

Study on rheological property changes in a polysaccharide protein composite system and 4D food printing forming mechanism

Badanie zmian właściwości reologicznych polisacharydowo-białkowego układu kompozytowego oraz mechanizmu formowania żywności przy użyciu druku 4D



DOI: 10.15199/62.2026.4.1

Izolat białka serwatkowego (WPI), glukomannan z dziwidła, *Amorphophallus konjac* (KGM) oraz alginian sodu (SA) wykorzystano do przygotowania kompozytowych mas drukarskich polisacharyd-białko metodą indukcji termicznej. Wpływ stosunku polisacharydów (KGM:SA), zawartości białka oraz warunków indukcji termicznej na właściwości reologiczne (lepkość pozorna, moduł zachowawczy G' , moduł strat G'' , granica plastyczności) układu kompozytowego badano za pomocą reometru rotacyjnego. Właściwości druku 4D materiału kompozytowego oceniono z wykorzystaniem biurkowej drukarki 4D, określając dokładność wytłaczania, zdolność do zachowania kształtu oraz szybkość reakcji na bodźce. Najlepsze wyniki uzyskano przy stężeniu WPI równym 6,5 g/100 mL, stosunku KGM:SA wynoszącym 3,5:3,5 oraz czasie indukcji termicznej 12 min w temp. 85°C. Lepkość pozorna przy szybkości ścinania 10 s⁻¹ wyniosła 876,2±28,5 Pa·s, G' 12580±420 Pa, G'' 1890±65 Pa, a granica plastyczności 32,8±1,2 Pa. W tych warunkach wydrukowany produkt charakteryzował się dużą dokładnością wytłaczania (błąd szerokości linii poniżej 5%), dobrą zdolnością do zachowania kształtu (24-godzinna deformacja poniżej 3%) oraz doskonałą reakcją na bodźce termiczne i na pH. Współczynnik odkształcenia osiągnął wartość 45,2±2,1% po ogrzewaniu w temp. 70°C przez 12 min, a po zanurzeniu w roztworze buforowym o pH 7,5 wyniósł 45,2±2,1%.

Słowa kluczowe: układ kompozytowy polisacharydowo-białkowy, właściwości reologiczne, drukowanie żywności w 4D, mechanizm formowania, reakcja na bodźce, oddziaływania molekularne

Whey protein isolate (WPI), konjac glucomannan (KGM) and Na alginate (SA) were used to prep. polysaccharide protein composite printing materials by using thermal induction method. The effects of polysaccharide ratio (KGM:SA), protein concentration, and thermal induction conditions on the rheol. properties (apparent viscosity, storage modulus G' , loss modulus G'' , yield stress) of the composite system were studied by using a rotational rheometer system. The 4D printing performance of the composite ink was evaluated by using a desktop 4D printer to det. the extrusion accuracy, shape retention, and stimulus response rate. The best results were achieved when the WPI concn. was 6.5 g/100 mL, the KGM:SA ratio 3.5:3.5, and the thermal induction time 12 min at 85°C. The apparent viscosity at a shear rate of 10 s⁻¹ was 876.2±28.5 Pa·s, G' was 12580±420 Pa, G'' was 1890±65 Pa, and the yield stress was 32.8±1.2 Pa. Under this condition, the printed product had high extrusion accuracy (line width error below 5%), good shape retention (24-hour deformation rate below 3%), and excellent thermal/pH dual response performance. The shape deformation rate reached 45.2±2.1% when heated at 70°C for 12 min, and when immersed in a pH 7.5 buffer solution, it had a shape deformation rate of 45.2±2.1%.

Keywords: polysaccharide protein complex system, rheological properties, 4D food printing, forming mechanism, stimulus response, molecular interaction

Białka i polisacharydy to dwa ważne rodzaje biomolekuł występujących w żywności, które różnią się znacznie pod względem swej budowy chemicznej, właściwości fizycznych i funkcji. Białka charakteryzują się doskonałymi właściwościami funkcjonalnymi, takimi jak emulgacja, koagulacja, pienienie oraz adsorpcja międzyfazowa, dzięki czemu mogą być wykorzystywane jako emulgatory i stabilizatory. Z kolei polisacharydy charakteryzują się doskonałymi

Proteins and polysaccharides are two important types of biomolecules in food, with significant differences in chemical structure, physical properties, and functions. Proteins have excellent functional properties such as emulsification, coagulation, foaming, and interfacial adsorption, and can be used as emulsifiers and stabilizers. Polysaccharides, on the other hand, have excellent rheological, water holding, and thickening properties, and are often used as texture modifiers in food and have received widespread attention¹⁻³. The mixture of whey protein isolate and pectin can form a “water in water” dispersion, and can also transform into a core-shell structure or form dense aggregates when the pH value changes.

* Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Pillar of Engineering Product Development, Singapore University of Technology and Design, 8 Somapah Road, Singapore 487372, Singapore; e-mail: yhong0919@163.com

właściami reologicznymi, zdolnością do wiązania wody oraz właściwościami zagęszczającymi. Są one często stosowane jako modyfikatory tekstury w żywności i cieszą się dużym zainteresowaniem¹⁻³). Mieszanina izolatu białka serwatkowego i pektyny może tworzyć dyspersję typu „woda w wodzie”, a także przekształcać się w strukturę rdzeń-powłoka lub tworzyć gęste agregaty w wyniku zmian pH. Dlatego wykorzystanie oddziaływań między naturalnymi białkami a polisacharydami do projektowania złożonych struktur stopniowo stawało się popularnym tematem badań⁴).

