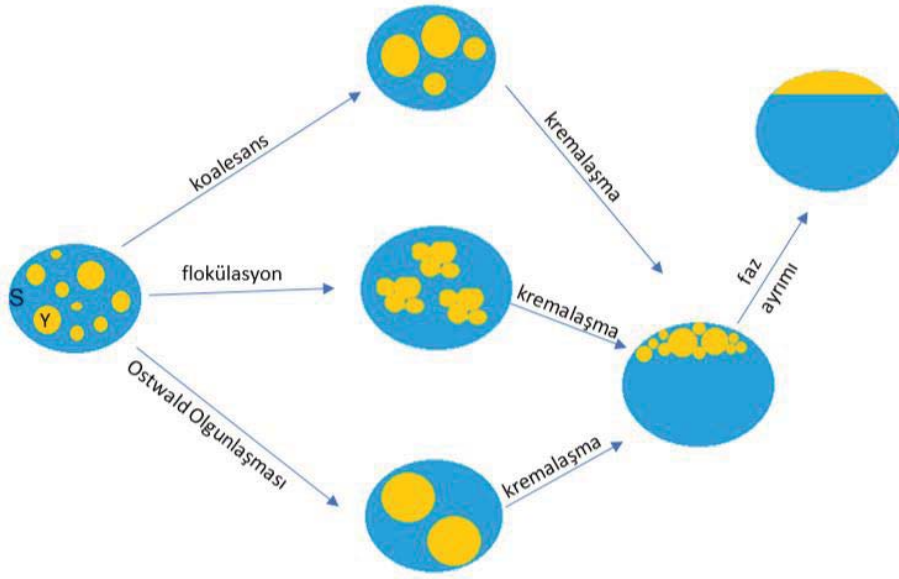


2. GENEL BİLGİLER

2.1.Emülsiyonlar

Bir emülsiyon, iki karışmayan sıvıdan (genellikle yağ ve su) oluşur ve sıvılardan biri diğerinde küçük küresel damlacıklar olarak dağılır. Dağılmış küresel damlacıklar şeklinde bulunan sıvı bileşene “dağılmış faz”, bu damlacıkların dağıldığı sıvı ise “sürekli faz” olarak tanımlanmaktadır [1]. Emülsiyonlar yağın ve suyun dağılımına göre sınıflandırılmaktadır. Sulu bir fazda dağılmış yağ damlacıklarından oluşan bir sistem, su içinde yağ (Y/S) olarak adlandırılmaktadır. Bir yağ fazında dağılmış su damlacıklarından oluşan bir sistem ise yağ içinde su (S/Y) olarak adlandırılmaktadır [2]. Aynı çözeltide Y/S ve S/Y tipindeki emülsiyonları içeren sistemler ise çoklu emülsiyon olarak adlandırılmaktadır. Bu emülsiyon tipleri genellikle enkapsülasyon, düşük yağ içerikli yiyecek üretimi, aroma salınımının kontrol edilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır [3]. Ayrıca emülsiyonlar sürekli faz akışındaki damlacıkların boyutlarına göre de kategorize edilmektedir. Emülsiyon içerisindeki dağılmış damlacıkları 0.1 μm 'den büyükse genellikle makro emülsiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu emülsiyon kategorisi genellikle termodinamik olarak kararsızdır. Bu sistemlerde emülsiyona katılan iki faz, zaman içerisinde ara yüzeylerindeki azalma nedeniyle birleşme veya ayrılma eğilimindedir [4, 5]. Makro emülsiyonların aksine, mikro emülsiyon olarak adlandırılan ikinci bir emülsiyon grubu bulunmaktadır. Mikro emülsiyonlardaki damlacıkların boyutu genellikle 0,1 μm 'den küçüktür ve termodinamik olarak daha kararlı karışımlar olarak kabul edilmektedirler [6].

Biri dispers faz diğeri sürekli faz olan iki sıvıdan elde edilen emülsiyonların stabilitesi genellikle geçici olmaktadır [7]. Emülsiyonlar, genellikle kremalaşma, flokülasyon, agregasyon, koalesans, faz ayrılması ve Ostwald olgunlaşmasının (Şekil 2.1) yanı sıra çeşitli kimyasal ve biyolojik etkilerle iki fazlı durumlarına geri dönme eğilimindedir [8, 9].



Şekil 2.1. Y/S emülsiyon bozulmalarının şematik gösterimi.

Emülsiyonları oluşturmak için belirli bir enerjiye ve kararlı kalmaları için belirli özelliklere ihtiyaç duyulmaktadır [10]. Oluşturulan emülsiyonların özellikleri termodinamik koşullara, hazırlama yöntemlerine, bileşenlerin fizikokimyasal özelliklerine ve bileşen ekleme sırası gibi etkenlere bağlıdır [11]. Başarılı bir emülsiyon tasarımı, dağılmış fazın yüzeyi üzerine adsorbe edilecek, daha fazla damlacık bozulmasına ve damlacıkların yeniden birleşmesini veya kümelenmesini engelleyecek uygun emülgatör kullanımı ile sağlanmaktadır [2]. Bu katkıların yağ/su ara yüzüne adsorplanması ile yüzey gerilimi düşürülerek sistemin stabilizasyonu sağlanmaktadır [12].

Emülsiyon hazırlanırken mekanik enerji oluşturmak gerekmektedir. Çoğu zaman damlalar yoğun çalkalama, homojenizasyon, hızlı karıştırma gibi yöntemlerle oluşturulmaktadır. Kararlı bir emülsiyon için damlacık boyutunun yeterince küçük olması önemlidir. Damlacık boyutu ne kadar küçükse, emülsiyon o kadar kararlı olmaktadır[13]. Bir homojenleştirici küçük damlacıklar üretebilse bile, emülgatör molekülleri, damlacıkların çevresinde komşularıyla birleşmelerini önleyen koruyucu bir ara yüzey tabakası oluşturmaya yetecek kadar hızlı adsorbe olmalıdır. Sonuç olarak, sistemde bir emülgatör ne kadar hızlı adsorbe edilirse ve

sistemin ara yüzey geriliminde ne kadar azalma olursa, belirli bir homojenleştirici enerji girdisinde üretilebilen damlacıklar o kadar küçük olmaktadır [2].

2.2. Emülsifikasyon

Çoğu gıda maddesi ve ürünü tamamen veya kısmen emülsiyon formda bulunur. Örneğin içecekler, tereyağı, tatlılar, margarinler, kek hamuru, soslar, çorbalar vb. Gıdalarda emülsiyonlar genellikle su içinde yağ emülsiyonları (Y/S) kategorisine aittir [14]. Su içinde yağ emülsiyonları, yağ damlacığını bir sulu ortam içinde sürekli dağıtarak hazırlanmaktadır. Bu emülsiyonlar uzun süre stabilite sağlanması için çoğu zaman bir emülgatör içermektedirler [15].

Emülgatörler, sürekli ve dağınık fazın karıştırılması sırasında eklenir ve damlacıkların ara yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluştururlar [2]. Damlacıkların gelişmiş stabilitesi için emülgatörlerin birkaç temel özellik göstermesi gerekmektedir. Emülgatörler, homojenizasyon sırasında hızlı adsorpsiyon oranına sahip olmalıdırlar, böylece yeni oluşan damlacıklar yağ/su arayüzünde hızla adsorbe edilirler. Arayüzdeki yüzey gerilimini azaltma kabiliyetine sahip olmalıdırlar. Damlacıklar arasındaki sterik veya elektrostatik etkileşimlerle emülsiyonu stabilize etmek için koruyucu bir tabaka oluşturmalarıdır. Ayrıca iyonik güç, pH ve sıcaklıktaki değişimler gibi çevresel streslere de dayanabilmelidirler. Sürekli fazda çözünürlüğüne göre bir yüzey aktif madde seçilmelidir. Bu nedenle, suda yağ emülsiyonu için, yüzey aktif maddenin suda çözünür olması gerekmektedir. Yağ ve su fazıyla uyumluluğu göz önünde bulundurularak doğru emülgatörün seçilmesi çok önemlidir [4, 16, 17]. Konformasyon, esneklik, yüzey hidrofobikliği, molar kütle gibi moleküler özellikler, emülsifiye edici özellikteki biyopolimerlerin emülsiyon oluşumu sırasındaki ara yüzey gerilimini düşürme kabiliyetini yönetmektedir [13]. Bu bileşenler emülsiyona eklendiklerinde, amfililik yapıları nedeniyle su ve yağın ara yüzeyine doğru hareket etmekte ve dağılmalarını engellemektedirler. Hidrofobik kısımlarında daha uzun hidrokarbon zinciri bulundurmaları sayesinde amfililik moleküller, elde edilen emülsiyonlara daha düşük ara yüzey gerilimleri kazandırmış olmaktadır [5]. Bu bağlamda, iyi bir emülsifiye edici ajanın polar

ve apolar gruplar arasında bir denge sağlaması gerekmektedir [18]. Emülgatör çok yavaş adsorbe olduğunda veya çok düşük bir konsantrasyonda bulunduğunda, oluşan damlacıkların çoğu nihai emülsiyonda tutulamaz. Bunun sonucunda topaklanma, birleşme gibi emülsiyon bozulma sorunları ortaya çıkmaktadır. Yüksek emülgatör/yağ oranlarında homojenize edilen sistemlerde ise, üretilen damlacıklar topaklaşmaz ve ortalama damlacık boyutu, emülgatör konsantrasyonundan fazla etkilenmemektedir [19].

Yenilebilir bileşenlerden yapılan gıda sınıfı emülsiyonlar, inorganik malzemelerden yapılmış emülsiyon sistemlerinden çok daha güvenilirdir [20]. Son zamanlarda protein- polisakkarit kompleksleri benzersiz karakteristiklerinden dolayı dikkat çekmektedir. Biyopolimer kompleksinin bu işlevselliği, proteinlerin emülfisiye edici özellikleri ve polisakkaritlerin polimerizasyon ve kalınlaşma özellikleri ile elde edilmektedir [21]. Son zamanlarda, yeni kaynaklardan gelen protein hidrolizatları, diyet, beslenme ve tıbbi özellikler gibi fonksiyonel değerleri açısından değerlendirilmektedir. Protein çözünürlüğü, çeşitli gıda uygulamaları için yararlı olan önemli bir fonksiyonel özelliktir. Aynı zamanda, genel gıda kalitesini daha da etkileyen köpürtme ve emülsiyonlaştırma gibi diğer fonksiyonel özellikleri etkilediği de bilinmektedir. Ek olarak, protein hidrolizatları ve peptitleri vücutta kolayca emilir ve daha yüksek besin değeri ve biyoaktif özelliklere sahiptir ve bu da onları potansiyel gıda bileşenleri kaynakları haline getirmektedir [22, 23].

Proteinler ve polisakkaritler, gıda ürünlerinin stabilitesine, dokusuna ve raf ömrüne katkıda bulunmaktadırlar [24, 25]. Terminolojik olarak dağılmış parçacıkların çökmesini geciktiren katkı maddeleri yağ damlacıklarının veya köpüklerin kayma oranlarını azaltan maddeler, dağılmış katı veya sıvı parçacıkların toplanmasını veya ayrışmasını önleyen dağıtıcılar, jelleşmiş sistemlerde sineresisi önleyen stabilizatörler, ya da gıda maddelerini stabilize edenler, yağ damlacıklarının birleşmesini geciktiren emülsiyonlaştırıcılar veya stabilizatör olarak adlandırılmaktadırlar [26]. Genellikle bu tür gıdaların nihai gıda ürünündeki rolünü tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadırlar. Sistemde

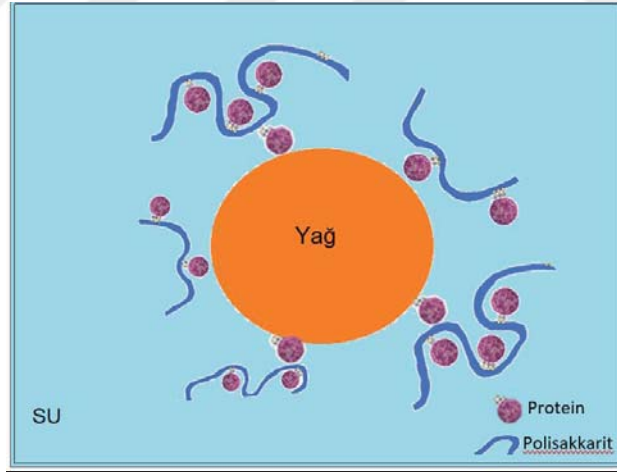
homojen yapı ve doku sağlayan, tortu oluşumunu veya serbest yağ ile sulu serumun ayrılmasını önlemede sorumlu olan moleküllerdir. Emülsiyon oluşumunu destekleme kapasitesine sahip olan ve ara yüzeye etkileriyle stabilite sağlayan bir veya daha fazla komponentlerden oluşmaktadırlar [27].

Biyopolimerler (proteinler ve polisakkaritler), reolojiyi ve proses koşullarını belirleyen temel fonksiyonel bileşenlerdir [28]. Biyolojik bozunabilirlikleri, yüksek besinsel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı çokça tercih edilmektedirler [29]. Bu fonksiyonellik genellikle sulu ortamda agregasyon ve jelleşmenin meydana getirdiği reolojik kontrolü içermektedir. Yüzey aktif özellikte olan proteinler etkili emülsifiye edici ajanlar olarak işlev görebilir ve çoğunlukla polielektrolit özellikte olduklarından elektrostatik ve sterik mekanizmaların bir kombinasyonu ile emülsiyon damlacıklarına koloidal stabilite verebilmektedirler [30]. Amfilik özellikte olmaları sayesinde yağ-su ara yüzeyinde güçlü bir şekilde adsorbe olurlar. Yağ-su arayüzeyinde adsorbe edilen miktar ve konformasyon, proteinin aminoasit bileşimine büyük ölçüde bağlıdır çünkü adsorpsiyon, yapılarında bulunan hidrofobik gruplar aracılığıyla gerçekleşmektedir [31]. Adsorbe edilmiş protein molekülleri, elektrostatik ve/veya sterik kuvvetler yoluyla damlacıklar arasında fiziksel bir bariyer oluşturarak bir araya toplanmalarını önleyerek emülsiyonu stabil halde tutmaktadır [19, 32]. Proteinler, gıdalarda önemli bir emülsifiye edici olma grubunda olmaları, yağ damlacıklarının birleşimlerini önlemeleri ve emülsiyon oluşumunu kolaylaştıran yağ-su ara yüzey gerilimini azaltmaları özellikleriyle gıda endüstrisinde geniş bir aralıkta kullanılmaktadır [33]. Polisakkaritler, emülsiyonlarda genellikle kıvam artırıcı ve su tutucu maddeler olarak kullanılmaktadır [34]. Ayrıca arzu edilen tekstür, ağız hissi yaratmak ve emülsiyon damlacıklarını yerçekimsel ayrılmaya karşı stabilize etmek için Y/S emülsiyonlarına sıklıkla eklenmektedir [35]. Uzun dönemli stabilite, sürekli fazın reolojisi ve ağ yapısı kontrolü polisakkaritler kullanılarak daha da artırılabilir [30].

Her ikisi de sürekli bir fazda bulunan protein ve polisakkaridin emülsiyon stabilitesi üzerindeki etkisi, protein - polisakkarit sistemlerinin koloidal

özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler, yalnızca protein ve polisakkaridin bireysel işlevselliği ile değil, aynı zamanda aralarındaki etkileşimlerin doğası ve gücü ile de ilgilidir [35]. Önceki çalışmalar polisakkaritlerin yapısal özelliklerinin ve moleküler boyutunun, proteinler ile toplu veya arayüzlerde geliştirilen etkileşimler üzerindeki etkisini göstermektedir. Doğal polisakkaritlerin soy proteinlerinin jelleşmesi üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, faz ayrıştırması işleminin kapsamı ve sonuçta ortaya çıkan etkilerin büyüklüğünün, her iki biyopolimerin konsantrasyonuna ve polisakkaritlerin moleküler ağırlığına bağlı olduğu açıkça görülmektedir [36].

Emülgatörler, yukarıda anlatıldığı gibi arayüzey gerilimini düşürerek etki etmektedirler. Protein- polisakkarit komplekslerinin emülgatör olarak kullanılması yaygın olarak çalışılan bir yöntemdir [37]. Negatif yüklü polisakkaritlerin, pozitif yüklü proteinler ile etkileşimleri sayesinde oluşan komplekslerin emülsifiye edici özellik kazandıkları gösterilmektedir (Şekil2.2) [21].



Şekil 2.2. Protein-polisakkarit kompleksinin Y/S emülsiyon ortamında adsorplanmasının şematik gösterimi

Protein ve polisakkaritlerin emülsifikasyon özelliklerini incelemek amacıyla peynir altı suyu proteinleri(whey) ve keten tohumu gamı[38], jelatin ve kitosan [15], β -lactoglobulin ve angum gam [21], whey-ksantan-keçiyoynuzu gamı [39], whey-pectin [40], whey-karregenan [41], whey- gam arabik [42], ovatransferrin-

gam arabik [43], whey-karboksimetilselülöz [44], whey-kitosan [35], yumurta beyazı-pektin/guar gam [34], soya proteinleri ve pektin [45] kompleksleri oluşturulmuş ve incelenmiştir.