Wzajemne oddziaływania między cząsteczkami białek i polisacharydów obejmują wiązania kowalencyjne, oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe, siły van der Waalsa oraz odpychanie przestrzenne. Zjawiska wynikające z tych oddziaływań mogą makroskopowo przejawiać się tworzeniem układów jednofazowych lub prowadzić do rozdziału faz między białkami a polisacharydami, tworząc układy dwufazowe⁵⁻⁷). Dogłębne zrozumienie mechanizmów oddziaływania między białkami a polisacharydami w różnych warunkach, badanie ich złożonych zachowań agregacyjnych oraz tworzenia kompleksów białkowo-polisacharydowych o określonych strukturach i funkcjach ma nie tylko ogromne znaczenie dla rozwiązania problemu ograniczonego wyboru naturalnych składników żywności, precyzyjnej regulacji jakości żywności oraz ukierunkowanego projektowania i opracowywania specjalistycznej żywności funkcjonalnej, ale także wpisuje się w kierunek ekologicznego, zdrowego i zrównoważonego rozwoju przemysłu spożywczego.

Właściwości materiału drukarskiego są kluczowym czynnikiem decydującym o jakości wydruku żywności 4D. Materiał drukarski przeznaczony do kontaktu z żywnością musi charakteryzować się dobrą przydatnością do druku (ekstrudowalność, plastyczność, samonośność), biokompatybilnością, bezpieczeństwem oraz odpowiednimi właściwościami w zakresie reakcji na bodźce⁸).

Polisacharydy i białka to naturalne biomolekuły powszechnie występujące w żywności, które charakteryzują się wieloma zaletami: są ekologiczne, bezpieczne, biokompatybilne oraz dają możliwość regulacji właściwości funkcjonalnych. System kompozytowy na bazie polisacharydów i białek łączy właściwości zagęszczające, żelujące i zatrzymujące wodę, charakterystyczne dla polisacharydów, z właściwościami emulgującymi, spieniającymi i błonotwórczymi białek, skutecznie niwelując wady mas zawierających wyłącznie polisa-

Therefore, the study of using the interaction between natural proteins and polysaccharides to design complex structures has gradually become a hot topic⁴).

The interactions between protein and polysaccharide molecules include covalent interactions, electrostatic interactions, hydrophobic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, and spatial repulsion. The macroscopic phenomena of these interactions may manifest as the formation of single-phase systems, or lead to phase separation between proteins and polysaccharides to form two-phase systems⁵⁻⁷). A deep understanding of the interaction mechanisms between proteins and polysaccharides under different conditions, exploring their complex aggregation behavior, and constructing protein polysaccharide complexes with specific structures and functions are not only of great significance for solving the narrow range of natural food ingredient selection, precise regulation of food quality, and targeted design and development of special functional foods, but also in line with the direction of green, healthy, and sustainable development of the food industry.

The performance of printing material is the core factor determining the quality of 4D food printing. Food grade printing material needs to have good printing adaptability (extrusiveness, formability, self-supporting), biocompatibility, safety, and stimulus response performance⁸). Polysaccharides and proteins are natural biomolecules widely present in food, with advantages such as being green, safe, biocompatible, and having adjustable functional properties. The polysaccharide protein composite system combines the thickening, gelling, and water holding properties of polysaccharides with the emulsifying, foaming, and film-forming properties of proteins, effectively compensating for the shortcomings of single polysaccharide or protein inks (such as poor extrusion stability, insufficient self-supporting properties, weak stimulus responsiveness, etc.). For example, the composite system of soy protein isolate and carboxymethyl cellulose can significantly improve the molding stability of ink, while the composite system of konjac glucomannan and whey protein can endow ink with good temperature response performance.

Rheological properties are the core performance indicators of food grade printing materials, which directly affect the extrusion smoothness, printing accuracy, and self-supporting ability of the ink after molding⁹). For 4D food printing, the material not only needs to meet the rheological requirements of 3D printing, but also needs to have controllable stimulus

Table 1. Effect of polysaccharide ratio on rheological properties of composite system

Tabela 1. Wpływ stosunku polisacharydów na właściwości reologiczne układu kompozytowego

KGM:SA ratio/ Stosunek KGM:SA	Apparent viscosity/ Lepkość pozorna, 10 s ⁻¹ /Pa·s	Storage modulus/ Moduł zachowawczy G', Pa	Loss modulus/ Moduł strat G'', Pa	Yield stress/ Granica plastyczności, Pa	G'/G''
2:5	528.6 ± 21.3	7850 ± 350	1560 ± 58	21.5 ± 1.0	5.03
3:4	742.3 ± 25.7	10260 ± 390	1720 ± 62	27.9 ± 1.1	5.97
3.5:3.5	876.2 ± 28.5	12580 ± 420	1890 ± 65	32.8 ± 1.2	6.66
4:3	798.5 ± 26.3	11350 ± 400	1810 ± 63	30.2 ± 1.2	6.27
5:2	685.4 ± 24.1	9620 ± 380	1750 ± 60	26.7 ± 1.1	5.49

charydy lub wyłącznie białka (takie jak m.in. słaba stabilność podczas wyłaczania, niewystarczająca samonośność, słaba reaktywność na bodźce). Na przykład układ kompozytowy izolatów białka sojowego i karboksymetylocelulozy może znacznie poprawić stabilność formowania materiału, a układ kompozytowy glukomannanu z dziwidła (*Amorphophallus konjac*) i białka serwatkowego może zapewnić tu dobrą odporność na zmiany temperatury.