2.3.Kompleks Koaservasyon

Koaservasyon, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından bir koloidal sistemin iki sıvı faza ayrılması olarak tanımlanmaktadır [46]. Koaservasyon içerdiği polimer sayısına bağlı olarak basit ve kompleks koaservasyon olarak iki çeşitte sınıflandırılmaktadır [47]. Basit koaservasyonda sadece bir polimer yer almakta ve tuz veya alkol ilavesiyle üretilmektedir [48]. Kompleks koaservasyon iki veya daha fazla zıt yüklü makromoleküllerin elektrostatik etkileşimi yoluyla elde edilmektedir [49].

Koaservasyon genellikle zayıf çözücü afinitesine sahip homojen bir polielektrolit çözeltisinden süper yoğun bir sıvı fazın spontan oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Tipik olarak, homojen bir çözelti fazı, koaservasyon geçişi sırasında polimer açısından zengin bir faza (koaservat) ve bunun süpernatantına ayrılmaktadır [50]. Koaservat kompleksleri tipik olarak, sulu ortamda zıt yüklü biyopolimerlerin karıştırılması sırasında uygun moleküller arası elektrostatik, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler kurulduğunda oluşmaktadır [51]. Koaservatlar sulu bir çözeltide birleştirilen kolloidler, protein, polisakkarit, yüzey aktif maddeler gibi zıt yüklü maddelerden oluşmaktadır [52]. Kompleks koaservasyonun, zıt yüklerin sürücü gücüyle birleşen makromoleküllerin oluşturduğu bir sıvı-sıvı faz ayrımı olduğu görülmektedir. Bu nedenle birleştirici faz ayrılması olarak da tanımlanmaktadır [53]. Koaservatlar veya polisakkarit - protein konjugatları endüstri için caziptir çünkü bunlar yaygın olarak kullanılan bileşenlerden elde edilen doğal ürünlerdir, bu nedenle ucuzdur ve yasal onaylaması kolaydır [54]. Bu çevre dostu yaklaşım dışarıdan ekstra bir enerjiye ihtiyaç kalmadan sulu ortamda gerçekleşmektedir [55].

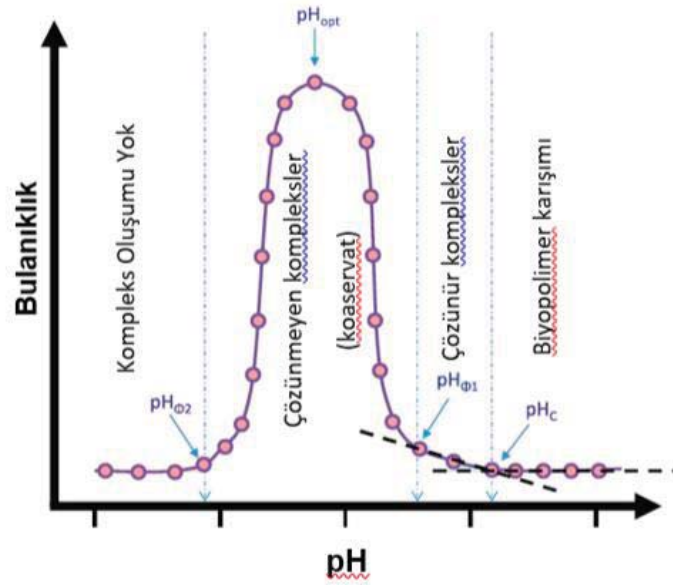
2.3.1. Kompleks Koaservasyon Oluşum Mekanizması

Kompleks koaservasyon, iki ya da daha fazla zıt yüklü polimer solüsyonları arasındaki elektrostatik etkileşimle meydana gelmekte ve iki karışmaz sıvı faz ile sonuçlanmaktadır: biri polimer bakımından zayıf sürekli fazdır; diğeri, çeşitli aktif çekirdek bileşenlerini kaplamak için kullanılan, koaservat fazı olarak da adlandırılan polimer açısından zengin yoğun fazdır. Normal olarak, kompleks koaservasyon ile üretilen koaservatlar, kendi oluşturucu polimerlerinin her birine kıyasla gelişmiş fonksiyonel özelliklere sahiptir [54]. Örneğin, bir polisakkarit-protein etkileşimiyle su/yağ veya hava/su ara yüzeylerinde bir film oluşturarak emülsiyon için en iyi stabilite sağlanmaktadır [2, 56].

Protein ve polisakkaritler karıştırıldıkları zaman üç farklı senaryo meydana gelebilmektedir. Birincisi ayrıştırıcı faz ayrılması; bileşenler birbirlerini iterler ve biri polisakkarit bakımından zengin ve protein bakımından fakir, biri protein açısından zengin ve polisakkarit bakımından zayıf olan iki faz ortaya çıkmaktadır. İkincisi birlikte çözünürlük; bileşenler iyice karışır ve çözelti kararlıdır. Üçüncüsü birleştirici faz ayrılması veya kompleks koaservasyon; protein ve polisakkarit birbirini çekmekte ve konsantre bir protein / polisakkarit fazı ve seyreltik bir faz oluşmaktadır [57]. Polisakkarit üzerindeki yük yoğunluğuna bağlı olarak bir koaservat veya çökelti yapısı oluşabilir. Koaservat, proteinler ve zayıf yüklü polielektrolitlerin karışımından oluşan, sıvı fazda geri dönüştürülebilir bir yapıdır [58].

Farklı pH değerlerinde kompleks oluşumunun geçiş aşamaları Şekil 2.3'de gösterilmektedir. Yüksek pH değerlerinde birlikte çözünür biyopolimer karışımı bulunmaktadır. Bu aşamada herhangi bir kompleks oluşmaz. Her iki biyopolimer negatif yüklüdür ve elektrostatik itme bir araya gelmelerini engellemektedir. Bu nokta pH_c olarak adlandırılmaktadır ve bu nokta eğimde meydana gelen ilk değişimi göstermektedir [28, 59]. Bu noktada çözelti şeffaf renktedir [60]. pH azaldıkça, çözeltinin renginde bulanıklıklar meydana gelmektedir. Bulanıklıkta büyük değişimin başladığı nokta pH_{ϕ_1} ile ifade edilmektedir. Bu noktada çözünebilir komplekslerin oluşumu başlamaktadır [61, 62]. Bu bölgede protein ve

polisakkaritler koaservat üretebilmek için yeterince güçlü iyonik yükler barındırmamaktadır [58]. Koaservasyon tipik olarak, biyopolimerler üzerindeki yüklerin elektriksel eş değer konsantrasyonlara ulaştığı ve kompleksin elektriksel olarak nötr hale geldiği bir nokta ile devam etmektedir. Bu nokta pH_{opt} olarak ifade edilmektedir [58, 60]. Pozitif yüklü protein molekülleri ile negatif yüklü polisakkaritler arasında elektrostatik çekim ile meydana gelen çözünmez komplekslerin oluşumu, sistemde bulanıklık oluşumuyla tespit edilmektedir [28]. pH_{opt} noktasında sistem maksimum optik yoğunluk göstermektedir [63]. Daha yüksek asidik koşullarda, koaservat yapıları ayrışarak çözülmüş biyopolimerlere parçalanmaktadır [59]. Bulanıklığın meydana gelmediği ve çözeltinin şeffaflaşan bir görünüm almaya başladığı bu nokta ise $pH_{\phi 2}$ olarak ifade edilmektedir [60].



Şekil 2.3. pH değişimiyle birlikte komplekse ait faz geçişlerinin şematik gösterimi

Kompleks üretiminde, elektrostatik etkileşimle beraber, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi diğer etkileşimlerde meydana gelebilmekte ve bu da kompleksleri daha kararlı hale getirmektedir[64].

Biyopolimerler ve koaservatları ile yeni fonksiyonlara sahip özel mikroyapılar oluşturulabildiği için özellikle gıda, tıp, eczacılık ve kozmetik alanlarında

kullanılmaktadır [65]. Proteinler ve polisakkaritler jelleşme, koyulaştırma, emülsifiye etme özellikleri ve arayüz stabilitesi gibi benzersiz özelliklerinden dolayı çoğu gıdanın dokusunda ve yapısında çok önemli rol oynamaktadır [66]. Artan sağlıklı beslenme ihtiyacı ve çevresel kaygılar, biyopolimerlerin mükemmel bozunabilirliği, biyouyumluluğu ve toksik olmaması bu konudaki çalışmaların artmasını sağlamıştır. Bu biyopolimer kompleksleri aktif maddelerin biyoyararlanımını ve emilimini artırmasının yanında gıdanın kalitesini ve beslenme özelliklerini de artırmaktadırlar. Su içerisinde yüklenebilmeleri, pahalı olmamaları ve kolay elde edilebilir olmaları bu biyopolimerlerin diğer avantajlarından. Koeservasyon yönteminde, protein ve polisakkaritler gıda endüstrisinde en geniş kullanılan hidrokolloidlerdendir [40, 67]. Protein ve polisakkarit kompleks koaservasyon etkileşimi sayesinde kimyasal ve enzimatik modifikasyon olmadan, bileşenlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirilebilmektedir [68]. Polisakkaritlerin yiyecek veya içecek ürünlerine eklenmesi, sürekli fazın vizkozitesini artırabilir ve proteinlerin topaklanmasını ve çökmesini önlemeye yardımcı olan polimerik bir ağ oluşturabilmektedir. Asitlendirilmiş koşullar altında, negatif yüklü polisakkaritler ve pozitif yüklü protein parçacıkları tarafından oluşturulan komplekslerin elektrostatik itilmesi ve sterik engeli proteinlerin stabilitesine katkıda bulunmaktadır [69].

2.3.2. Kompleks Koaservasyon Kullanım Alanları

Kompleks koaservasyon doğada farklı yerlerde gerçekleşmektedir. Örneğin; hücresel düzeyde DNA'mız, pozitif yüklü histon proteinleriyle kompleks koaservat oluşturarak kromatin liflerine katlanan aglomeratlar gibi bir yapı oluşturmaktadır [70]. Yumurta beyazı lizozimleriyle stabilize edilmiş emülsiyon ve tükürük proteinleri arasındaki kompleks oluşumun, yağ damlacıklarının oral topaklanmasına doğrudan bağlı olduğu ve dolayısıyla vizkozitedeki değişikliklerden dolayı duyuşsal tepkiyi tetiklediği gösterilmektedir [71].

Gıda endüstrisinde bakılacak olursa örneğin, yoğurtlu içecekler ve meyveli süt içecekleri metil esterlenmiş pektinler ile stabilize edilmektedir. Stabilizasyon olmadan, bu tür içeceklerde düşük pH, kazeinin flokülasyonuna ve peynir altı

suyu oluşumuna neden olmaktadır. Pektinler kısmen negatif yüklüdür ve düşük pH değerlerinde kazein miselleri üzerindeki pozitif yüklerle kompleks koaservat benzeri agregatlar oluşturmaktadır. Böylece kazeinin asidik pH' ta stabilizasyonu sağlanarak flokülasyon önlenmektedir [72, 73]. Yenilebilir bileşenlerden yapılan kompleks koaservat damlacıkları ise yağlı atıştırmalıklardaki yağ küreciklerinin yerini alarak fazla kilo alınımını azaltmaktadır [71, 74]. Zıt yüklü biyopolimer kompleksleri, birçok yüzey için çok yönlü kendi kendini iyileştiren kaplamalar sağlamaktadır [75]. Gıda bileşenlerin mikroenkapsülasyonu, köpük stabilizasyonu, enzim immobilizasyonu ve geri kazanımı, emülsifikasyon, protein saflaştırma gibi işlemler kompleks koaservasyonun diğer kullanıldığı alanlardır [68]. Kompleks koaservasyon, ambalaj filmlerinin oluşturulması, jel üretimi, yenilebilir filmler ve vizkozite ayarlaması için kullanılmaktadır [76, 77]. Kompleks koaservasyon genellikle tat bileşikleri, pigmentler ve balık yağı gibi sıcaklık hassasiyeti olan bileşiklerin kapsüllemesinde kullanılmaktadır çünkü bu işlem sırasında herhangi bir ısı işlem söz konusu değildir [78].

2.3.3. Kompleks Koaservasyon Oluşumunu Etkileyen Parametreler

Koaservasyon işlemi, proteinlerin ve polisakkaritlerin yapısı, bu biyopolimerlerin moleküler ağırlığı, yük yoğunluğu, konformasyonu, karışımdaki oranları, toplam katı miktarı, pH, sıcaklık gibi birçok parametreye oldukça duyarlıdır [79, 80]. Optimum koşulları elde etmek için tüm bu parametreler ayrı ayrı optimize edilmektedir [81]. Kompleks koaservasyon esas olarak sulu bir sistemin pH ve iyonik kuvvetinden etkilenen biyopolimerlerin yük yoğunluğu ile kontrol edilmektedir [47].

Bir çözeltinin pH değeri, çözeltideki biyopolimerlerin fonksiyonel gruplarının iyonlaştırılması üzerindeki etkisi nedeniyle kompleks oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [58]. pH, biyopolimerler tarafından taşınan fonksiyonel yan gruplarının iyonlaşma derecesini etkilediği için protein-polisakkarit komplekslerinin oluşumunda anahtar rol oynamaktadır[73]. Genellikle koaservat üretimi, proteinlerin pI noktası ile polisakkaritlerin pKa noktası arasında meydana gelmektedir [64]. Koaservasyon işlemi biyopolimerler net olarak zıt yükler

taşıdıklarında meydana gelmekte ve bu noktanın polisakkaritlerin pKa değerlerinin üzerinde ve proteinlerin izoelektronik noktalarının altında olması gerekmektedir [29]. Zıt yüklü biyopolimerler arasındaki etkileşim, biyopolimerlerin net zıt yükleri arttığında artmaktadır. Protein ve polisakkaritler, çok sayıda iyonize edilebilir ve fonksiyonel yan zincir gruplarına sahiptir [73]. Belirli bir pH ve iyonik güçte, şekil, boyut, konformasyon, esneklik ve net yük bakımından farklılık göstermektedirler. Bir biyopolimer boyunca yük yoğunluğu, koaservasyon sırasında elektrostatik etkileşimler üzerinde büyük bir etkiye sahip olan birim uzunluk başına reaktif alanlarının sayısı ile ilgilidir [82, 83]. Proteinler için bu pH'a oldukça bağlıdır. $pH > pI$ 'de proteinin net bir negatif yükü varken, $pH < pI$ 'de net bir pozitif yükü vardır. [84]

Yük yoğunluğu, oluşturulacak yapının tipinde de rol oynayabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, çok düşük yük yoğunluklarında, koaservasyonun meydana gelmediği, çok yüksek yük yoğunluklarında ise komplekslerde çökme olduğu gözlemlenmektedir [85]. Yüksek iyonik güçte, proteinlerin ve polisakkaritlerin yüklerinin elektrostatik etkileşimleri azaltarak kompleks oluşumunu etkilediği görülmektedir [86]. Düşük iyon kuvvetinde iyon konsantrasyonunun protein-polisakkarit kompleksleri üzerinde sadece küçük bir etkisi vardır. Genellikle proteinlerin ve polisakkaritlerin üzerinde bulunan yüklerin sayısı, elektrostatik etkileşimin gerçekleşmesi için yeterli olmaktadır [73].

Polisakkaritler, dallanma dereceleri bakımından farklılık göstererek sterik engel oluşturabilmektedir. Bu da protein ve polisakkaritler üzerindeki reaktif bölgeler arasındaki fiziksel olarak meydana gelebilecek etkileşimleri engelleyebilmektedir. Ayrıca, esnek proteinler (örn. jelatin, kazein), küresel proteinlere kıyasla polisakkaritlere güçlü bir biçimde bağlanabilmektedir. Bu proteinler koaservasyon sırasında polisakkarit üzerinde reaktif bölgelerle birleşmek için daha elverişli bir konformasyona sahiptir [87].

Yapılan çalışmalar, protein ve polisakkarit karıştırma oranının (r), ortaya çıkan komplekslerin özellikleri, yani komplekslerin büyüklüğü, bileşimi ve çözeltideki

vizkositesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Biyopolimerlerin oranı ve konsantrasyonu elektrostatik etkileşimlerin yoğunluğunu etkiler [51]. Karışımdaki protein ve polisakkarit oranı, komplekslerin yük dengesini ve dolayısıyla komplekslerin davranışını etkileyecektir. Bir karışımda, uygun koşullar sağlandığında (iyonik kuvvet ve pH), belirli bir protein:polisakkarit oranında maksimum kompleksleşme elde edilir. Karışımdaki bileşenlerden biri fazla olduğunda, nötralize edilmemiş yüklerin varlığı nedeniyle çözünür kompleksler elde edilebilir [86]. Kompleksler için, düşük r oranlarında karıştırmak, daha geniş pH aralığında yüklü kalan daha küçük komplekslerin oluşumuyla da sonuçlanmaktadır. Öte taraftan, yüksek protein içeriğinde, büyük miktarda fazla protein formu içeren komplekslerde, örneğin bir β -lactoglobulin ve pektin sisteminde gösterilmiştir ki protein miktarının artırılması, daha yüksek elastik kabiliyete sahip koaservatların oluşumuyla sonuçlanmaktadır [88]. Yüksek biyopolimer konsantrasyonlarında, sistem, makromoleküller arasındaki rekabet nedeniyle faz ayrımı gösterebilmektedir [73].