Właściwości reologiczne stanowią podstawowe wskaźniki wydajności materiałów drukarskich przeznaczonych do kontaktu z żywnością, które mają bezpośredni wpływ na płynność podczas wyłaczania, dokładność druku oraz zdolność materiału do samodzielnego utrzymywania się po uformowaniu⁹. W przypadku druku żywności w 4D materiał musi nie tylko spełniać wymagania reologiczne stawiane w druku 3D, ale także posiadać regulowane właściwości reologiczne reagujące na bodźce, aby umożliwić programowalną zmianę kształtu po wydrukowaniu. Obecnie badania nad układami kompozytowymi zawierającymi polisacharydy i białka skupiają się głównie na prostej charakterystyce reakcji na pojedyncze bodźce (takie jak temperatura czy pH) lub na właściwościach reologicznych. Nadal jednak brakuje systematycznych badań dotyczących właściwości reologicznych układów kompozytowych, zależności między właściwościami reologicznymi a parametrami druku 4D oraz mechanizmów powstawania w warunkach reakcji na wiele bodźców¹⁰.

W badaniach wykorzystano izolat białka serwatkowego (WPI) jako matrycę białkową oraz wybrano glukomannan otrzymany z dziwidła (KGM, charakteryzujący się doskonałymi właściwościami żelującymi i retencyjnymi) i alginian sodu (SA, charakteryzujący się dobrą reaktywnością na pH i biokompatybilnością) jako polisacharydy kompozytowe w celu stworzenia dwuskładnikowego systemu drukowania opartego na kompozycie białkowo-polisacharydowym. Właściwości reologiczne układu kompozytowego zoptymalizowano poprzez dostosowanie proporcji polisacharydów, stężenia białka oraz warunków indukcji termicznej.

Część doświadczalna

Materiały

WPI (zawartość białka $\geq 90\%$) zakupiono w firmie Sigma Aldrich w Stanach Zjednoczonych; KGM (masa cząsteczkowa $1,5 \cdot 10^6$ Da) oraz SA (masa cząsteczkowa $2,0 \cdot 10^5$ Da) zostały zakupione w firmie Shanghai Yuanye Biotechnology Co., Ltd.; kwas solny (HCl), wodorotlenek sodu (NaOH), diwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4) i wodorofosforan disodowy (Na_2HPO_4), wszystkie w jakości analitycznej, zostały zakupione w firmie China National Pharmaceutical Group Chemical Reagent Co., Ltd. W badaniach wykorzystano wodę ultraczystą (oporność $\geq 18,2$ M $\Omega \cdot \text{cm}$).

Aparatura

Stosowano: reometr rotacyjny (MCR 302, Anton Paar, Austria) wyposażony w sondę stożkową (średnica 50 mm,

responsive rheological properties to achieve programmable shape transformation after printing. At present, research on polysaccharide protein composite systems mainly focuses on simple characterization of single stimulus response (such as temperature, pH) or rheological properties. However, there is still a lack of systematic regulation of the rheological properties of composite systems, the correlation between rheological properties and 4D printing performance, and the formation mechanism under multi stimulus response¹⁰.

This study used whey protein isolate (WPI) as the protein matrix and selected konjac glucomannan (KGM, which has excellent gelling and water holding properties) and sodium alginate (SA, which has good pH responsiveness and biocompatibility) as composite polysaccharides to construct a dual polysaccharide protein composite printing system. Optimize the rheological properties of the composite system by adjusting the polysaccharide ratio, protein concentration, and thermal induction conditions.

Experimental

Materials

Whey protein isolate (WPI, protein content $\geq 90\%$) was purchased from Sigma Aldrich in the United States. Konjac glucomannan (KGM, molecular weight $1.5 \cdot 10^6$ Da) and sodium alginate (SA, molecular weight 2.0×10^5 Da) were purchased from Shanghai Yuanye Biotechnology Co., Ltd. Hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), and disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) all analytical grade were purchased from China National Pharmaceutical Group Chemical Reagent Co., Ltd. The experimental water used was ultrapure water (resistivity ≥ 18.2 M $\Omega \cdot \text{cm}$).

Analytical and process instrumentation

Rotational rheometer (MCR 302, Anton Paar, Austria) equipped with a cone probe (diameter 50 mm, cone angle 1° , gap 0.1 mm). Desktop 4D food printer (3D-F400, Shenzhen Chuangxiang 3D Technology Co., Ltd.), equipped with a 0.4 mm diameter extrusion nozzle. Scanning electron microscope (SEM, SU8010, Hitachi, Japan). Constant temperature water bath (HH-S4, Baita Xinbao Instrument Factory, Jintan District). Electronic balance (FA2004, Shanghai Precision Scientific Instrument Co., Ltd.). High speed shearing emulsifier (FJ200-S, Shanghai Specimen Model Factory). Vacuum drying oven (DZF-6050, Shanghai Boxun Industrial Co., Ltd. Medical Equipment Factory).

Methods

Preparation of polysaccharide protein composite printing material

To prepare a composite printing material by thermal induction method, a certain amount of KGM and SA were weighed, mixed evenly according to the set ratio (KGM:SA

kąt stożka 1°, szczelina 0,1 mm); biurkową drukarkę 4D do żywności (model 3D-F400, firma Shenzhen Chuangxiang 3D Technology Co., Ltd.), wyposażoną w dyszę wytłaczającą o średnicy 0,4 mm; skanujący mikroskop elektronowy (SEM, SU8010, Hitachi, Japonia); łaźnię wodną o stałej temperaturze (HH-S4, Baita Xinbao Instrument Factory, Jintan); wagę elektroniczną (FA2004, Shanghai Precision Scientific Instrument Co., Ltd.); szybkoobrotowy emulgator ścinający (model FJ200-S, Shanghai Specimen Model Factory) oraz suszarkę próżniową (model DZF-6050, fabryka sprzętu medycznego Shanghai Boxun Industrial Co., Ltd.).

Metodyka badań

Przygotowanie materiału drukarskiego zawierającego kompozyt polisacharydowo-białkowy

Aby przygotować kompozytowy materiał drukarski metodą indukcji termicznej, odważono określoną ilość KGM i SA, wymieszano je równomiernie zgodnie z ustalonymi proporcjami (KGM:SA 2:5, 3:4, 3,5:3,5, 4:3, 5:2), rozcieńczono wodą ultraczystą, wymieszano w łaźni wodnej w temp. 60°C przez 30 min, a następnie pozostawiono na noc w celu pełnego spęcznienia polisacharydów i uzyskania roztworu polisacharydów. Następnie przygotowano roztwory WPI o stężeniach 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 i 8,5 g/100 mL, rozcieńczono je wodą ultraczystą, wymieszano w łaźni wodnej w temp. 40°C przez 20 min, a następnie poddano działaniu ultradźwięków przez 10 min (moc 200 W) w celu całkowitego rozpuszczenia białka i uzyskania roztworu białkowego. Roztwór polisacharydów dodawano powoli do roztworu białka i emulgowano przy dużej prędkości obrotowej (8000 rpm) przez 15 min, aby uzyskać jednorodną mieszaninę. Następnie mieszanka była umieszczana w łaźniach wodnych o stałej temperaturze (75, 80, 85, 90 lub 95°C) i podgrzewana przez 6, 9, 12, 15 lub 18 min, a następnie schładzana do temperatury pokojowej i odgazowywana w próżni przez 10 min. Z układu usuwano pęcherzyki powietrza, uzyskując w ten sposób kompozytowy materiał drukarski na bazie polisacharydów i białek, który następnie szczelnie zamykano i przechowywano w lodówce do późniejszego wykorzystania.

Wyznaczanie właściwości reologicznych

Właściwości reologiczne układu kompozytowego mierzone za pomocą reometru rotacyjnego. Wszystkie pomiary

2:5, 3:4, 3.5:3.5, 4:3, 5:2, resp.), diluted with ultrapure water, stirred at 60°C on water bath for 30 min, let for standing overnight to fully swell the polysaccharides and obtain a polysaccharide solution. Then WPI solutions were prepared at concentrations 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 and 8.5 g/100 mL, diluted with ultrapure water, stirred at 40°C on water bath for 20 min, dispersed by ultrasounds for 10 min (power 200 W) to fully dissolve the protein, and obtain protein solution. The polysaccharide solution was slowly added to the protein solution and emulsified at high rotation speed (8000 rpm) for 15 min to obtain a uniform mixed system. The mixed system was placed in constant temperature water baths (75, 80, 85, 90 or 95°C) and heated for 6, 9, 12, 15 or 18 min, then cooled to room temperature, degassed under vacuum for 10 min. The bubbles were removed from the system to obtain the polysaccharide protein composite printing material, sealed and refrigerated for later use.

Determination of rheological properties

The rheological properties of the composite system were measured by using a rotational rheometer. All measurements were conducted at a constant temperature of 25°C with the probe preheated for 10 min. Apparent viscosity was measured at varying shear rates 0.1~100 s⁻¹ and presented as respective curves. Dynamic rheological properties were determined at the frequency range 0.1~100 Hz under strain set to 1% (linear viscoelastic region, determined by strain scanning experiment). The storage modulus (G') and loss modulus (G'') of the system were measured and the frequency G' and G'' curves were plotted. Yield stress was determined under controlled shear rate mode gradually increasing from 0.01 s⁻¹ to 10 s⁻¹. The yield stress of the system was fitted by using the rheometer's built-in software. Each sample was studied three times in parallel and the average was taken as result.

4D Printing performance evaluation

A desktop 4D food printer was used for printing experiments with printing nozzle temp. 25°C, printing speed 5 mm/s, extrusion pressure 0.3 MPa, layer thickness 0.2 mm, and printing model as a rectangular prism (20×10×5 mm). A vernier caliper was used to measure the

Table 2. Effects of different thermal induction temperatures and times on the rheological properties of composite systems

Tabela 2. Wpływ różnych temperatur i czasów indukcji termicznej na właściwości reologiczne układów kompozytowych

Thermally induced temperature/ Temperatura indukcji, °C	Thermal induction time/ Czas indukcji termicznej, min	Apparent viscosity/ Lepkość pozorna (10 s ⁻¹), Pa·s	Storage modulus/ Moduł zachowawczy G', Pa	Loss modulus/ Moduł strat G'', Pa	Yield stress/ Granica plastyczności, Pa
75	12	692.5 ± 24.8	9870 ± 370	1680 ± 61	25.3 ± 1.1
80	12	785.4 ± 26.1	11230 ± 390	1790 ± 63	29.5 ± 1.2
85	12	876.2 ± 28.5	12580 ± 420	1890 ± 65	32.8 ± 1.2
90	12	821.7 ± 27.4	11860 ± 400	1830 ± 64	30.7 ± 1.2
95	12	758.3 ± 25.9	10540 ± 380	1750 ± 62	28.3 ± 1.1
85	6	701.4 ± 25.2	9950 ± 370	1690 ± 60	25.8 ± 1.1
85	9	792.6 ± 26.5	11380 ± 390	1800 ± 63	30.1 ± 1.2
85	15	835.8 ± 27.7	12030 ± 410	1850 ± 64	31.5 ± 1.2
85	18	789.5 ± 26.3	11420 ± 390	1810 ± 63	29.8 ± 1.2