Kompleks koaservasyon işlemi sırasında sıcaklık çok yüksek derecelere çıkarıldığında proteinlerin sıcaklığa hassasiyetinden dolayı kompleksleşme üzerinde genellikle ters bir etkiye neden olabileceği gösterilmektedir [89]. Çevresel koşullardaki değişiklikler, protein ile çözücü veya polisakkarit ile çözücü etkileşimlerinde, protein ve polisakkaritlerde konformasyonel değişimlere neden olabilmektedir [90]. Sıcaklıktaki artış, hidrofobik etkileşimleri ve kovalent bağlanmayı geliştirirken, düşük sıcaklık, hidrojen bağları oluşumuna elverişlidir. Yapılan bir çalışmada ise yüksek sıcaklıkta, globüler protein denatürasyonu ve polisakkaritin konformasyonel değişiklikleri, daha reaktif alanların açığa çıkmasına neden olduğu ve bu sayede biyopolimerlerin fonksiyonel yan grupları arasındaki kompleks oluşturma etkileşimlerinin desteklendiği belirtilmiştir [73].

2.4.Yumurta Kabuğu Zarı

Yumurta kabuğu, kalsiyum fosfat ve yumurta kabuğu zarından oluşan sert bir kabuktur [91]. Yumurta kabuğu zarı (YKZ), yumurta akı ile yumurta kabuğunun iç yüzeyi arasında bulunan açık pembe renkte çift katmanlı ağ örgüsüdür. Bu yapı,

iç (albümin ile temas halinde) ve dış katmanları içeren yüksek oranda kolajenleşmiş lifli bir zardır [92]. YKZ lifleri, patajonik bakterilerin girişini önlemek için bir platform oluşturan yumurta kabuğunun temel unsurlarıdır. YKZ, yumurta kabuğunun biyomineralizasyonu için bir destek işlevi görmektedir [93, 94]. Çift katmanlı YKZ' nin ortalama kalınlığı 70 µm'dir [95]. Bu yapıda, yaklaşık olarak %70 organik materyal, %10 inorganik materyal ve %20 oranında su bulunmaktadır [96]. YKZ yaklaşık %60 oranında protein içermektedir [97].

YKZ, kalsiyum karbonatla kaplı, kollejanöz bir organik matrise sahip doğal olarak oluşan yarı geçirgen bir yapı iskelesidir[95]. YKZ' deki her lif, kalsiyum karbonatın kristalizasyonu için bir şablon görevi gören, glikoprotein açısından zengin bir kabuk ile kapsüllenmiş kolajence zengin bir çekirdekten oluşmaktadır [94]. YKZ, Ca, Mg, Si, Zn gibi organik bileşenlerle birlikte yaklaşık %60 protein içerir. YKZ, kolajen (tip I, V ve X), glukozamin ve lizin türevi çapraz bağlara sahip glikoproteinler gibi çok sayıda protein bulundurmaktadır. Ayrıca hyalüronik asit bileşenini ve kondroitin sülfat gibi polisakkaritleri de yapısında bulundurur [23, 97]. Yumurta kabuğu zarları, genellikle gastrik proteazlara dirençli olan kollajen ve keratinlerden oluşan lifli yapısal proteinlerdir. Bununla birlikte, bu zarlarda bulunan lizozim, ovotransferrin, ovalbümin, globulinler, ovomukinler ve defensinler gibi antimikrobiyal, antioksidan ve immün modülatör özelliklere sahip çok sayıda başka protein ve peptit de bulunmaktadır [98]. Prolin, glutamik asit ve glisin, zarda içeriği %10 dan fazla olan en bol aminoasitler olarak bildirilmektedir [99]. Ayrıca sistein ve hidroksilizin varlığı da tespit edilmiştir [100]. Nispeten yüksek sistein içeriği ve disülfid bağları YKZ'nin suda çözünürlüğünü sınırlandırmaktadır [101]. YKZ içerisinde arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptit motifi de bulunmaktadır. RGD peptitleri yüzey üzerine imbolize olduklarında hücre adhezyonunu sağlamaktadırlar. RGD, patojen transferi riskini en aza indirir [95]. Daha önce belirtildiği gibi, her YKZ, kolajen açısından zengin bir çekirdek ve glikoprotein açısından zengin bir kaplamadan oluşmaktadır [94]. Kolajen biyoyoumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği ile bilinir ve doku rejenerasyonu için destek sisteminin geliştirilmesi de dahil olmak üzere çok sayıda tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [102].

YKZ birçok mühendislik, tarım ve biyomedikal uygulamalar için kullanılmaktadır. Osteoartrit, dünya çapında milyonlarca yetişkini etkilemektedir [103]. Patentli bir ESM ürünü, doğal yumurta kabuğu membranı (NEM®), sağlıklı eklem ve bağ dokularını korumak için takviye edici bir ürün sunmaktadır[95]. Doğal bir kolajen, kondroitin ve hiyalüronik asit kaynağı olarak YKZ, özellikle bağ dokusu onarımı için doku mühendisliği uygulamalarında potansiyel kullanımı olan bir biyomateriyaldir [104]. YKZ'nin su tutma ve antibakteriyel aktiviteye katkısı da araştırmacılar tarafından gösterilmektedir [105]. Son zamanlarda, besin takviyesi olarak kullanılan yumurta kabuğu zarlarının, büyüme sonrası civcivlerde büyümeyi desteklediği gösterilmektedir [98, 106, 107]. Ağır metallerin adsorpsiyonu, hücre kültürü için substrat, enzim immobilizasyonu için platform gibi uygulama alanları da bulunmaktadır [108]. Modifiye edilmiş YKZ, glikoz sensörü geliştirilmesinde kullanılmaktadır [109]. Enzimatik hidralizasyonla izole edilen YKZ proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini inceleyen bir çalışma, bu proteinlerin emülsifikasyon ve su tutma kapasitesi özelliklerine sahip olduğu gösterilmektedir [23]. YKZ proteinleri ve muzlardan elde edilmiş dirençli nişastanın kullanıldığı bir çalışmada ise, YKZ proteinlerinin tek başına ve nişasta ile birlikte olan karışımının emülsiyon üzerindeki etkisi incelenmiştir [110]. Bu çalışma sonucunda hazırlanan emülsiyonlarda nişasta ile birleştirilen YKZ proteinlerinin, tek başına YKZ kullanımına göre stabiliteyi daha iyi koruduğu gösterilmektedir. Oluşturulan karışımın emülsiyonlaştırma kapasitelerinin yüksek ve lipid oksidasyonunu geciktirmede etkili olduğu gösterilmektedir.

YKZ birçok alanda farklı amaçlarla kullanılmaya başlanmış olmakla birlikte, çalışmaların çoğu, atık yumurtalardan toplanan membranları kullanmaktadır. Günümüzde halen, yumurta kabuğu ve YKZ ucuz ve bol miktarda bulunabilen atık malzemelerdir. Çeşitli işlemler sonucu ortaya çıkan yumurta kabuğu kalıntısı işe yaramaz sayılmakta ve herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan atılmaktadır [111]. Bu atıklar potansiyel gelir kaybına, ciddi çevre kirliliğine ve tehlikelere yol açmaktadır [23]. Yumurta kabukları, biyolojik atıklar içerisinde en kolay bulunan malzemelerden biri olarak kabul edilmekte ve bazı kimyasal veya fiziksel işlemlerle kolaylıkla YKZ elde edilebilmektedir [108]. Bu bağlamda, YKZ' nin gözenekli yapısı, kolayca temin edilebilmesi, biyoyumlu, kontaminant

içermemesi, çevreye zarar vermemesi ve kolayca işlevselleştirilebilmesi sayesinde gıdalarda kullanım potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir [95].

2.5.Gam Arabik

Akasya zamkı (AG,E414) olarak da adlandırılan gam arabik (GA), akasya ağaçlarının gövdesinden ve dallarından elde edilen toksik olmayan, biyoyumlu, yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir [112]. GA %39-42 galaktoz, %24-27 arabinoz, %12-16 ramnoz, %15-16 glukuronik asit, %1,5- 2.6 protein, %0,22- 0,39 azot ve %12,5-16,0 aralığında nem içermektedir. GA'nin kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri kökenine, elde edilen ağaçların yaşına, iklim koşullarına, toprak ortamına ve hasattan sonra uygulanan işlemlere göre değişmektedir[113, 114]. GA' nın üç ayrı kısımdan oluştuğu gösterilmektedir: yüksek moleküler ağırlıklı bir arabinogalacto-protein (AGP) kompleksi, bir glikoprotein(G1) ve düşük moleküler kütle fraksiyonlu protein bakımından zayıf olan arabinogalaktan (AG). Yüksek moleküler kütleli AGP, gam arabığın emülsiyon yapma özelliğinden sorumludur. AGP' nin yapısı, yağ-su arayüzeylerinde güçlü adsorpsiyona olanak tanımaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, iki glikoprotein bileşeninin(AGP ve G1) sıcaklık etkisiyle denatüre olduğu ve bu durumun emülsifikasyon kabiliyetinde kayıplara yol açtığı, çözelti viskozitesinde bir azalmaya neden olduğu gösterilmektedir [27]. GA' nın temelde bir polisakkarit olmasına rağmen arayüzey ve emülsifiye edici özelliklerinin protein yapısından, yani yüksek moleküler ağırlıklı AGP kompleksinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır [115, 116]. Bu yapıdaki hidrofobik peptit alanının ve hidrofilik polisakkarit alanının GA'ya amfifilik özellik kazandırdığı kabul edilmektedir [117].

GA, oldukça arzu edilen iki özelliğe sahiptir. Birincisi, nispeten düşük viskoziteli ve yüksek konsantre çözeltiler oluşturmak için suda kolayca çözülür olması, ikincisi ise su içinde yağ emülsiyonlarını etkili bir şekilde stabilize etmesidir [118]. Ayrıca GA, yüksek suda çözünürlüğü, düşük çözelti viskozitesi, iyi yüzey aktivitesi ve emülsiyon damlacıklarının etrafında koruyucu bir film oluşturma kabiliyeti nedeniyle etkili bir emülgatördür [76].

GA, stabilizatör, emülgatör, aroma maddesi, kıvam artırıcı, yüzey bitirme maddesi, hacim artırıcı madde, taşıyıcı, sıkılaştırıcı, nemlendirici olarak kullanılmakta ve başta yüksek çözünürlüklü olması sayesinde diğer gamlar arasında benzersiz özelliklere sahiptir. GA, unlu mamuller, soslar, aromalar ve diyet lifleri gibi gıda endüstrisi sektörlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [119]. GA pH 3-5 aralığında bile emülsifiye edici özelliktedir. Bu sayede hafif asitli turunçgil aromalı içecekler gibi ürünlerde vazgeçilmezdir [117]. Şekerleme ürünlerinde stabilize edici olarak kullanılmaktadır. Sakkaroz kristalleşmesinin önlenmesinde ve sakız ürünlerinin ağızda erimesini yavaşlatarak ürünlerin uzun süre dayanması için kullanılmaktadır. Jöle ürünlerinde lifli, meyve benzeri bir doku sağlamak için ürünlere ilave edilmektedir [120]. GA, ayrıca ilaç, baskı, tekstil ve kozmetik endüstrisileride dahil olmak üzere gıda dışı endüstrilerde sıklıkla kullanılmaktadır [121].

GA, kompleks koaservat oluşturmak için pozitif yüklü proteinlerle karıştırılmada yaygın olarak kullanılan negatif yüklü bir polielektrolittir [122]. Karboksil grupları nedeniyle pH 2.2'nin üzerinde net bir negatif yük taşımaktadır [62]. GA ve proteinler arasındaki kompleks koaservasyon, GA makromoleküllerinin karboksil grupları ile proteinlerin amino grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin yük nötralizasyonu ile gerçekleşmektedir [73]. GA ve bitki proteinleri ile karışımıyla hazırlanan koaservatların su–yağ arayüzeyinde yüksek adsorpsiyon özelliği sağladığı gösterilmektedir [123]. WPI-GA koaservatları ile yapılan bir başka çalışmada ise, herhangi bir kremalaşma, flokülasyon veya kremalaşma olmadan stabil bir emülsiyon oluşturulduğu belirtilmektedir [42]. Ovalbumin-GA kompleksleri ile yapılan bir diğer çalışmada, emülsiyona ilave edilen koaservatların depolama süresi boyunca damlacık boyutunun neredeyse sabit kaldığı ve emülsiyonun stabil kaldığı gösterilmektedir [124]. Ovatransferrin ve GA koaservatlarının arayüzey gerilimini azaltarak, yağ-su ara yüzeyinde adsorbe edildiği ve stabilite korunmasının sağlandığı belirtilmektedir [43]. Kanola protein izolatları ve gam arabik karışımıyla hazırlanan koaservatların emülsiyon üzerinde köpüklenmeyi engellemesi ve koyulaştırma sağlaması gibi önemli etkileri olmaktadır [125].

Tez çalışmasında yumurta kabuğu zarı proteinleri (YKZP) ve gam arabik arasında kompleks koaservasyon yöntemiyle elde edilen YKZP-GA kompleksi ilk kez çalışılmış ve bu koaservatın emülsiyon stabilitesi üzerine etkisi incelenerek emülsifikasyon özellikleri belirlenmiştir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Tez kapsamında kullanılan yumurta kabukları Hacettepe Üniversitesi Öğrenci Kafeteryası'ndan alınmıştır. Çalışmada kullanılan ayçiçek yağı (Komili; Kocaeli,TÜRKİYE) yerel marketten alınmıştır.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Çalışma kapsamında asetik asit (%100), Tris-HCl, o-fosforik asit (%85), potasyum hidroksit (KOH) Merck kGaA (Darmstadt,Almanya) firmasından , gam arabik Alfasol (Kimbiotek Kimyevi Mad. San., İstanbul, Türkiye) markasından, sodyum dodesil sülfat (SDS), bromfenol mavisi, coomassie brillant mavisi-G250, amonyum persülfat (APS), tetrametiletilediamin (TEMED), trikloroasetik asit (TCA) Bio-Rad Laboratories, Inc.(Kaliforniya, A.B.D) firmasından, gliserol, etanol (%100) Isolab Laborgerate GmbH (Wertheim, Almanya) firmasından alınmıştır. Sığır serum albümini (BSA), 2-merkaptotanol, hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich,Co. (Steinheim, Almanya) firmasından, glisin Molekula (Shaftesbury, İngiltere) firmasından, metanol Riedel-de Haen(Almanya) firmasından, akrilamid (%40) ve bisakrilamid (%2) AppliChem ITW (Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Eldesi

Çiğ şekilde kullanılmış olan yumurta kabukları temin edildikten sonra yumurta kalıntılarının temizlenmesi için yıkanmıştır. Daha sonra YKZ manuel olarak kabuktan ayrılmıştır. Soyulan zarlar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler bıçaklı öğütücüde öğütüldükten sonra hassas terazide tartılmıştır.

YKZP eldesi için iki farklı yöntem denenmiştir. İlk yöntemde Mine, Oberle ve Kassaify [126] tarafından geliştirilen protokol modifiye edilmiştir. Bu yöntemde

öncelikle öğütülen membranlar 2 g olacak şekilde santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Membranlara hacimce %40'lık asetik asit çözeltisinden 25 mL eklenmiş ve 4°C sıcaklıkta gece boyunca karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda sıvı kısım alınmış ve asetik asit içeren çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmıştır. Döner buharlaştırıcının sıcaklığı proteinlerin denatüre olmaması için 45°C olarak ayarlanmıştır. Elde edilen YKZP deiyonize su ile çözülmüş ve 4°C' de depolanmıştır. İkinci yöntemde santrifüj tüplerine alınan 2 g membranın üzerine 1:1.5 (h:h) oranında karıştırılarak hazırlanan etanol ve NaOH (1M) çözeltisinden 41 mL eklenmiş ve 55 °C' de iki saat su banyosu kullanılarak karıştırılmıştır [127]. Tamamen çözünen membranlar 1 M HCl kullanılarak pH 7.0 olacak şekilde nötrale edilmiş ve 4°C' de depolanmıştır.