przeprowadzono w stałej temp. 25°C, po uprzednim rozgrzaniu sondy przez 10 min. Lepkość pozorną mierzono przy różnych prędkościach ścinania w zakresie 0,1–100 s⁻¹ i przedstawiono w postaci odpowiednich krzywych. Dynamiczne właściwości reologiczne określano w zakresie częstotliwości 0,1–100 Hz przy odkształceniu ustalonym na 1% (liniowy obszar lepkosprężysty, wyznaczony w procesie skanowania odkształcenia). Zmierzono moduł zachowawczy (G') i moduł strat (G'') układu oraz sporządzono wykresy częstotliwościowe G' i G'' ; granicę plastyczności określono w trybie kontrolowanej szybkości ścinania, stopniowo zwiększając ją z 0,01 s⁻¹ do 10 s⁻¹. Granicę plastyczności układu określono za pomocą wbudowanego oprogramowania reometru. Każdą próbkę badano trzykrotnie równoległe, a jako wynik przyjęto średnią.

Ocena wydajności drukowania 4D

Do doświadczeń z drukowaniem wykorzystano biurową drukarkę 4D do żywności, przy temperaturze dyszy wynoszącej 25°C, prędkości drukowania 5 mm/s, ciśnieniu wytłaczania 0,3 MPa, grubości warstwy 0,2 mm oraz modelu w kształcie prostopadłościanu (20×10×5 mm). Za pomocą suwmiarki noniuszowej zmierzono rzeczywistą szerokość linii na wydrukowanej próbce (w 10 losowo wybranych punktach pomiarowych) z odpowiednią dokładnością, a następnie obliczono błąd szerokości linii. Aby określić współczynnik zachowania kształtu, wydrukowaną próbkę umieszczono w środowisku o temp. 25°C i wilgotności względnej 60%. Wysokość, długość i szerokość próbki mierzono po 0 h i 24 h, a następnie obliczono współczynnik zachowania kształtu wg wzoru (1):

$$\text{współczynnik zachowania kształtu} = \frac{\text{wymiar po 24 h}}{\text{wymiar po 0 h}} \cdot 100\% \quad (1)$$

oraz stopień deformacji wg wzoru (2):

$$\text{stopień deformacji} = 1 - \text{współczynnik zachowania kształtu} \quad (2)$$

Właściwości termiczne i właściwości związane z reakcją na pH zostały określone oddzielnie. Aby określić odpowiedź termiczną, wydrukowaną próbkę umieszczono w łaźni wodnej o stałej temperaturze (70°C), a następnie mierzono stopień deformacji próbki po 0, 3, 6, 9, 12 i 15 min. W celu zmierzenia reakcji na zmiany pH przygotowano roztwory buforowe o pH 2,5; 4,5; 6,5; 7,5 i 9,5. Wydrukowane próbki zanurzano w roztworach buforowych o różnych wartościach pH, inkubowano w temp. 25°C przez 12 min, następnie trzykrotnie mierzono stopień deformacji próbek, a jako wynik przyjęto średnią.

Projekt doświadczenia i przetwarzanie danych

Przeprowadzono eksperymenty jednoczynnikowe w celu zbadania wpływu stosunku polisacharydów (KGM:SA), stężenia WPI oraz warunków indukcji termicznej (temperatura, czas) na właściwości reologiczne oraz wydajność druku 4D układu kompozytowego. Dla każdego czynnika wyznaczono 5 poziomów, a dla każdego poziomu przeprowadzono 3 równoległe pomiary. Do analizy statystycznej danych wyko-

actual line width of the printed sample (randomly selected 10 measurement points) with respective accuracy and the line width error was calculated. To determine the shape retention rate, the printed sample was placed in an environment with temp. 25°C and relative humidity 60%. The height, length, and width of the sample were measured at 0 h and 24 h, respectively, and the shape retention rate was calculated according to formula (1):

$$\text{shape retention rate} = \frac{\text{size at 24 h}}{\text{size at 0 h}} \cdot 100\% \quad (1)$$

and deformation rate according to formula (2):

$$\text{deformation rate} = 1 - \text{shape retention rate} \quad (2)$$

The thermal response and pH response performance were determined separately. To determine the thermal response, the printed sample was placed in a constant temperature water bath (70°C) and the shape deformation rate of the sample was measured after 0, 3, 6, 9, 12 and 15 min, respectively. To measure the pH response, a buffer solutions with pH 2.5, 4.5, 6.5, 7.5, and 9.5, was prepared, the printed samples was immersed in different pH buffer solutions, incubated at 25°C for 12 min, and the shape deformation rate of the samples was measured 3 times in parallel and the average was taken.

Experimental design and data processing

Single factor experiments were conducted to investigate the effects of polysaccharide ratio (KGM: SA), WPI concentration, and thermal induction conditions (temperature, time) on the rheological properties and 4D printing performance of the composite system. Five levels were set for each factor, and 3 parallel measurements were taken for each level. SPSS 26.0 software was used for data statistical analysis, and Duncan's new repolarization method was used for significant difference analysis ($P < 0.05$ was considered significant). The charts were drawn by using Origin 2021 software.

Results and discussion

Effect of polysaccharide ratio on rheological properties of composite system

The effect of different KGM:SA ratios on the rheological properties of the composite system was investigated under fixed WPI concentration of 6.5 g/100 mL and thermal induction conditions of 85°C × 12 min. The results are shown in Table 1.

According to Table 1, as the proportion of KGM:SA increased, the apparent viscosity, G' , G'' , and yield stress of the composite system showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching their maximum values at KGM:SA = 3.5:3.5. This was because KGM had strong gelling properties and could form a cross-linked network with WPI, while SA had good water solubility and fluidity, which could adjust the viscosity of the system. When

rzystano oprogramowanie SPSS 26.0, a do oceny istotności różnic zastosowano nową metodę repolaryzacji Duncana (za istotną uznano wartość $P < 0,05$). Wykresy wykonano przy użyciu oprogramowania Origin 2021.

Wyniki badań i ich omówienie

Wpływ stosunku polisacharydów na właściwości reologiczne układu kompozytowego

Zbadano wpływ różnych stosunków KGM:SA na właściwości reologiczne układu kompozytowego przy stałym stężeniu WPI wynoszącym 6,5 g/100 mL oraz w warunkach indukcji termicznej (85°C przez 12 min). Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Wraz ze wzrostem proporcji KGM:SA lepkość pozorna, G' , G'' oraz granica plastyczności układu kompozytowego wykazywały tendencję najpierw do wzrostu, a następnie do spadku, osiągając wartości maksymalne przy KGM:SA = 3,5:3,5 (tabela 1). Było to spowodowane tym, że KGM wykazuje silne właściwości żelujące i może tworzyć usieciowaną strukturę z WPI, natomiast SA charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i płynnością, co pozwala regulować lepkość układu. Gdy stosunek KGM:SA był zbyt niski, stopień usieciowania układu był niewystarczający, struktura sieci była luźna, a parametry reologiczne niskie. Gdy proporcja KGM:SA była zbyt wysoka, cząsteczki KGM miały skłonność do agregacji, co mogło zakłócać jednorodność układu, prowadząc do spadku stabilności struktury sieciowej i pogorszenia parametrów reologicznych. Ponadto współczynnik G'/G'' układu był większy od 1 w całym zakresie, co wskazuje, że układ kompozytowy miał charakter głównie sprężysty i wykazywał typowe właściwości żelu, dzięki czemu mógł spełniać wymagania dotyczące samonośności w druku 4D. Gdy stosunek KGM:SA wynosił 3,5:3,5, wartość G'/G'' była największa (6,66), a układ wykazywał największą elastyczność.

Wpływ warunków indukcji termicznej na właściwości reologiczne układów kompozytowych

W celu zbadania wpływu temperatury i czasu indukcji termicznej na właściwości reologiczne układu kompozytowego zastosowano stałe stężenie WPI wynoszące 6,5 g/100 mL oraz stosunek KGM:SA wynoszący 3,5:3,5. Wyniki zestawiono w tabeli 2.

Zarówno temperatura indukcji termicznej, jak i czas miały istotny wpływ na właściwości reologiczne układu kompozytowego (tabela 2). Gdy czas indukcji termicznej ustalono na 12 min, wraz ze wzrostem temperatury indukcji termicznej lepkość pozorna, współczynniki G' i G'' oraz granica plastyczności układu wykazywały tendencję najpierw do wzrostu, a następnie do spadku, osiągając wartość maksymalną w temp. 85°C. Wynikało to z faktu, że indukcja termiczna mogła sprzyjać denaturacji WPI, odsłaniając grupy hydrofobowe i miejsca aktywne cząsteczek białka, które następnie ulegały reakcjom sieciowania z cząsteczkami polisacharydów, tworząc trójwymiarową strukturę sieciową. Gdy temperatura była zbyt niska (75 lub 80°C), denaturacja białka WPI była niewystarczająca,

the KGM:SA ratio was too low, the cross-linking degree of the system was insufficient, the network structure was loose, and the rheological parameters were low. When the proportion of KGM:SA was too high, KGM molecules were prone to aggregation, which could disrupt the uniformity of the system, leading to a decrease in network structure stability and rheological parameters. In addition, the G'/G'' ratio of the system was higher than 1 in the whole range, indicating that the composite system was mainly elastic, showing typical gel characteristics, which could meet the self-supporting requirements of 4D printing. When the KGM:SA ratio was 3.5:3.5, the G'/G'' ratio was the largest (6.66), and the system had the strongest elasticity.

Effect of thermal induction conditions on the rheological properties of composite systems

A fixed WPI concentration of 6.5 g/100 mL and KGM:SA = 3.5:3.5 were used to study the effects of different thermal induction temperatures and times on the rheological properties of the composite system. The results are shown in Table 2.

According to Table 2, both the thermal induction temperature and time had a significant impact on the rheological properties of the composite system. When the thermal induction time was fixed at 12 min, with the increase of thermal induction temperature, the apparent viscosity, G' , G'' , and yield stress of the system showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching the maximum value at 85°C. This was because thermal induction could promote the denaturation of WPI, exposing hydrophobic groups and active sites of protein molecules, which then underwent cross-linking reactions with polysaccharide molecules to form a 3-dimensional network structure. When the temperature was too low (75 or 80°C), WPI denaturation was insufficient, cross-linking reaction was incomplete, and the network structure was loose. When the temperature was too high (90 or 95°C), excessively denatured WPI molecules aggregated, disrupting the uniformity of the system and leading to a decrease in the stability of the network structure.