3.2.2. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Miktar Tayini

Elde edilen YKZP' nin miktar tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır [128]. Bu yöntemde kullanılmak üzere 0.5-5 mg/mL aralığında deiyonize su kullanılarak BSA standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan Bradford boya çözeltisinden 2 mL ve standartlardan 40 µL küvet içerisine aktarılmıştır. 5 dk inkübasyon sonucunda 595 nm'deki absorbans değerleri Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, A.B.D.) firmasından alınan UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde polistiren makro küvetler kullanılmıştır. Ölçümler üç paralel olacak şekilde alınmış ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Bir önceki aşamada iki farklı yöntemle elde edilen YKZP çözeltilerinden 40 µL alınmış ve 2 mL Bradford çözeltisi ile karıştırılarak 5 dk inkübe edilmiştir. Çözeltilerin 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak çözeltilerdeki protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.3. Yumurta Kabuğu Zarı Protein Analizi

Elde edilen YKZP'nin protein analizi için SDS-PAGE, Laemmli metoduna [129] göre dikey elektroforez sisteminde (VWR, Radnor, PA, A.B.D.) uygulanmıştır. %15'lik seperasyon jeli Çizelge 3.1' deki bileşenlerle hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan seperasyon jel içeriği

Bileşenler	Miktar
%40'lık Akrilamid	7.25 mL
%2'lik Bisakrilamid	4.95 mL
1.5 M Tris-Cl(pH=8.6)	5 mL
%10'luk SDS	200 µL
Deiyonize su	2.51 mL
%10'luk APS	150 µL
TEMED	13.5 µL

Hazırlanan jel dikey jel kasetine döküldükten sonra üzerine kuyucukların oluşması için tarak kısmı oturtularak jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Kuyucuklara doldurulacak olan protein örneklerinden 40 µL alınarak Çizelge 3.2.'deki miktarlarla hazırlanan 10 µL'lik örnek yükleme tamponu çözeltisine eklenmiştir. Belirteç ise Çizelge 3.3'deki protein belirteci yükleme tamponu bileşenlerinden 20 µL alınarak 2 µL protein belirteci ile karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra bu karışımlar 94°C'de 5 dk boyunca protein denatürasyonunun sağlanması için bekletilmiştir. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkarılarak kuyular saf su ile yıkanmış ve kuyucuklar Çizelge 3.4'deki bileşenlerle hazırlanan 5x tamponun seyreltilmesi ile hazırlanan bir miktar 1x tamponu ile doldurulmuştur. Hazırlanan örneklerden ve protein belirtecinden 10 µL alınarak kuyucuklara yüklenmiştir. Jel kasedi elektroforez tankına yerleştirildikten sonra 1x tamponla doldurulmuş ve 200 V sabit voltajda elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. İzlenen boya jel kasedinin tabanına ulaştıktan sonra sistem durdurulmuş ve jel kasetten çıkarılarak saf su ile yıkanmış ve Çizelge 3.5'deki miktarlarla hazırlanan jel boyama çözeltisi içerisine aktararak 2 saat boyunca çalkalayıcıda boyamaya bırakılmıştır. Bu işlemten sonra jel saf su dolu bir kabın içerisine aktararak bekletilmiştir. Agfa Foto Look (Agfa-Geavert N.V. , Belçika) programı kullanılarak jellerin görüntüsü elde edilmiştir.

Çizelge 3.2. SDS- PAGE örnek yükleme tamponu içeriği

Bileşenler	Miktar
1 M Tris-HCl(pH= 6.8)	2.5 mL
Gliserol	4.5 mL
SDS	1 g
Bromfenol mavisi	20 mg
Deiyonize su	2.5 mL
2-merkaptetanol	0.5 mL

Çizelge 3.3. SDS-PAGE protein belirteci yükleme tamponu içeriği

Bileşenler	Miktar
1 M Tris-Cl(pH=6.8)	1.2 mL
Gliserol	1 mL
%10'luk SDS	2 mL
%0.1'lik Bromfenol Mavisi	0.5 mL
Deiyonize su	4.8 mL
2-merkaptetanol	0.5 mL

Çizelge 3.4. SDS-PAGE elektroforez tampon çözeltisi (5x)

Bileşenler	Miktar
Glisin	94 g
Tris-base	15.1 g
SDS(%10)	50 mL
Deiyonize su	950 mL

Çizelge 3.5. SDS-PAGE jel boyama çözeltisi

Bileşenler	Miktar
TCA(%100)	13 mL
%0.25'lik Coomassie Brilliant Blue	78 mL
10 N KOH	9 mL

3.2.4. Zeta Potansiyel Ölçümleri

YKZP ve GA çözeltilerinin farklı pH'lardaki zeta potansiyellerinin belirlenmesi için Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) cihazı kullanılmıştır. Aynı konsantrasyonda (1 mg/mL) deiyonize su ile hazırlanan YKZP ve GA çözeltileri pH 2.0-7.0 değerleri arasında cihaz tarafından otomatik olarak titre edilerek kapılar kuvvetlerde zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

3.2.5. Kompleks Koaservasyon Uygulaması

Protein ve polisakkaritler arasında kompleks koaservasyon yöntemi ile protein üzerindeki pozitif yükler ile, polisakkaritler üzerindeki negatif yüklerin elektrostatik etkileşime girmesi sonucunda koaservatlar elde edilmektedir. Tez kapsamında kompleks koaservasyon metodu kullanılarak YKZP ve GA polimerleri arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılacak olan YKZP çözeltileri 0.5 ve 1 mg/mL olacak şekilde ayarlanmış, GA çözeltileri ise 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/mL olacak şekilde deiyonize su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. İki biyopolimer arasında kompleks koaservasyonun gerçekleşmesi amacıyla, uygulama oda sıcaklığında karıştırıcıda YKZP üzerine GA çözeltisinin yavaşça eklenmesi ile başlatılmıştır. YKZP-GA kompleksinin optimum koşullarının tespiti amacıyla YKZP:GA karışım oranı 1:1, 1:2, 1:4 ve 2:1 (a:a) olacak şekilde ayarlanmış, bir gece boyunca karıştırılmıştır ve daha sonra 4°C'de depolanmıştır. Koaservasyon uygulamasında optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan her bir karışım oranı için, YKZP-GA komplekslerinin pH değerleri HCl ve NaOH kullanılarak pH 2.00-5.00 (0.25 değişim farkıyla) aralığında incelenmek üzere hazırlanmıştır.

3.2.6. Bulanıklık Ölçümleri

Farklı karışım oranları ve pH değerlerinde hazırlanan YKZP-GA komplekslerinin optimum koşullarını belirlemek için türbidimetrik ölçümler alınmıştır. Meydana gelen komplekslere ait 600 nm'deki geçirgenlik değerleri Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, A.B.D.) firmasından alınan UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde polistiren makro küvetler kullanılmıştır. Kontrol olarak YKZP ve GA çözeltileri de komplekslerle aynı konsantrasyonlarda ve pH değerlerinde hazırlanmış ve türbidite ölçümleri alınmıştır. Bu bulanıklık değerleri kompleksler için hesaplanan türbidite değerlerinden çıkarılarak polimerlerin bulanıklığa bireysel katkıları elimine edilmiştir.

3.2.7. Komplekslerin Optik Mikroskop ve Taramalı Elektron Mikroskobu İle Görüntülenmesi

Optimum koşulları belirlenen YKZP-GA kompleksinin yapıları incelenmek üzere lam üzerine sadece YKZP (0.5 mg/mL, pH 3.75), sadece GA (0.5 mg/mL, pH 3.75) ve son olarak YKZP-GA kompleksi bir damla olacak şekilde damlatılmıştır. Lam üzerindeki damlacık lamel ile birleştirilerek damlanın homojen dağılması sağlanmıştır. Hazırlanan örneklerin mikro yapıları elektron mikroskobu (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) kullanılarak 100 x odak ile gözlemlenmiş ve kamera yardımıyla fotoğraflanmıştır.

YKZP (0.5 mg/mL, pH 3.75), GA (0.5 mg/mL, pH 3.75) ve 1:1 (a:a) oranında hazırlanmış YKZP:GA kompleksinin morfolojisi ve yapısal özellikleri çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscope, ESEM) ile karakterize edilmiştir. Bu analiz için dairesel alüminyum stopları üzerine karbon bant kaplanmış, örnekler stoplar üzerine damlatılarak kurutulmuştur. İletken bir yüzey yaratmak için püskürtmeli kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) kullanılarak örnekler 10 nm altın-paladyum ile kaplanmış, ESEM (FEIQuanta 200

FEG, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD) cihazı ile görüntüleri alınmıştır. ESEM analizleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) yapılmıştır. Görüntüler 3 spot boyutunda, 5 kV' de elde edilmiştir.

3.2.8. Emülsifikasyon

Hazırlanan YZKP ve GA'nın kompleks koaservasyon işlemi sonucunda elde edilen koaservatlar su içinde yağ emülsiyonlarının oluşumunda kullanılmıştır. Çalışma kapsamında hacimce %2 koaservat çözeltisi %20 ayçiçek yağı, %80 deiyonize su olacak şekilde Y/S emülsiyonu hazırlanmıştır. Emülsiyon ilk aşamasında karıştırıcıda karışan deiyonize su içerisine yavaşça yağın ilavesi ile elde edilmiştir. Daha önce belirlenen optimum konsantrasyon ve pH değerine göre hazırlanan YKZP-GA kompleksinin emülsiyona katkısının incelenmesi için toplam polimer konsantrasyonu 1 g/mL, 0.75 g/mL, 0.5 g/mL, 0.25 g/mL, 0.125 g/mL olacak şekilde deiyonize su ile seyreltilerek yağ-su karışımına eklenmiştir. YKZP ile hazırlanan komplekslerin, daha önce başarılı bir şekilde hazırlanan ve emülsiyonlar üzerindeki etkisi belirlenen peyniraltı suyu (PS)-GA kompleksi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hazırlanan PS-GA kompleksi ise D.A. Gonzalez Martinez ve ark. [28] tarafından belirlenen optimum koşullar kullanılarak 1.4:1 (PS:GA), pH 3.46 ve toplam polimer konsantrasyonu 0.5 g/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. İkinci aşamada ise hazırlanan karışımlar homojenizatörde (IKA T18 Ultra-Turrax, Deutchland, Almanya) 15000 rpm'de 5 dakika boyunca Y/S emülsiyonu oluşturmak için homojenize edilmiştir. Homojenizatörden alınan örnekler yağ damlacık çaplarının daha da küçültülmesi amacıyla ultrasonik prob (Misonix Inc., New York, A.B.D) ile 60 kHz 8 W'da 1 dakika boyunca sonike edilmiştir. Hazırlanan örnekler deney tüpüne aktararak 4°C'de depolanmıştır. Örnekler iki paralel olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.9. Emülsiyon Damlacık Boyutu Ölçümü

Emülsiyon damlacıkların hidrodinamik çap ölçümlerinin alınması amacıyla 1 g/mL, 0.75 g/mL, 0.5 g/mL, 0.25 g/mL, 0.125 g/mL YZKP-GA ve 0.5 g/mL PS-GA

koaservat konsantrasyonlarında iki paralel olarak hazırlanan ve %2 koaservat, %20 ayçiçek yağı, %78 deiyonize su içeren emülsiyonların ve kontrol grubu olarak koaservat içermeyen yağ içinde su emülsiyonlarının ortalama damlacık çapları dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Bu çalışmada Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) cihazı kullanılmıştır. Çalışma sırasında Malvern marka kapılar küvet kullanılmıştır. Küvetlere 750 µL aktarılan örnekler, 2 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde 25°C’ de ölçüm alınmıştır. Örneklerin hazırlandığı ilk gün ve beşinci gün ölçümler alınmıştır. Alınan sonuçlar ZetaSizer Software (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) programında incelenerek değerlendirilmiştir.

3.2.10. Emülsiyonların Serum Ayırışmalarının İncelenmesi

Hazırlandıktan sonra her biri 20 mL olacak şekilde deney tüplerinde alınan emülsiyonlar 4°C’ de dokuz gün boyunca serum ayırışmaları incelenerek cm cinsinden Eşitlik 3.1’e göre hesaplanmıştır. İki paralel olacak şekilde hazırlanmış örneklerden iki tekrarlı ölçüm alınmıştır.

$$\% SA = [Y_S / Y_E] \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1.})$$

Eşitlikteki Y_S deney tüplerinin alt kısmındaki serum ayırışmasının yüksekliğini (cm), Y_E ise emülsiyonun toplam yüksekliğini (cm) ifade etmektedir.

3.2.11. İstatiksel Analiz

Emülsiyonların damlacık çaplarının ölçümü ve serum ayırışmalarının incelenmesi için yapılan deney sonuçlarının istatiksel analizleri JMP Trial (Version 15.0.0, SAS Institute Inc., Carolina, A.B.D.) yazılım programı kullanılarak belirlenmiştir. Analizlere Tukey Honestly Significant Difference (HSD) çoklu karşılaştırma testleri ($\alpha=0.05$) ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak hesaplanmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

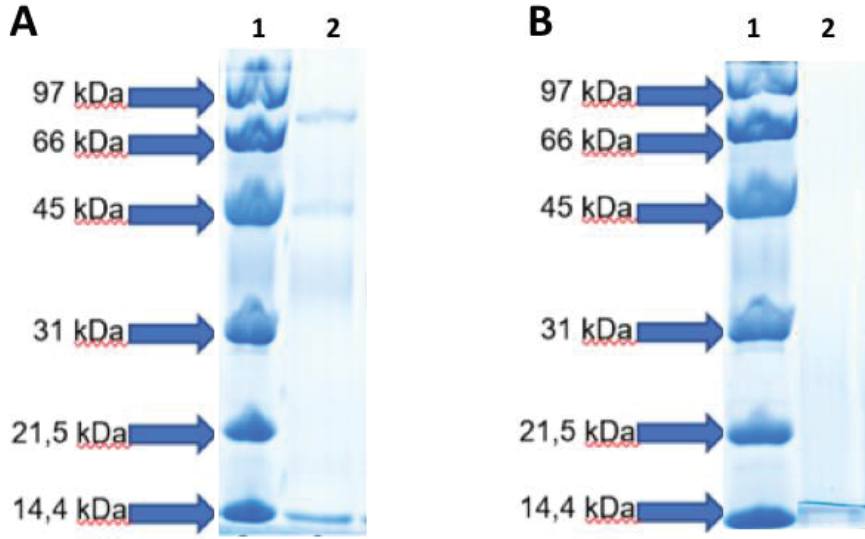
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında yapılan çalışmada, kompleks koaservasyon yöntemi kullanılarak yumurta kabuğu zarından izole edilen proteinler ve gam arabik arasında elektrostatik etkileşim yoluyla oluşan koaservatlardan yeni bir emülgatör üretilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda öncelikle YKZP izole edilmiş ve incelenmiştir. İzole edilen YKZP ve GA arasında oluşturulan koaservatların optimum oran ve pH değerleri bulanıklık ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. Oluşturulan koaservatın emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan su içinde yağ emülsiyonlara, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan koaservatlar eklenerek emülsiyonun stabilitesi incelenmiştir.

4.1. Yumurta Kabuğu Zarı Proteinlerinin Analizi

Yumurta kabuğundan soyularak elde edilen membranlardan asetik asit ve etanol/NaOH çözeltileri ile iki farklı yöntem kullanılarak protein izalasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen YKZP proteinlerinin miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisine göre asetik asit kullanılan ilk yöntemde 2 g membrandan 1 mg/mL protein, etanol/NaOH kullanılan ikinci yöntemde ise 5 mg/mL YKZP elde edildiği tespit edilmiştir.

İki farklı yöntemle hazırlanan YKZP çözeltilerindeki proteinlerin tanımlanması için SDS-PAGE kullanılmıştır. Asetik asit çözeltisi ile izole edilen YKZP örneklerinin jel görüntüsü Şekil 4.1A'da gösterilmiştir. Jel görüntüsünün 1 numaralı şeritinde protein belirteci, 2 numaralı şeritinde ise asetik asit çözeltisi ile hazırlanan YKZP örnekleri incelenmiştir. YKZP örneklerinde protein varlığı 45 kDa ve 14.4 kDa bantlarında görülmektedir. Kullanılan protein belirtecine göre 45 kDa' da görülen bant ovalbumin, 14.4 kDa' da görülen bant ise lizozim enziminin varlığını göstermektedir. Protein belirtecindeki 97 kDa ve 66 kDa arasında görülen bandın 76.8 kDa ağırlığa sahip ovacledin proteini olduğu tahmin edilmektedir [107].



Şekil 4.1. İki farklı yöntemle ekstrakte edilen YKZP'nin SDS-PAGE jel görüntüleri. A) Asetik asit çözeltisi kullanılarak elde edilen YKZP'ye ait jel görüntüsü. Şerit 1: protein belirteci, Şerit 2: YKZP. B) Etanol/NaOH çözeltisi ile elde edilen YKZP'ye ait jel görüntüsü. Şerit 1: protein belirteci, Şerit 2: YKZP.

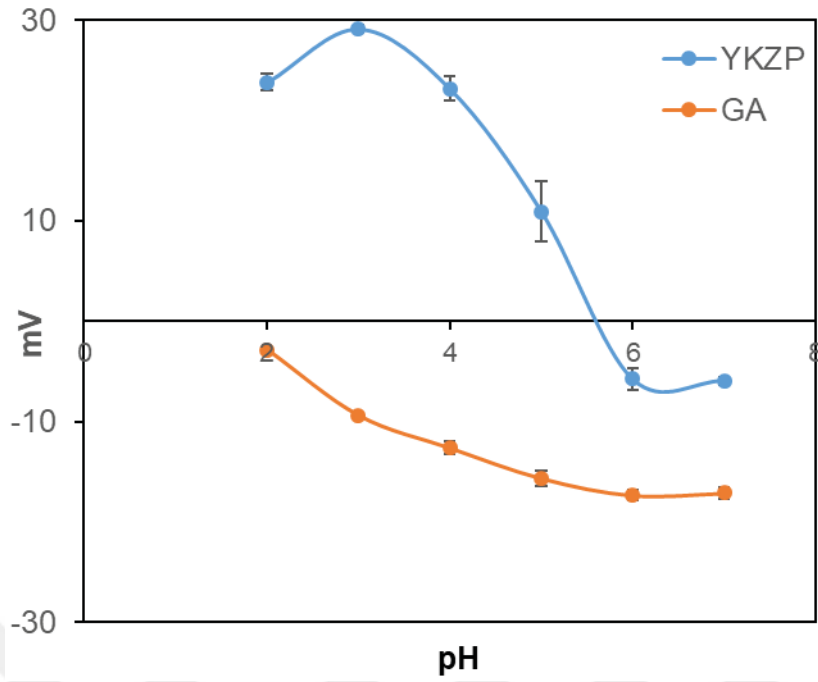
Şekil 4.1B'de etanol ve NaOH karışım çözeltisi ile izole edilen YKZP örneklerinin jel görüntüsü verilmiştir. Jel görüntüsünün 1 numaralı şeridinde protein belirteci, 2 numaralı şeridinde ise elde edilen YKZP örnekleri incelenmiştir.