When the thermal induction temperature was fixed at 85°C with the extension of thermal induction time, the rheological parameters of the system also showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching the maximum value at 12 min. When the thermal induction time was too short (6 or 9 min), the WPI denaturation and cross-linking reactions were insufficient, and the system network structure was incomplete. Excessive heat induction time (15 or 18 min) and cross-linking could lead to network densification and even molecular aggregation, which in turn reduced the rheological stability of the system. Therefore, the optimal thermal induction condition was 85°C for 12 min.

Table 3. 4D Printing performance of polysaccharide protein composite ink

Tabela 3. Wydajność druku 4D kompozytowego materiału polisacharydowo-białkowego

Formulation parameters/ Parametry formuły	Line width error/ Błąd szerokości linii, %	24-h deformation rate/ Stożenie deformacji po 24 h, %	Thermal response deformation rate/ Współczynnik odkształcenia w reakcji na temperaturę (70°C·12 min), %	pH Response deformation rate/ Stożenie deformacji w reakcji na pH (pH 7.5-12 min), %	Printing effect evaluation/ Ocena efektu drukowania
Optimal formula/ Formuła optymalna	3.2 ± 0.5	2.1 ± 0.3	45.2 ± 2.1	52.3 ± 2.4	smooth extrusion, uniform lines, complete shape, no collapse, rapid response/ płynne wytłaczanie, równe linie, kompletny kształt, brak zapadania się, szybka reakcja
KGM:SA = 2:5	6.8 ± 0.8	7.5 ± 0.9	32.6 ± 1.8	41.5 ± 2.1	smooth extrusion, uneven lines, slight collapse, slow response/ płynne wyciskanie, nierówne linie, niewielkie zapadanie się, powolna reakcja
WPI = 4.5 g/100 mL	8.2 ± 1.0	10.3 ± 1.2	28.9 ± 1.6	37.8 ± 1.9	smooth extrusion, loose lines, severe collapse, slow response/ płynne wyciskanie, luźne linie, znaczne zapadanie się, powolna reakcja
Thermal induction at 75°C for 12 min/ Indukcja termiczna w temp. 75°C przez 12 min	7.5 ± 0.9	8.6 ± 1.0	35.3 ± 1.9	43.7 ± 2.2	smooth extrusion, uneven lines, slight collapse, slow response/ płynne wyciskanie, nierówne linie, niewielkie zapadanie się, powolna reakcja

reakcja sieciowania była niekompletna, a struktura sieciowa była luźna. Gdy temperatura była zbyt wysoka (90 lub 95°C), nadmiernie zdenaturowane cząsteczki WPI ulegały agregacji, co zakłócało jednorodność układu i prowadziło do spadku stabilności struktury sieciowej.

Gdy temperaturę indukcji termicznej ustalono na 85°C przy wydłużonym czasie indukcji termicznej, parametry reologiczne układu również wykazywały tendencję do początkowego wzrostu, a następnie spadku, osiągając wartość maksymalną po 12 min. Gdy czas indukcji termicznej był zbyt krótki (6 lub 9 min), reakcje denaturacji i sieciowania WPI były niewystarczające, a struktura sieciowa układu była niekompletna. Zbyt długi czas indukcji termicznej (15 lub 18 min) oraz sieciowanie mogłyby doprowadzić do zagęszczenia sieci, a nawet do agregacji cząsteczek, co z kolei spowodowałoby spadek stabilności reologicznej układu. W związku z tym ustalono, że optymalne warunki indukcji termicznej to temp. 85°C i czas 12 min.

Ocena wydajności drukowania 4D przy użyciu materiału kompozytowego na bazie polisacharydów i białek

Na podstawie wyników optymalizacji właściwości reologicznych jako materiał do zbadania wydajności drukowania 4D wybrano kompozycję przygotowaną w następujących warunkach: stężenie WPI 6,5 g/100 mL, stosunek KGM:SA 3,5:3,5 oraz obróbka termiczna przez 12 min w temp. 85°C. Jednocześnie preparat ten porównano z innymi preparatami, a wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Jak wynika z tabeli 3, materiał kompozytowy przygotowany wg optymalnej receptury charakteryzował się doskonałą

Evaluation of 4D printing performance of polysaccharide protein composite material

Based on the optimization results of rheological properties, the composite ink prepared at WPI concentration of 6.5 g/100 mL, KGM:SA = 3.5:3.5, and at 85°C for 12 min of thermal induction was selected as the optimal formulation to investigate its 4D printing performance. At the same time, it was compared with other formulations, and the results are shown in Table 3.

According to Table 3, the composite material prepared with the optimal formula had excellent 4D printing performance. The line width error was only 3.2±0.5%, indicating high extrusion accuracy and uniform lines. The 24-h deformation rate was 2.1±0.3%, indicating good shape retention and no obvious collapse, which could meet the storage requirements of printed products. The thermal response deformation rate and pH response deformation rate reached 45.2±2.1% and 52.3±2.4%, respectively, indicating good dual stimulus response performance and the ability to achieve programmable shape transformation after printing.