Kompleks koaservasyon yönteminde kullanılan biyopolimerlerin moleküler ağırlıklarının önemli rol oynadığı bilinmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı materyallerin koaservasyon oluşumunu engellediği, yüksek moleküler ağırlıklarında ise kompleks koaservasyon işleminin daha etkin olduğu belirtilmiştir [130]. Jel görüntü sonuçları incelendiğinde ikinci yöntemle elde edilen YKZP'de düşük molekül ağırlıklı proteinlerin koaservat oluşumunda etkin olamayacağı öngörülerek membranlardan protein izolasyonu için asetik asit yöntemi kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir.

4.2. Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Biyopolimerlerin elektriksel karakterleri zeta potansiyel ölçüm sonuçları ile tanımlanmaktadır [47]. Bu çalışmada zeta potansiyel ölçümleri polimerlerin kompleks koaservasyon oluşumu sırasında gerekli olan yüzey yüklerini belirlemek için kullanılmıştır. Deiyonize su içerisinde hazırlanan YKZP ve GA çözeltilerinin farklı pH değerlerindeki zeta potansiyelleri Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Alınan ölçüm sonuçlarına göre membrandan elde edilen karışık protein ortamının pI değerinin 5.6 olduğu tespit edilmiştir. pH 2.0-5.6 aralığında YZKP’nin pozitif yüzey yüküne sahip olduğu, daha yüksek pH değerlerinde ise negatif yüzey yüküne sahip olduğu gözlemlenmiştir.

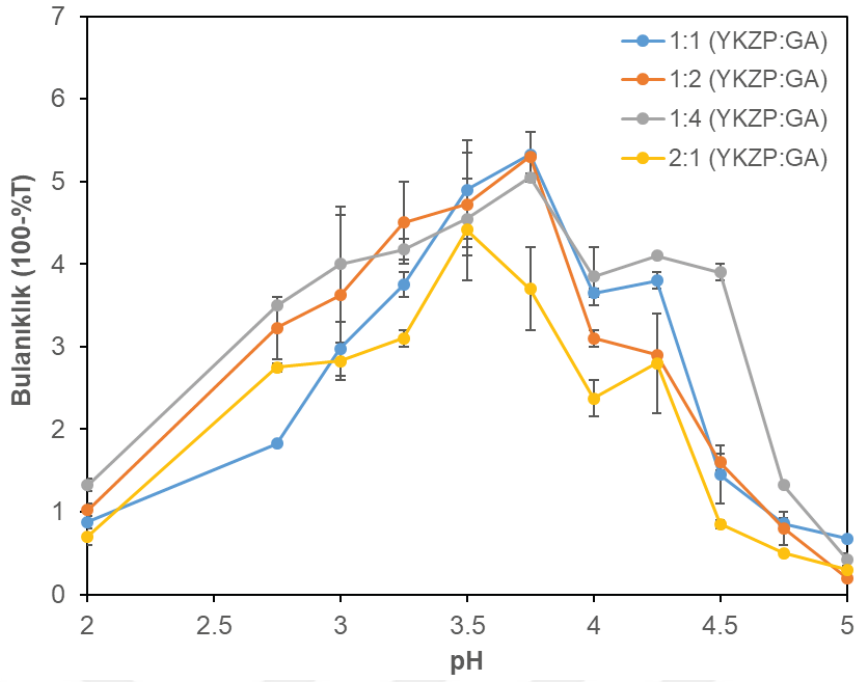
GA sonuçları ise beklenildiği gibi karbonhidratın negatif yüzey yüklerine sahip olduğunu göstermektedir. GA moleküllerinin zeta potansiyel ölçüm sonuçları literatürle benzer sonuçlar göstermiştir [28]. pH düştükçe GA çözeltisinin negatif yük yoğunluğunun azalması, GA’nın yapısında bulunan aminoasit birimlerinin varlığıyla açıklanabilir. YKZP en yüksek katyonik özelliği pH 3.0’de +20 mV olarak, GA ise maksimum aniyonik özelliğini pH 6.0’da -17.34 mV olarak göstermiştir. YKZP ve GA arasında elektriksel etkileşimle oluşacak olan kompleks koaservatların zıt yükte olmaları gerekmektedir. Bundan dolayı YKZP yüzey yüklerinin pozitif olduğu pH 2.0 - 5.6 aralığında çalışılması gerekmektedir. Hem YKZP’nin yüksek pozitiflikte hem de GA’in yüksek negatiflikte olduğu bölgelerde yani, pH 3-4 aralığında en iyi kompleks oluşumunun meydana gelmesi beklenmektedir.



Şekil 4.2. YKZP ve GA çözeltilerinin zeta potansiyellerinin pH'ya göre değişimi.

4.3. Bulanıklık Ölçüm Sonuçları

Biyopolimerlerin karışım oranı ve içinde bulundukları ortamın pH'sı, protein-polisakkaritin kompleksleşmesini etkileyen önemli faktörlerdir [131]. pH, fonksiyonel grupların iyonlaşma derecesinin yanı sıra kompleksteki elektrostatik etkileşim kuvvetini kontrol etmektedir. Karışım oranı, elektrik yükü dengesini, elektrostatik etkileşimleri ve dolayısıyla biyopolimerlerin koaservasyon sürecini etkilemektedir [132].



Şekil 4.3. Farklı YKZP:GA (a:a) oranlarında hazırlanan komplekslerin pH değişimine karşılık bulanıklık ölçümleri

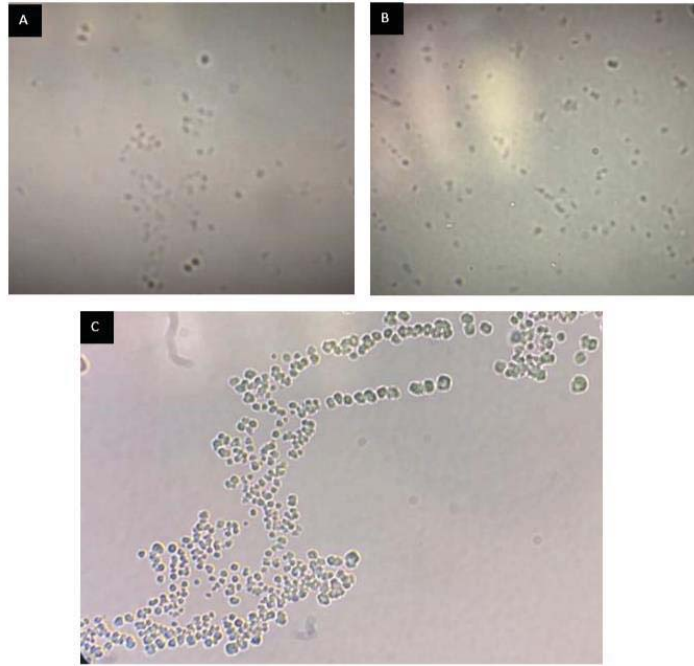
Farklı YKZP:GA oranlarında 1:1, 1:2, 1:4, 2:1 (a:a) hazırlanan komplekslerin pH 2.00-5.00 aralığında bulanıklık değerleri incelenmiştir (Şekil 4.3). YKZP ve GA çözeltilerinin 1:1, 1:2 ve 1:4 oranlarında karıştırılmasıyla elde edilen komplekslerde en yüksek bulanıklık değerini pH 3.75 noktasında saptanmıştır. Bu pH değerinde oranlar arasında büyük fark görülmemekle birlikte, en yüksek bulanıklık değeri 1:1 YKZP:GA oranında olduğu belirlenmiştir. Gam miktarı artmasına rağmen bulanıklık değerinde önemli bir değişimin görülmemesinin, proteinlerin bağlanma bölgelerinin doymuş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, 1:4 oranında bulanıklığın bir miktar azalmış olması, polisakkaritlerin sterik engel oluşturarak kompleks oluşumuna girişim yapmasından kaynaklanmış olabilir [132].

YKZP:GA oranının 2:1 olduğu komplekste ise optimum pH değeri 3.50 olarak belirlenmiştir. Bulanıklık eğrisi incelendiğinde hazırlanan koaservat örneklerinin içerisindeki protein miktarının artmasıyla bulanıklık değerinin düştüğü yani YKZP-GA arasındaki etkileşimin azaldığı görülmüştür. Bu durum, protein moleküllerinin

polisakkaritler yerine birbirleriyle etkileşime girmesinden kaynaklanmış olabilir [133].

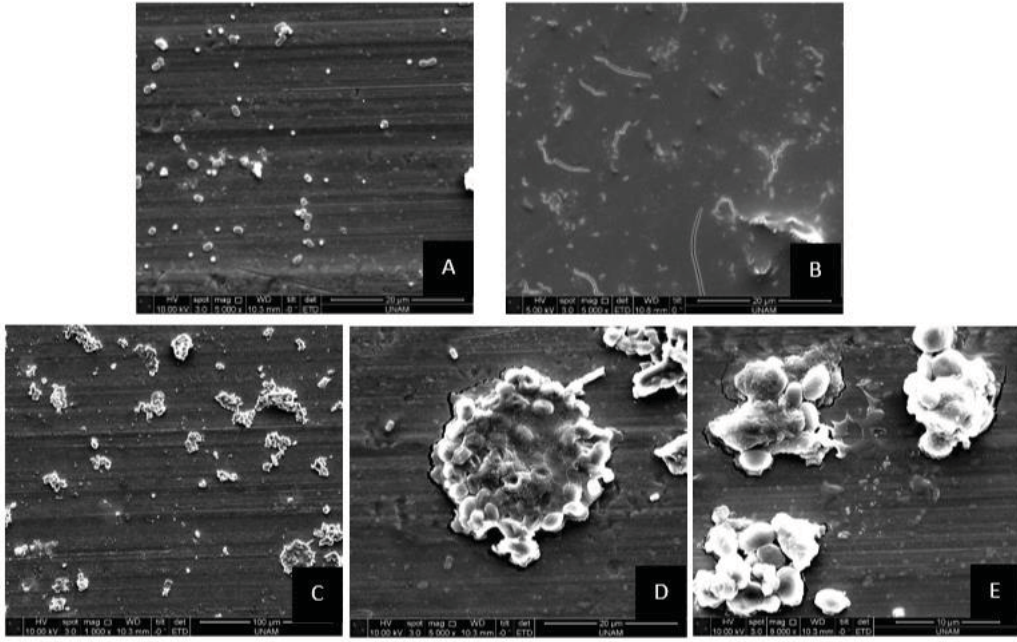
4.4. Işık Mikroskobu ve ESEM Görüntü Sonuçları

YKZP'nin, GA'nın ve YKZP-GA kompleksinin yapısını görüntülemek amacıyla, 1:1 (a:a) oranında hazırlanmış olan ve toplamda 1 mg/mL biyopolimer içeren YKZP-GA kompleksi, 0.5 mg/mL YKZP ve 0.5 mg/mL GA içeren çözeltilerin ışık mikroskopundaki görüntüleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. YKZP, GA ve YKZP-GA kompleksine ait optik mikroskop görüntüleri (100x objektif büyütme): A) YKZP, B) GA, C) YKZP-GA kompleksi.

Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde, tek başına biyopolimerlere karşılık oluşan kompleksin yapısal farklılığı göze çarpmaktadır. Bu sonuç göstermektedir ki YKZP ve GA arasında meydana gelen elektrostatik etkileşim sonucu moleküller birbirlerine bağlanarak daha büyük yeni bir yapı oluşturmuşlardır.



Şekil 4.5. YKZP, GA, YKZP-GA kompleksine ait ESEM görüntüleri. A)YKZP(5000x Büyütme); B)GA(5000x Büyütme); YKZP-GA kompleksi C)1000x; D)5000x; E)8000x Büyütme

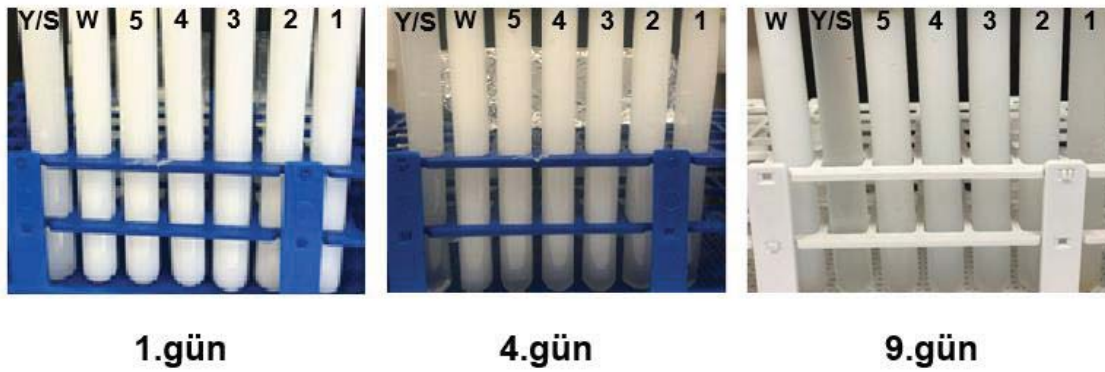
YKZP, GA ve elde edilen YKZP-GA kompleksinin morfolojisi ESEM görüntüleriyle incelenmiştir (Şekil 4.5). Koaservasyon işlemi sonucunda YKZP ve GA'nın morfolojisinden farklı yeni bir kompleks yapısı oluşmuştur. Şekil 4.5D'de (5000x büyütme oranında) verilen koaservat görüntüsünde GA bileşeninin etrafını saran YKZP açıkça görülmektedir. Koaservatların, birbirlerine bağlı neredeyse küresel şekle sahip partiküllerden oluştuğu gözlemlenmiştir. Biyopolimerler elektrostatik etkileşim sayesinde birbirleriyle kompakt haldedir. Şekil 4.5E'de ile incelenen görüntüde oluşturulan komplekslerin yaklaşık olarak birbirine benzer bir dağılım gösterdiği görülmektedir.

4.5. YKZP-GA Kompleksinin Emülsiyon Stabilitesi Üzerine Etkisi

Kompleks koaservasyon yöntemiyle elde edilen YKZP-GA kompleksinin emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla %20 ayçiçek yağı, %78 deiyonize su ve %2 oranında farklı konsantrasyonlarda YKZP-GA kompleksi, PS-GA kompleksi ve kontrol grubu olarak aynı oranlarda sadece su ve ya içeren

örnek olacak şekilde yedi farklı emülsiyon hazırlanarak gözlenmek üzere deney tüplerine aktarılmıştır. Örnekler içerdikleri YKZP-GA kompleksinin konsantrasyonuna göre, 1 (1 g/mL), 2 (0.75 g/mL), 3 (0.5 g/mL), 4 (0,25 g/mL) ,5 (0.125 g/mL), W(0.5 g/mL PS-GA kompleksi) ve koaservat içermeyen emülsiyonlar Y/S olarak kodlanmıştır. Deney tüpleri 4°C’de dokuz gün boyunca depolanmıştır.

Emülsiyon görüntülerinin incelenmesi, emülgatör türlerinin, emülsiyonları stabilize etme etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Farklı konsantrasyonlarda YKZP-GA kompleksi ilave edilen Y/S emülsiyonlarının depolama süresince görüntüleri incelenmiştir. Örneklerin farklı günlerde çekilmiş fotoğrafları Şekil 4.6.’da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolamanın farklı günlerindeki görüntüleri. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0,25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi ve W; 0.5 g/mL PS-GA kompleksi içeren örneklerdir.

Y/S örneği hariç, diğer emülsiyonlar üç gün boyunca homojen dağılım göstererek stabilitelerini korumuşlardır. Y/S emülsiyonu kontrol grubu ise emülsiyonların oluşturuldukları ilk günde bile renk ve görünüm olarak bozulmuş bir emülsiyon görüntüsü vermiştir. Dördüncü gün sonunda ise örneklerde küçük miktarlarda renk değişimleri ve deney tüplerinin alt kısımlarında faz ayrılmaları başlamıştır. Dördüncü gün sonuçlarına bakıldığında, 3, 4 ve 5 numaralı emülsiyon

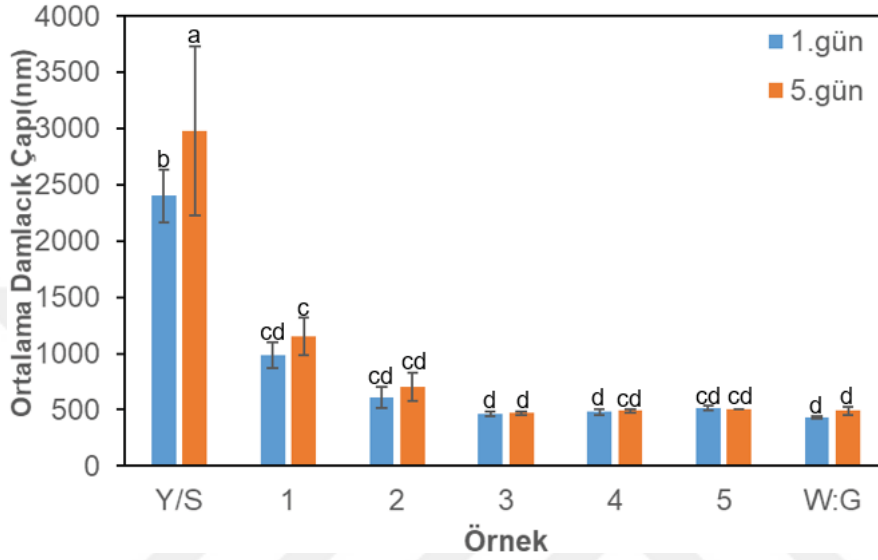
örneklerinin stabilitelerini 1 ve 2 numaralı örneklere göre daha iyi koruduğu görülmektedir. Dokuzuncu gün, sonuçlarına bakıldığında ise Y/S emülsiyonlarının neredeyse tamamen bozulduğu, 1 ve 2 numaralı örneklerde şeffaflaşmanın başladığı ve gözle görülen yağ damlacıkları olduğu, 3, 4 ve 5 numaralı örneklerin ise stabilitelerini daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. PS-GA kompleksi ile oluşturulan emülsiyonla karşılaştırıldığında ise 3, 4 ve 5 numaralı örneklerle benzer görünümde oldukları tespit edilmiştir.

Emülsiyondaki bileşenler arasındaki her oran için, emülsiyon stabilitesini desteklemede kullanılması gereken ideal veya kritik bir polisakkarit miktarı bulunmaktadır. Kullanılan polisakkarit konsantrasyonu, damlacıkların etrafında adsorbe olacak kadar yeterince yüksek olmalı ancak damlacıkların kümelenmesine neden olacak kritik bir konsantrasyonu aşmamalıdır [45]. Bu nedenle, 1 ve 2 numaralı örneklerde YKZP-GA kompleksinin konsantrasyonunun yüksek olmasına karşılık emülsiyon stabilitesinin daha düşük olmasının yüksek polisakkarit konsantrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Emülsiyonların fiziksel görünümleri incelendiğinde 3 ve 4 numaralı konsantrasyonda hazırlanan YKZP-GA koaservatlarının stabilite korumada en etkin konsantrasyonlar olduğu söylenebilir.

Emülsifikasyon sırasında, emülgatörler, yeni oluşturulan su-yağ arayüzeyinde adsorbe edilir ve bu noktada ara yüz kuvvetleri zayıflatılarak karışmayan iki sıvı fazın kısmen karıştırılmasına olanak sağlamaktadırlar. Bu stabilitenin korunması ise, küçük boyutlu damlacıkların oluşturularak su ve yağ damlacıkları arasında bir ara yüzey oluşturulması sayesinde gerçekleşmektedir [4]. Arayüze difüzyon ne kadar yavaş olursa, bu durum daha büyük damlacık boyutlarına ve düşük emülsiyon stabilitesine yol açmaktadır [134]. Damlacık boyut dağılımı, potansiyel demülsifikasyon süreçlerini belirlediği için emülsiyonların en önemli özelliklerinden biridir.

Farklı koaservat konsantrasyonlarında hazırlanan emülsiyonlar ve koaservat içermeyen Y/S emülsiyonu ortalama damlacık boyutlarının belirlenmesi için

Zetasizer Nano ZS90 cihazında, DLS tekniğiyle alınan ölçüm sonuçları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. İki paralel olarak hazırlanan numunelerden üç ölçüm alınarak damlacık boyutu tespit edilmiştir. Hazırlanan emülsiyonlardan birinci gün ve beşinci günlerde ölçüm alınmıştır.



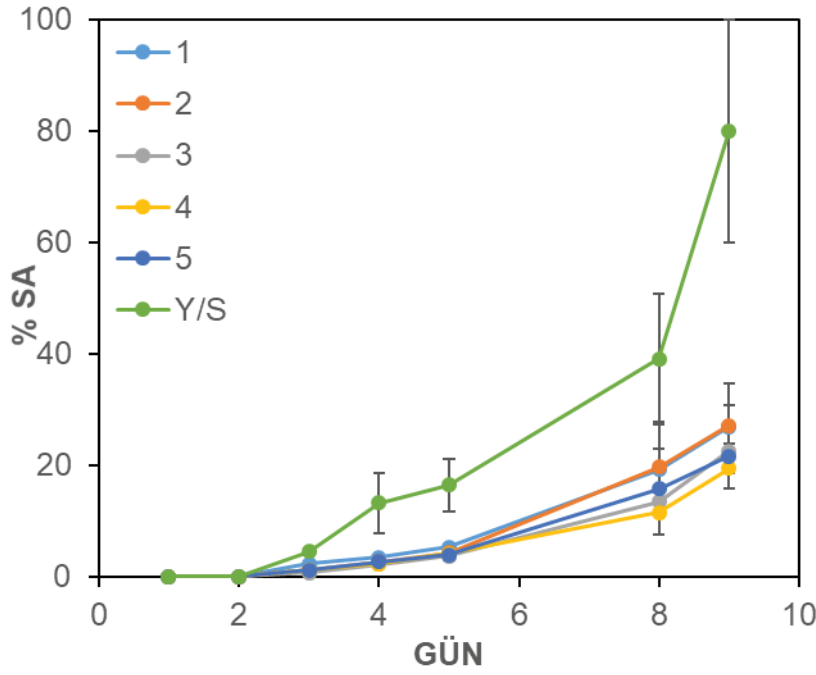
Şekil 4.7. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolanmanın farklı günlerindeki ortalama damlacık çapları. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0,25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi ve W:G; 0.5 g/mL PS-GA kompleksi içeren örneklerdir.

Şekil 4.7.' deki grafik incelendiğinde, elde edilen emülsiyonlar içerisinde beklenildiği gibi en yüksek damlacık boyutu Y/S olarak belirtilen içerisinde koaservat bulunmayan kontrol numuneleridir. Bu örneğin ortalama damlacık boyut ortalaması birinci gün 2401 nm, beşinci gün ise 2984 nm olarak tespit edilmiştir. Diğer örnekler incelendiğinde beş numunenin de, kontrol grubundan daha küçük damlacık boyutuna sahip olduğu görülmektedir. Örneklerdeki birinci gün ve beşinci gün arasındaki farkın kontrol grubundaki kadar bir farka neden olmaması, emülsiyonların içerisine eklenen koaservatların yağ-su ara yüzey enerjisini düşürerek damlacıkların bir araya gelmesini engellediğini göstermektedir. En küçük ortalama damlacık boyutu 462 nm ile 3 numaralı örneklerde (0.5 g/mL koaservat) ölçülmüştür. Beşinci gün sonunda ise emülsiyonun ortalama damlacık çapı 470 nm olarak tespit edilmiştir. Literatürde

sıklıkla kullanılan PS-GA komplekslerinin ortalama damlacık çapları ise birinci gün 434 nm, beşinci gün sonunda ise 490 nm olarak ölçülmüştür. YKZP-GA komplekslerinin 3, 4 ve 5 numaralı konsantrasyonlarında benzer sonuç alınmıştır.

Damlacık boyutu küçüldükçe, emülsiyonlarda yerçekimsel faz ayrımının oranının düştüğü bilinmektedir [110]. Emülsiyonların fiziksel görünümlerine bakıldığında da (şekil 4.6), damlacık boyutlarının küçüklüğünün stabilitenin korunmasındaki etkisi ortaya çıkmaktadır. Deney sonuçlarına göre emülsiyona eklenen YKZP-GA koaservatlarının, kontrol grubuna göre damlacıkların etrafını sararak adsorbe edildikleri ve damlacıkların birbirleriyle birleşerek büyümelerini önledikleri gösterilmiştir.

Serum ayrışmaları, bir emülsiyon içerisindeki su fazından yağ damlacıklarının bir araya toplanma ve ayrılma derecesi hakkında bilgi sağlamaktadır [135]. Serum ayrışması damlacıklar ve çevresindeki sıvı arasındaki yoğunluk farkından kaynaklanmakta ve emülsiyon içerisindeki damlacık boyutuna bağlı olarak meydana gelmektedir [12]. Yapılan çalışmada, 1, 2, 3, 4, 5 numaralı örnekler ve kontrol grubu olan Y/S emülsiyonları iki paralel olarak hazırlanmıştır. Oluşturulduktan sonra deney tüplerine aktarılan emülsiyonlar 4°C' de dokuz gün boyunca depolanmıştır. retimden sonra her gün izlenerek, tüplerin alt kısmında oluşan serum kısmının yüksekliğinin ölçülmesi ile sonuçlar alınmıştır. Eşitlik 3.2.'ye göre hesaplanan %SA değerleri şekil 4.8 verilmiştir.



Şekil 4.8. YKZP-GA kompleksi ilave edilen ve edilmeyen Y/S emülsiyonlarının depolamanın farklı günlerindeki %SA (%serum ayrışması) değerleri. 1; 1 g/mL, 2; 0.75 g/mL, 3; 0.5 g/mL, 4; 0.25 g/mL ve 5; 0.125 g/mL YKZP-GA kompleksi içeren örneklerdir.

Deney sonuçları incelendiğinde, 2. güne kadar kontrol grubu ve diğer örneklerde serum ayrışması gözlenmemiştir. İlerleyen günlerde ise YKZP-GA koaservatları içeren emülsiyonlarda deney tüplerinin alt kısımlarından başlayan serum ayrışmaları gözlenmiştir. Y/S kontrol grubu emülsiyonlarında ise %SA değerleri depolama süresi boyunca daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Bu durumun kontrol emülsiyonundaki yağ damlacıklarının homojen olmayan dağılımından ve yağ damlacıkları arasında topaklaşmanın meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Depolama süresince, farklı konsantrasyonlarda YKZP-GA kompleksi eklenen örnekler karşılaştırıldığında, en düşük serum ayrışması değerleri 3, 4 ve 5 numaralı örneklerde gözlenmiştir. En yüksek serum ayrışma değerleri ise 1 ve 2 numaralı örneklerdedir. YKZP-GA komplekslerinin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin verileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Sonuç olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında, YKZP-GA komplekslerinin eklendiği emülsiyonlarda, komplekslerin emülsifikasyon özellikleri sayesinde flokülasyonu engelleme, kremalaşmayı önleme ve yağ damlacıkları arasında yeterli itici etkileşimi sağladıkları gösterilmiştir.

5. YORUM

Bir sıvı fazın başka bir sıvı faz ile dispersiyonu ile üretilen heterojen sistemlerden olan emülsiyonlar, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Su içinde yağ emülsiyonlarının oluşturulduktan sonra stabiliteyi korumaları için genellikle emülgatörler kullanılmaktadır. Kararlı emülsiyonların üretimine etkisi olan yöntemlerin kolay uygulanabilir olması, toksik maddeler içermemesi, ucuz ve standart ürünler üretebilme avantajlarını sağlaması gerekmektedir. Bu yöntemlerden bir tanesi, pozitif yüklü polimerler ile negatif yüklü polimerlerin elektrostatik etkileşimle bir araya getirildiği kompleks koaservasyon uygulamasıdır. Protein ve polisakkarit polimerleri, kompleks koaservasyon yönteminde sıklıkla kullanılan bileşenlerdir. Kompleks koaservasyon yöntemiyle elde edilen protein-polisakkarit koaservatlarının emülsiyon stabilitesi üzerine, saf protein ve saf polisakkarit polimerlerinden daha etkili olduğu belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada, yumurta kabuğu zarından elde edilen proteinlerin miktarı ve tanımlamasının yapılması, GA ve izole edilen YKZP biyopolimerleriyle gıda uyumlu koaservatların elde edilmesi, biyopolimer komplekslerin kararlılığını etkileyen en uygun koşulların belirlenmesi ve oluşturulan YKZP-GA koaservatlarının emülgatör özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan kompleks koaservasyon yönteminde ilk kez YKZP-GA kompleks oluşumu denenmiş ve oluşturulan kompleks ilk kez emülsiyon stabilizasyonunda kullanılarak, emülsifikasyon özellikleri belirlenmiştir.

Tez kapsamında, protein kaynağı olarak atık olan yumurta kabuğu zarından izole edilen membran proteinleri kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında protein izalasyonu için asetik asit ve etanol:NaOH çözeltilerinin kullanıldığı iki farklı

yöntem denenmiş ve Bradford ve SDS-PAGE jel elektroforez yöntemi ile protein miktarları ve protein tanımlamaları yapılmıştır. Yapılan deney sonuçları incelenerek, kompleks koaservasyon yönteminde kullanılacak protein materyali için hacimce %40'lık asetik asit içeren yöntemin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Kompleks koaservasyon yönteminde kullanılacak polisakkarit olarak, emülsiyon damlacıklarının etrafında koruyucu bir film oluşturma kabiliyeti bulunan gam arabik seçilmiştir [76]. Koaservasyon işleminde kullanılacak biyopolimerlerin yüzey yüklerinin pozitif ve negatif olduğu noktaları belirlemek amacıyla zeta potansiyel ölçümleri alınmıştır. Zeta potansiyel sonuçlarında YKZP proteinlerinin izoelektronik noktası, pozitif ve negatif yüzey yüklerine sahip olduğu pH değerleri belirlenmiştir. YKZP'nin izoelektronik noktası pH=5.6 olarak bulunmuş ve pH<5.6 değerlerinde polimerin pozitif yüklendiği, pH>5.6 da ise negatif yüklendiği belirlenmiştir. GA ise literatürle uyumlu olacak şekilde pH 2-7 aralığında negatif yüzey yükü özelliği göstermiştir [28]. Bu aşamada kompleks koaservasyon için en önemli sürücü güç olan zıt elektriksel yüklerin pH 2-5.6 aralığında sağlanabileceği gösterilmiştir. Biyopolimer karışım oranının ve pH'ın, protein ve polisakkarit arasındaki koaservasyonu düzenlemek için iki temel fizikokimyasal faktör olduğu bildirilmektedir [136]. Bundan dolayı oluşturulacak YKZP-GA komplekslerinin optimum pH ve karışım oranları, türbidimetrik yöntemle incelenerek, 1:1 (YKZP:GA) oranında pH 3.75 noktasında en yüksek kompleks oluşturma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Oluşturulan koaservat yapısının, protein ve polisakkarit yapılardan farklı, elektrostatik etkileşimle polimerlerin bir araya gelerek yeni bir yapı oluşturduğunu göstermek amacıyla YKZP, GA ve YKZP:GA koaservatları ışık mikroskobu ve ESEM analizleriyle incelenmiştir. Görüntü sonuçlarında protein ve polisakkaritlerin kendi yapılarından farklı, daha büyük ve kompakt halde yeni bir mikro yapı gösterdiği ispatlanarak, koaservasyon yöntemi ile YKZP ve GA arasındaki elektrostatik etkileşimle koaservat üretiminde kullanılabilirlikleri gösterilmiştir.

Koaservatlar, güçlendirilmiş sterik kuvvetlerden dolayı emülsiyonların topaklanma ve birleşmeye karşı stabilitesini artırmak için verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Yani, polisakkaritlerle birlikte yüzey aktif proteinlerden oluşan koaservat kompleksleri (polisakkaritlerin çoğu tek başına önemli yüzey aktivitesi

sergilememektedir) arayüzde adsorbe edilebilir ve arayüz tabakalarının mekanik özelliklerini iyileştirebilmektedir [59]. YKZP ve GA polimerleriyle optimum koşullarda oluşturulan komplekslerinde emülsiyonların stabilite korunmasında etkili olacağı ön görülerek, YKZP-GA koaservatlarının emülsifikasyon özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla hacimce %2 koaservat, %20 ayçiçek yağı ve %78 deiyonize su içeriğine sahip emülsiyonlar ve kontrol grubu olarak koaservat içermeyen emülsiyonlar hazırlanmıştır. Y/S emülsiyonlarına eklenen YKZP-GA koaservatlarının optimum konsantrasyonun bulunması için beş farklı konsantrasyonda (1, 0.75, 0.5, 0.25 ve 0.125 mg/mL) hazırlanan koaservatlar emülsiyonlara eklenmiştir. Emülgatör üretiminde koaservatların emülsiyonlardaki optimum koşulları belirlemek için oluşturulan emülsiyonların damlacık boyutu, serum ayrışması değerleri ve fiziksel görünümündeki değişiklikler değerlendirilmiştir.

Emülsiyon damlacık boyutu, emülsiyonların stabilitesini etkileyen önemli bir özelliktir. Emülsiyonlar içinde dağılan damlacıkların boyutu, emülsiyonların reolojik davranışlarını ve stabilitesini etkileyen bir parametredir [4]. Damlacık boyutu ne kadar küçük olursa, emülsiyon o kadar kararlı olmaktadır [13]. Emülsiyonların damlacık boyutları incelendiğinde, beklenildiği gibi tek başına Y/S emülsiyonlarına göre hazırlanan beş örneğinde ortalama damlacık boyutunun, koaservat içermeyen kontrol grubundan belirgin farkla daha küçük olduğu gösterilmiştir. YKZP-GA koaservatları eklenerek hazırlanan emülsiyonların, hazırlandıkları ilk gün ve beşinci gün arasında ise damlacık boyutlarını Y/S emülsiyonuna göre daha iyi korudukları ve PS-GA kompleksleri ile benzer sonuçlar gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuç YKZP-GA kompleksinin su-yağ arayüzüne etki ederek damlacıkların bir araya gelip büyümelerini engellediklerini göstermektedir. Damlacıkların ortalama damlacık boyutlarının $< 1 \mu\text{m}$ ' den küçük olduğunda emülsiyonların stabilitesini iyi koruduğu belirtilmektedir [137]. Farklı koaservat derişimleri (1, 0.75, 0.5, 0.25 ve 0.125 mg/mL) ile hazırlanan emülsiyonların ortalama damlacık çapları sırasıyla $0.982 \mu\text{m}$, $0.611 \mu\text{m}$, $0.462 \mu\text{m}$, $0.482 \mu\text{m}$ ve $0.512 \mu\text{m}$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar $1 \mu\text{m}$ 'den küçük olduğu için, koaservat eklenen emülsiyonların damlacık boyutlarının, stabilite korumasında etkin olabileceği gösterilmiştir. En düşük çap

0.462 μm olarak, 0.5 mg/mL YKZP-GA kompleksi içeren emülsiyonda tespit edildiğinden ve damlacık boyutunu daha iyi koruduğu belirlendiğinden bu örneğin stabilite korumada daha etkin olacağı sonucuna varılmıştır. Emülsiyon damlacıklarının yeterince küçük olması, yerçekimsel olarak faz ayrılmalarının önlenmesi için önemlidir [19]. Oluşturulan emülsiyonlarda bu serum ayrışmaları incelenerek, ilave edilen YKZP-GA komplekslerinin stabilite korumasında etkisi belirlenmiştir. Dokuz gün boyunca incelenen örneklerde ilk iki gün boyunca kontrol grubu ve koaservatla hazırlanan emülsiyon karışımlarında serum ayrışması gözlemlenmemiştir. Dokuzuncu günde ise Y/S emülsiyonu için %serum ayrışma değeri %80 iken, bu 1, 0.75, 0.5, 0.25 ve 0.125 g/mL koaservat içeren emülsiyonlar için sırasıyla %26, %27, %22, %19 ve %21 olarak belirlenmiştir. YKZP-GA koaservatlarının eklendiği emülsiyonların stabilite korumada belirgin etkisi olduğu kanıtlanmıştır. β -laktoglobulin-angum gam komplekslerinin Y/S emülsiyonlarına etkisinin incelendiği bir çalışmada 48 saat boyunca emülsiyonların fiziksel görünüşleri ve parçacık boyutları incelenmiştir [21]. β -laktoglobulin:angum gam oranı 1:2 olarak hazırlanan koaservatların emülsiyona ilavesiyle, emülsiyon damlacık boyutlarında 48 saat boyunca önemli bir değişimin olmadığı ve serum ayrışmasının meydana gelmediği gösterilmiştir. YKZP-GA komplekslerine bakılacak olursa, 3, 4 ve 5 numaralı koaservat konsantrasyonundaki emülsiyonların beş gün boyunca damlacık çaplarının çok değişmediği ve iki gün boyunca hiçbir örnekte serum ayrışmasının meydana gelmediği görülmektedir. YKZP-GA komplekslerinin, emülsiyon stabilitesinin bu koaservatlarla benzer sonuçlar gösterdiği söylenebilir. Yumurta beyazı proteinlerinin guar gam ve pektin polisakkaritleriyle karışım halinde eklendikleri bir çalışmada ise, 10 saat boyunca serum ayrışmaları incelenmiştir. Çalışma sonucunda yumurta beyazı ve guar gum eklenen örnekte serum ayrılması görülmezken, aynı konsantrasyondaki pektin-yumurta beyazı karışımlarında %SA değeri %33 olarak ölçülmüştür [34]. Bu sonuç göstermektedir ki kullanılan gamın cinsi de emülsiyon stabilesini etkilemektedir.

Emülsiyonların fiziksel görünüşlerindeki değişimleri belirlemek amacıyla, YKZP-GA kompleksi ve PS-GA kompleksi ile hazırlanan ve koaservat ilave edilmeden hazırlanan Y/S emülsiyonlarının depolama süresince görüntüleri incelenmiştir.

Dokuz günlük depolama süresi sonunda, koaservat içermeyen Y/S emülsiyonlarının neredeyse tamamen bozulduğu, YKZP-GA koaservatları içeren 3, 4 ve 5 numaralı örneklerin ve PS-GA koaservatları içeren örneklerinin ise stabilitelelerini daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. 1 ve 2 numaralı örneklerde şeffaflaşmanın meydana gelmesi ve yağ damlacıklarının gözle görülür halde olması dikkat çekmektedir. WPI ile stabilize edilen emülsiyona keten tohumu gamının ilave edilerek stabilitedeki değişimi incelenen bir çalışmada düşük konsantrasyonlarda (<% 1.0) keten tohumu ilavesinin, emülsiyon damlacıklarının statik ve dinamik davranışını etkilemezken, daha yüksek konsantrasyonlarda, emülsiyonlarda flokülasyonun meydana gelmesinin muhtemel olduğu belirtilmektedir [38]. Bu sonuç 1 ve 2 numaralı örneklerdeki polisakkarit miktarının fazla olması nedeniyle örneklerin stabilite korumada daha yetersiz sonuç vermesini açıklamaktadır.

Fiziksel görünüm, damlacık boyutu ve serum ayrışması sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, 3 ve 4 numaralı konsantrasyonlarda (0.5-0.25 mg/mL) hazırlanan YKZP-GA koaservatlarının stabilite korumada en etkin konsantrasyonlar olduğu söylenebilir.

Hem proteinler hem de polisakkaritler, emülsifikasyon davranışları sayesinde gıdaların yapısal ve dokusal (reolojik) özelliklerine katkıda bulunabilmektedir. Bu biyopolimerlerin karışımından kaynaklanan sinerjik etkiler, birçok gıdanın iyileştirilmesi, maliyet fiyatlarının düşürülmesi ve ayrıca yeni işlevsel nano, mikro veya makro yapıların oluşturulması için büyük önem taşımaktadırlar. Kitosan ve jelatin tip-B ile yapılan bir çalışmada, kitason ve jelatin koaservatlarının bulunduğu emülsiyonların (%5 sıvı parafin yağı), tek başına kitosan ve tek başına jelatin bulunan emülsiyonlardan daha iyi stabilite gösterdikleri belirtilmiştir [15]. Bu çalışmadaki koaservatlar, tez kapsamında elde edilen YKZP-GA koaservatlarına göre daha büyük damlacık çapı (~ 6 µm) gösterirken, yedi gün süren depolama sonuçlarında herhangi bir serum ayrışmasının meydana gelmediği bildirilmiştir. Ovalbumin ve GA arasında oluşturulan komplekslerle hazırlanan emülsiyonların (%5 ayçiçek yağı) pH 4'de damlacık çaplarının 500

nm'den küçük olduğu belirtilmiş ve yedi gün boyunca fiziksel görünümlerinde serum ayrımı gözlenmediği gösterilmiştir [124]. Soya protein izolatları ve lesitin ile hazırlanan emülsiyonla (~%30 ay ı ek yağı) yapılan bir çalışmada ise ortalama damlacık çapları 4-6  m aralığında tespit edildiği belirtilmektedir. Serum ayrışmalarının ise çalışmanın ikinci gününde başlamakta ve on gün süren depolama sonucunda %SA değerlerinin örneklerde %40-50 aralığında meydana geldiği belirtilmektedir [135]. YKZP-GA koaservatları ile hazırlanan emülsiyonların ortalama damlacık çapları literatürle uyumlu bulunmuştur. YKZP-GA emülsiyonlarında meydana gelen serum ayrışmalarının, emülsiyon sırasında kullanılan yağ miktarının fazla olmasından kaynaklı olduğu düşülmektedir. Ayrıca emülsiyonda kullanılan yağın cinsi, emülsiyon oluşturma yöntemleri ve kullanılan biyopolimer miktarıda çalışmalar arasında farklılıklara neden olmaktadır.

Tez kapsamındaki çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan YZKP-GA komplekslerinin optimum noktaları belirlenmiş, YKZP-GA komplekslerinin emülsifikasyon özellikleri incelenmiş ve Y/S emülsiyonlarında stabilite korumada etkin olabileceği gösterilmiştir. YKZP'nin kullanımı ile atık değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Atık değerlendirme sayesinde potansiyel gelir kaybı  nlenmiştir. Aynı zamanda membran proteinlerinin kullanılması ile emülsiyonlara besleyici ve fonksiyonel özellikler kazandırılmıştır. Sonuç olarak uygulanan kompleks koaservasyon yöntemi ve atık olan hammadde kullanımı ile düşük maliyetli emülsifikasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S.M. Bhimani, Experimental Characterization of Canola Oil Emulsion Combustion in a Modified Furnace, Master Thesis, Texas A&M University, U.S.A., **2011**.
- [2] D.J. McClements, Food Emulsions : principles, practice and techniques, Second ed., CRC Press, USA, **2005**.
- [3] G. Muschiolik, Multiple emulsions for food use, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 12 (**2007**) 213-220.
- [4] F. Goodarzi, S. Zendehboudi, A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries, The Canadian Journal of Chemical Engineering, 97 (**2018**) 281-309.
- [5] P. Posocco, A. Perazzo, V. Preziosi, E. Laurini, S. Priol, S. Guido, Interfacial tension of oil/water emulsions with mixed non-ionic surfactants: comparison between experiments and molecular simulations, RSC Advances, 6 (**2016**) 4723-4729.
- [6] J. Flanagan, H. Singh, Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food, Crit Rev Food Sci Nutr, 46 (**2006**) 221-237.
- [7] A. Sartomo, B. Santoso, Ubaidillah, O. Muraza, Recent progress on mixing technology for water-emulsion fuel: A review, Energy Conversion and Management, 213 (**2020**).
- [8] M. Zembyla, A. Lazidis, B.S. Murray, A. Sarkar, Stability of water-in-oil emulsions co-stabilized by polyphenol crystal-protein complexes as a function of shear rate and temperature, Journal of Food Engineering, 281 (**2020**).
- [9] E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.L. Grossiord, F. Agnely, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, Int J Pharm, 436 (**2012**) 359-378.
- [10] A. Velayati, A. Nouri, Emulsification and emulsion flow in thermal recovery operations with a focus on SAGD operations: A critical review, Fuel, 267 (**2020**).
- [11] J. Moreira de Moraes, O. David Henrique dos Santos, T. Delicato, R. Azzini Gonçalves, P. Alves da Rocha-Filho, Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods, Journal of Dispersion Science and Technology, 27 (**2006**) 109-115.
- [12] K.L. Stig E. Friberg, Johan Sjöblom, Food Emulsions, Fourth ed., Marcel Dekker, New York, **2004**.

- [13] S.Gonzalez Perez, J.B. Arellano, Vegetable protein isolates. Handbook of Hydrocolloids, G.O.Phillips, P.A.Williams (Eds.), CRC Press, USA,15,**2009**.
- [14] S.M. Jafari, Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries, Elsevier Science**2017**.
- [15] J.C. Roy, F. Salaun, S. Giraud, A. Ferri, J. Guan, Surface behavior and bulk properties of aqueous chitosan and type-B gelatin solutions for effective emulsion formulation, Carbohydr Polym, 173 (**2017**) 202-214.
- [16] M. Pathak, Nanoemulsions and Their Stability for Enhancing Functional Properties of Food Ingredients. Nanotechnology Applications in Food 87-106,**2017**.
- [17] L.L. Schramm, Emulsions, Foams, and Suspensions, WILEY-VCH, Canada, **2005**.
- [18] M. Padial-Dominguez, F.J. Espejo-Carpio, R. Perez-Galvez, A. Guadix, E.M. Guadix, Optimization of the Emulsifying Properties of Food Protein Hydrolysates for the Production of Fish Oil-in-Water Emulsions, Foods, 9 (**2020**).
- [19] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, Food Hydrocolloids, 23 (**2009**) 1473-1482.
- [20] H. Wang, M.-F. Li, F. Lin, C.-R. Su, Q.-Z. Zeng, D.-X. Su, S. He, Q. Wang, J.-L. Zhang, Y. Yuan, Fabrication and characterization of bi-crosslinking Pickering emulsions stabilized by gliadin/alginate coacervate particles, Journal of Food Engineering, 291 (**2021**).
- [21] A. Golkar, A. Nasirpour, J. Keramat, β -lactoglobulin-Angum Gum (*Amygdalus scoparia* Spach) Complexes: Preparation and Emulsion Stabilization, Journal of Dispersion Science and Technology, 36 (**2014**) 685-694.
- [22] Yu-Hong Zhao, Y.-J. Chi, Characterization of collagen from eggshell membrane, Biotechnology, 8 (**2009**) 254-258.
- [23] S. Jain, A.K. Anal, Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis, LWT - Food Science and Technology, 69 (**2016**) 295-302.
- [24] H. Singh, M. Tamehana, Y. Hemar, P.A. Munro, Interfacial compositions, microstructure and stability of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 2. Whey protein isolate (WPI), Food Hydrocolloids, 17 (**2003**) 549-561.
- [25] J.A. Lopes-da-Silva, S.R. Monteiro, Gelling and emulsifying properties of soy protein hydrolysates in the presence of a neutral polysaccharide, Food Chem, 294 (**2019**) 216-223.

- [26] A. Benichou, A. Aserin, N. Garti, Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23 (2002) 93-123.
- [27] N. Garti, M.E. Leser, Emulsification properties of hydrocolloids, *Polymers for Advanced Technologies*, 12 (2001) 123-135.
- [28] D.A. González-Martínez, H. Carrillo-Navas, C.E. Barrera-Díaz, S.L. Martínez-Vargas, J. Alvarez-Ramírez, C. Pérez-Alonso, Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage, *Food Hydrocolloids*, 72 (2017) 115-126.
- [29] M. Raei, A. Rafe, F. Shahidi, Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates, *Journal of Food Engineering*, 228 (2018) 25-31.
- [30] A.M. Donald, Aggregation in β -lactoglobulin, *Soft Matter*, 4 (2008).
- [31] M. Evans, I. Ratcliffe, P.A. Williams, Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18 (2013) 272-282.
- [32] S. Thaiphanit, G. Schleining, P. Anprung, Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 60 (2016) 252-264.
- [33] F.O. Uruakpa, S.D. Arntfield, Emulsifying characteristics of commercial canola protein-hydrocolloid systems, *Food Research International*, 38 (2005) 659-672.
- [34] E.A. Ercelebi, E. Ibanoglu, Characterization of phase separation behavior, emulsion stability, rheology, and microstructure of egg white-polysaccharide mixtures, *J Food Sci*, 74 (2009) C506-512.
- [35] V. Speiciene, F. Guilmineau, U. Kulozik, D. Leskauskaite, The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1048-1054.
- [36] S.R. Monteiro, J.A. Lopes-da-Silva, Effect of the molecular weight of a neutral polysaccharide on soy protein gelation, *Food Res Int*, 102 (2017) 14-24.
- [37] A. K, P. Bandyopadhyay, Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides* Chapter 14, 2012.
- [38] S. Khalloufi, M. Corredig, M. Alexander, Interactions between flaxseed gums and WPI-stabilized emulsion droplets assessed in situ using diffusing wave spectroscopy, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 68 (2009) 145-153.

- [39] C. Owens, K. Griffin, H. Khouryieh, K. Williams, Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust bean complexes: Impact of pH, *Food Chem*, 239 (2018) 314-322.
- [40] H. Salminen, J. Weiss, Electrostatic adsorption and stability of whey protein–pectin complexes on emulsion interfaces, *Food Hydrocolloids*, 35 (2014) 410-419.
- [41] R.S.H. Lam, M.T. Nickerson, The properties of whey protein–carrageenan mixtures during the formation of electrostatic coupled biopolymer and emulsion gels, *Food Research International*, 66 (2014) 140-149.
- [42] M. Klein, A. Aserin, I. Svitov, N. Garti, Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 77 (2010) 75-81.
- [43] Z. Wei, Q. Huang, Edible Pickering emulsions stabilized by ovotransferrin–gum arabic particles, *Food Hydrocolloids*, 89 (2019) 590-601.
- [44] T. Koupantsis, V. Kiosseoglou, Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability, *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 1156-1163.
- [45] K.M. Albano, Â.L.F. Cavallieri, V.R. Nicoletti, Electrostatic Interaction between Soy Proteins and Pectin in O/W Emulsions Stabilization by Ultrasound Application, *Food Biophysics*, 15 (2020) 297-312.
- [46] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, U.S.A, **1997**.
- [47] C. Yan, W. Zhang, Coacervation Processes. Microencapsulation in the Food Industry 125-137, **2014**.
- [48] B. Mohanty, Bohidar, H., Systematic of alcohol-induced simple coacervation in aqueous gelatin solutions., *Biomacromolecules*, 4 (2003) 1080-1086.
- [49] Y. Zhao, N. Khalid, G. Shu, M.A. Neves, I. Kobayashi, M. Nakajima, Complex coacervates from gelatin and octenyl succinic anhydride modified kudzu starch: Insights of formulation and characterization, *Food Hydrocolloids*, 86 (2019) 70-77.
- [50] P.K. Pandey, P. Kaushik, K. Rawat, H.B. Bohidar, Effect of organic and inorganic salt environment on the complex coacervation of in situ formed protein nanoparticles and DNA, *Int J Biol Macromol*, 122 (2019) 1290-1296.
- [51] J. Liu, Y.Y. Shim, Y. Wang, M.J.T. Reaney, Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L.), *Food Hydrocolloids*, 49 (2015) 95-103.
- [52] N. Eghbal, R. Choudhary, Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems, *Lwt*, 90 (2018) 254-264.

- [53] J. van der Gucht, E. Spruijt, M. Lemmers, M.A. Cohen Stuart, Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems, *J Colloid Interface Sci*, 361 (**2011**) 407-422.
- [54] C.J.F. Souza, E.E. Garcia Rojas, N.R. Melo, A. Gaspar, J.F.C. Lins, Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 30 (**2013**) 375-381.
- [55] M.E. Vuillemin, F. Michaux, L. Muniglia, M. Linder, J. Jasniewski, Gum Arabic and chitosan self-assembly: Thermodynamic and mechanism aspects, *Food Hydrocolloids*, 96 (**2019**) 463-474.
- [56] E. Dickinson, Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems., *Food Hydrocolloids*, 17 (**2003**) 25-39.
- [57] R.A. Ganzevles, Protein/polysaccharide complexes at air/water interfaces,, Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, **2007**.
- [58] S.N. Warnakulasuriya, M.T. Nickerson, Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes, *J Sci Food Agric*, 98 (**2018**) 5559-5571.
- [59] T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28 (**2017**) 96-109.
- [60] Z. Rousi, C. Malhiac, D.G. Fatouros, A. Paraskevopoulou, Complex coacervates formation between gelatin and gum Arabic with different arabinogalactan protein fraction content and their characterization, *Food Hydrocolloids*, 96 (**2019**) 577-588.
- [61] P.K.S. Pillai, B.E. Morales-Contreras, L. Wicker, M.T. Nickerson, Effect of enzyme de-esterified pectin on the electrostatic complexation with pea protein isolate under different mixing conditions, *Food Chem*, 305 (**2020**) 125433.
- [62] Y. Yang, M. Anvari, C.H. Pan, D. Chung, Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions, *Food Chem*, 135 (**2012**) 555-561.
- [63] N.H.L. S.Liu, Michael T. Nickerson, Effect of pH, salt, and biopolymer ratio on the formation of pea protein isolate-gum arabic complexes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (**2009**) 1521-1526.
- [64] K.J. Klemmer, L. Waldner, A. Stone, N.H. Low, M.T. Nickerson, Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides, *Food Chemistry*, 130 (**2012**) 710-715.
- [65] X.-Y. Wang, C.-S. Wang, M.-C. Heuzey, Complexation of chitosan and gelatin: From soluble complexes to colloidal gel, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65 (**2015**) 96-104.

- [66] W. Zou, F.K. Mourad, X. Zhang, D.U. Ahn, Z. Cai, Y. Jin, Phase separation behavior and characterization of ovalbumin and propylene glycol alginate complex coacervates, *Food Hydrocolloids*, 108 (2020).
- [67] M.O.E. A. P. Anwunobi, Recent Applications of Natural Polymers in Nanodrug Delivery, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, s4 (2011).
- [68] D. Dong, Y. Hua, Emulsifying behaviors and interfacial properties of different protein/gum arabic complexes: Effect of pH, *Food Hydrocolloids*, 74 (2018) 289-295.
- [69] Y. Wei, Z. Cai, M. Wu, Y. Guo, R. Tao, R. Li, P. Wang, A. Ma, H. Zhang, Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 98 (2020).
- [70] J. Clausell, N. Happel, T.K. Hale, D. Doenecke, M. Beato, Histone H1 subtypes differentially modulate chromatin condensation without preventing ATP-dependent remodeling by SWI/SNF or NURF, *PLoS One*, 4 (2009) e0007243.
- [71] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv Colloid Interface Sci*, 167 (2011) 63-70.
- [72] a.C.G.d.K. C.R. R. Tuinier, Electrosorption of Pectin onto Casein Micelles, *Biomacromolecules*, 3 (2002) 632-638.
- [73] A. Ye, Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review, *International Journal of Food Science & Technology*, 43 (2008) 406-415.
- [74] F. Weinbreck, R.H.W. Wientjes, H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, C.G. de Kruif, Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates, *Journal of Rheology*, 48 (2004) 1215-1228.
- [75] J.L. Lutkenhaus, P.T. Hammond, Electrochemically enabled polyelectrolyte multilayer devices: from fuel cells to sensors, *Soft Matter*, 3 (2007).
- [76] F. Niu, M. Kou, J. Fan, W. Pan, Z.J. Feng, Y. Su, Y. Yang, W. Zhou, Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates, *Food Chem*, 260 (2018) 1-6.
- [77] S. Singh, D.E. Demco, K. Rahimi, R. Fechte, J.C. Rodriguez-Cabello, M. Moller, Coacervation of Elastin-Like Recombinamer Microgels, *Macromol Rapid Commun*, 37 (2016) 181-186.
- [78] D. Lin, W. Lu, A.L. Kelly, L. Zhang, B. Zheng, S. Miao, Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 68 (2017) 130-144.

- [79] O.G. Jones, D.J. McClements, Biopolymer nanoparticles from heat-treated electrostatic protein-polysaccharide complexes: factors affecting particle characteristics, *J Food Sci*, 75 (2010) N36-43.
- [80] N. Eghbal, M.S. Yarmand, M. Mousavi, P. Degraeve, N. Oulahal, A. Gharsallaoui, Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate, *Carbohydr Polym*, 151 (2016) 947-956.
- [81] K. Zhang, H. Zhang, X. Hu, S. Bao, H. Huang, Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 89 (2012) 61-66.
- [82] Chi W. Pak, M. Kosno, Alex S. Holehouse, Shae B. Padrick, A. Mittal, R. Ali, Ali A. Yunus, David R. Liu, Rohit V. Pappu, Michael K. Rosen, Sequence Determinants of Intracellular Phase Separation by Complex Coacervation of a Disordered Protein, *Molecular Cell*, 63 (2016) 72-85.
- [83] C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, J. Hardy, Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38 (1998) 689-753.
- [84] D.P. Seyrek E, Tribet C and Gamble EA, Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 273-282.
- [85] K.K. Yilin Wang, Qingrong Huang, and Paul L. Dubin, Effects of salt on polyelectrolyte-micelle coacervation, *Macromolecules*, 32 (1999) 7128-7134.
- [86] A. Ye, J. Flanagan, H. Singh, Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic, *Biopolymers*, 82 (2006) 121-133.
- [87] G.C. Doublier JL, Renarda D and Sanchezb C, Protein-polysaccharide interactions., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5 (2000) 202-214.
- [88] Xiaoyong Wang, Jooyoung Lee, Yu-Wen Wang, Q. Huang, Composition and rheological properties of B-lactoglobulin/pectin coacervates: effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 992-997.
- [89] S.L.T.a.S.I. Laneuville, Protein + polysaccharide Coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products. *Modern Biopolymer Science*, I.T.N. Stefan Kasapis, Johan B. Ubbink (Ed.), Elsevier, USA, 327-363, 11, 2009.
- [90] R.Borrega, C.Tribet, R.Audebert, Reversible Gelation in Hydrophobic Polyelectrolyte/Protein Mixtures: An example of cross-links between soft and hard colloids, *Macromolecules*, 32 (1999) 7798-7806.

- [91] S. Park, K.S. Choi, D. Lee, D. Kim, K.T. Lim, K.-H. Lee, H. Seonwoo, J. Kim, Eggshell membrane: Review and impact on engineering, *Biosystems Engineering*, 151 (2016) 446-463.
- [92] F.G. Torres, O.P. Troncoso, F. Piaggio, A. Hajar, Structure-property relationships of a biopolymer network: the eggshell membrane, *Acta Biomater*, 6 (2010) 3687-3693.
- [93] C.M.M. Cordeiro, Eggshell Membrane Proteins Provide Innate Immune Protection, Postdoctoral, Ottawa, Canada, 2015.
- [94] Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins, *Comptes Rendus Palevol*, 3 (2004) 549-562.
- [95] M.K. Sah, S.N. Rath, Soluble eggshell membrane: A natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 67 (2016) 807-821.
- [96] M.K. Sah, K. Pramanik, Soluble-eggshell-membrane-protein-modified porous silk fibroin scaffolds with enhanced cell adhesion and proliferation properties, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014).
- [97] A. Mittal, M. Teotia, R.K. Soni, J. Mittal, Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review, *Journal of Molecular Liquids*, 223 (2016) 376-387.
- [98] S. Makkar, N.C. Rath, B. Packialakshmi, W.E. Huff, G.R. Huff, Nutritional effects of egg shell membrane supplements on chicken performance and immunity, *Poult Sci*, 94 (2015) 1184-1189.
- [99] T. Nakano, N.I. Ikawa, L. Ozimek, Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes, *Poult Sci*, 82 (2003) 510-514.
- [100] D.A. Slatter, R.W. Farndale, Structural constraints on the evolution of the collagen fibril: convergence on a 1014-residue COL domain, *Open Biol*, 5 (2015).
- [101] C. Liu, C. Liu, Q. Li, M. Song, D. Niu, M. Ma, X. Zhang, Natural eggshell membranes exhibiting programmable shape recovery characteristics, *MRS Communications*, 8 (2018) 903-910.
- [102] E. Song, S. Yeon Kim, T. Chun, H.J. Byun, Y.M. Lee, Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility, *Biomaterials*, 27 (2006) 2951-2961.
- [103] K.A. Theis, T.J. Brady, C.G. Helmick, L.B. Murphy, K.E. Barbour, Associations of Arthritis-Attributable Interference with Routine Life Activities: A Modifiable Source of Compromised Quality-of-Life, *ACR Open Rheumatol*, 1 (2019) 412-423.

- [104] Kevin J Ruff, Dale P DeVore, Michael D Leu, M.A. Robinson, Eggshell membrane: A possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies, *Clinical Interventions in Aging*, 4 (**2009**) 235–240.
- [105] G. Ahlborn, B.W. Sheldon, Enzymatic and microbiological inhibitory activity in eggshell membranes as influenced by layer strains and age and storage variables, *Poult Sci*, 84 (**2005**) 1935-1941.
- [106] C.M. Cordeiro, M.T. Hincke, Recent patents on eggshell: shell and membrane applications, *Recent Pat Food Nutr Agric*, 3 (**2011**) 1-8.
- [107] N.C. Rath, R. Liyanage, S.K. Makkar, J.O. Lay, Jr., Protein profiles of hatchery egg shell membrane, *Proteome Sci*, 15 (**2016**) 4.
- [108] J.Y. Feng Yi, Zhao-Xia Guo, Li-Xia Zhang, Qiang Li, Natural bioactive material: a preparation of soluble eggshell membrane protein, *Macromolecular Bioscience*, 3 (**2003**) 234–237.
- [109] M.M.F. Choi, W.S.H. Pang, X. Wu, D. Xiao, An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilisation platform, *The Analyst*, 126 (**2001**) 1558-1563.
- [110] S. Jain, A.K. Anal, Preparation of eggshell membrane protein hydrolysates and culled banana resistant starch-based emulsions and evaluation of their stability and behavior in simulated gastrointestinal fluids, *Food Res Int*, 103 (**2018**) 234-242.
- [111] Cristianne M.M. Cordeiro, M.T. Hincke, Recent patents on eggshell: shell and membrane applications, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3 (**2011**) 1-8.
- [112] N. Pauzi, N.M. Zain, N.A.A. Yusof, Gum arabic as natural stabilizing agent in green synthesis of ZnO nanofluids for antibacterial application, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8 (**2020**).
- [113] C. Sanchez, M. Nigen, V. Mejia Tamayo, T. Doco, P. Williams, C. Amine, D. Renard, Acacia gum: History of the future, *Food Hydrocolloids*, 78 (**2018**) 140-160.
- [114] S. Assaf, G. Phillips, P. Williams, Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of gum exudate, *Food Hydrocolloids*, 19 (**2005**) 647-660.
- [115] G.O.P. A.M.Islam, M.J.S.a.P.A.W. A.Sljivo, A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic, *Food Hydrocolloids*, 11 (**1997**) 493-505.
- [116] M. Klein, A. Aserin, P. Ben Ishai, N. Garti, Interactions between whey protein isolate and gum Arabic, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79 (**2010**) 377-383.

- [117] N. Isobe, N. Sagawa, Y. Ono, S. Fujisawa, S. Kimura, K. Kinoshita, T. Miuchi, T. Iwata, A. Isogai, M. Nishino, S. Deguchi, Primary structure of gum arabic and its dynamics at oil/water interface, *Carbohydr Polym*, 249 (2020) 116843.
- [118] U. Nations, Special issue on gum arabic, *Commodities at a glance*, 8, New York and Geneva, 2018.
- [119] Talaat D. Abdel Magid, Mohamed Tom. A. Eltayb, A.M.A. Dirar, Equalizing gum codal term (a Code E414), of acacia senegal (L) with acacia seyal (Del.), and its impact on gum production and exportation., *Journal of Applied and Industrial Sciences*, 3 (2014) 144-151.
- [120] D. Verbeken, S. Dierckx, K. Dewettinck, Exudate gums: occurrence, production, and applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 63 (2003) 10-21.
- [121] K. Nishinari, Y. Fang, N. Yang, X. Yao, M. Zhao, K. Zhang, Z. Gao, Gels, emulsions and application of hydrocolloids at Phillips Hydrocolloids Research Centre, *Food Hydrocolloids*, 78 (2018) 36-46.
- [122] F.N.A. Aryee, M.T. Nickerson, Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides, *Food Research International*, 48 (2012) 520-527.
- [123] J.R. V. Duce, Y. Popineau, and F. Boury,, Rheological interfacial properties of plant protein-arabic gum coacervates at the oil-water interface, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 790-796.
- [124] F. Niu, Y. Zhang, C. Chang, W. Pan, W. Sun, Y. Su, Y. Yang, Influence of the preparation method on the structure formed by ovalbumin/gum arabic to observe the stability of oil-in-water emulsion, *Food Hydrocolloids*, 63 (2017) 602-610.
- [125] A.K. Stone, A. Teymurova, M.T. Nickerson, Formation and Functional Attributes of Canola Protein Isolate—Gum Arabic Electrostatic Complexes, *Food Biophysics*, 9 (2014) 203-212.
- [126] C.O. Yoshinori Mine, AND Zeina Kassaify, Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 249-253.
- [127] Extracting process of egg membrane extract and application in cosmetics. <https://patents.google.com/patent/CN1111514A/en> Son Erişim Tarihi:22/01/2021
- [128] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- [129] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.

- [130] Y.P. Timilsena, T.O. Akanbi, N. Khalid, B. Adhikari, C.J. Barrow, Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation, *Int J Biol Macromol*, 121 (2019) 1276-1286.
- [131] P.A.W. T. Vinayahan, and G. O. Phillips, Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 3367–3374.
- [132] B. Naderi, J. Keramat, A. Nasirpour, M. Aminifar, Complex coacervation between oak protein isolate and gum Arabic: optimization & functional characterization, *International Journal of Food Properties*, 23 (2020) 1854-1873.
- [133] N. Raoufi, R. Kadkhodaei, G.O. Phillips, Y. Fang, M.N. Najafi, Characterisation of whey protein isolate-gum tragacanth electrostatic interactions in aqueous solutions, *International Journal of Food Science & Technology*, 51 (2016) 1220-1227.
- [134] Y. Wang, S. Ghosh, M.T. Nickerson, Effect of pH on the formation of electrostatic complexes between lentil protein isolate and a range of anionic polysaccharides, and their resulting emulsifying properties, *Food Chem*, 298 (2019) 125023.
- [135] X. Sui, S. Bi, B. Qi, Z. Wang, M. Zhang, Y. Li, L. Jiang, Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability, *Food Hydrocolloids*, 63 (2017) 727-734.
- [136] J.N. Yan, Y.Q. Wang, X.Y. Jiang, J.R. Han, Y.N. Du, J.F. Pan, H.T. Wu, Effect of pH and mixing ratio on interpolymers complexation of scallop (*Patinopecten yessoensis*) male gonad hydrolysates and kappa-carrageenan, *Food Chem*, 336 (2021) 127687.
- [137] H. Mirhosseini, C.P. Tan, N.S.A. Hamid, S. Yusof, Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315 (2008) 47-56.