Compared with other formulations, deviations in polysaccharide ratio, WPI concentration, and thermal induction conditions could all lead to a decrease in printing performance. When the KGM:SA ratio was too low, the WPI concentration was too low, or the thermal induction temperature was too low, the rheological properties of the composite system were poor, the network structure was loose, resulting in reduced extrusion accuracy, decreased shape retention, and weakened stimulus response performance. This was because the cross-linking degree of the system was insufficient, making it difficult to achieve

wydajnością w druku 4D. Błąd szerokości linii wyniósł zaledwie $3,2\pm 0,5\%$, co świadczy o dużej dokładności wytłaczania i równomierności linii. Współczynnik odkształcenia w ciągu 24 h wyniósł $2,1\pm 0,3\%$, co wskazuje na dobrą stabilność kształtu i brak widocznego zapadania się i pozwala spełnić wymagania dotyczące przechowywania wydrukowanych produktów; współczynnik odkształcenia w reakcji na temperaturę oraz współczynnik odkształcenia w reakcji na pH wyniosły odpowiednio $45,2\pm 2,1\%$ i $52,3\pm 2,4\%$, co wskazuje na dobrą reakcję na podwójny bodziec oraz zdolność do programowalnej zmiany kształtu po wydrukowaniu.

Wszelkie odchylenia od ustalonych optymalnych warunków otrzymywania układu kompozytowego (w stosunku polisacharydów, stężeniu WPI oraz warunków indukcji termicznej) mogą prowadzić do pogorszenia jakości wydruku. Gdy wartość stosunku KGM:SA była zbyt mała, stężenie WPI zbyt niskie lub zbyt niska temperatura indukcji termicznej, właściwości reologiczne układu kompozytowego były słabe, a struktura sieci luźna, co skutkowało zmniejszoną dokładnością wytłaczania, gorszym zachowaniem kształtu oraz osłabioną reakcją na bodźce. Wynikało to z faktu, że stopień usieciowania układu był niewystarczający, co utrudniało osiągnięcie skutecznej reorganizacji struktury sieciowej pod wpływem bodźców zewnętrznych. Można było zauważyć, że właściwości reologiczne układu kompozytowego były ściśle powiązane z wydajnością drukowania 4D, a optymalizacja właściwości reologicznych była kluczem do poprawy wydajności drukowania 4D.

Wnioski

W badaniach wykorzystano izolat białka serwatkowego jako matrycę białkową, a glukomannan z dziwidła (*Amorphophallus konjac*) i alginian sodu jako polisacharydy kompozytowe w celu stworzenia systemu kompozytowego zawierającego zarówno białko, jak i polisacharydy, który następnie zastosowano jako materiał do drukowania żywności w technologii 4D.

Układ kompozytowy złożony z polisacharydów i białek wykazuje typowe właściwości rozrzedzania przy ścinaniu oraz właściwości elastycznego żelu, co ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia mu dobrego wytłaczania i samonośności. Dzięki eksperymentom z jednym czynnikiem można uzyskać precyzyjną regulację właściwości reologicznych. Właściwości reologiczne układu kompozytowego wykazują istotną dodatnią korelację z wydajnością drukowania 4D. Materiał o optymalnym składzie charakteryzuje się doskonałymi parametrami w drukowaniu 4D, z odchyleniem szerokości linii wynoszącym zaledwie $3,2\pm 0,5\%$ oraz 24-godzinnym współczynnikiem odkształcenia kształtu na poziomie $2,1\pm 0,3\%$. Dodatkowo wykazuje reakcję na bodźce termiczne i pH, osiągając stopień deformacji $45,2\pm 2,1\%$ po 12 min ogrzewania w temp. 70°C oraz $52,3\pm 2,4\%$ po 12 min w roztworze buforowym o pH 7,5.

effective network structure rearrangement under external stimuli. It could be seen that the rheological properties of the composite system were closely related to the 4D printing performance, and optimizing the rheological properties was the key to improving the 4D printing performance.

Conclusion

This study used whey protein isolate (WPI) as the protein matrix, konjac glucomannan (KGM) and sodium alginate (SA) as composite polysaccharides, to construct a dual polysaccharide protein composite system and use it as a 4D food printing material.

The polysaccharide protein composite system presents typical shear thinning behavior and elastic gel properties, which is the core to ensure good extrudability and self-supporting of ink. Through single factor experiments, precise regulation of rheological properties can be achieved. The rheological properties of the composite system are significantly positively correlated with the 4D printing performance. The ink prepared with the optimal formula has excellent 4D printing performance, with a line width error of only $3.2\pm 0.5\%$ and a 24-h shape deformation rate of $2.1\pm 0.3\%$. It also achieves dual thermal/pH stimulation response, with a deformation rate of $45.2\pm 2.1\%$ after 12 min of heating at 70°C and a deformation rate of $52.3\pm 2.4\%$ after 12 min in pH 7.5 buffer solution.

Received/Otrzymano: 07-02-2026

Reviewed/Zrecenzowano: 10-04-2026

Accepted/Zaakceptowano: 13-04-2026

Published/Opublikowano: 27-04-2026

REFERENCES/LITERATURA

- [1] Z.N. An, Z.B. Liu, H.Z. Mo, L.B. Hu, H.B. Li, D. Xu, B. Chitrakar, *J. Food Eng.* 2023, **343**, 111378.
- [2] Y.Y. Cao, T.L. Xia, G.H. Zhou, X.L. Xu, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2012, **16**, 41.
- [3] W. He, N.H. Xiao, Y. Zhao, Y. Yao, M.S. Xu, H.Y. Du, *J. Food Sci.* 2021, **86**, No. 3, 656.
- [4] Y.L. Li, X. Qi, L.Y. Rong, J.W. Li, M.Y. Shen, J.H. Xie, *Food Hydrocolloids* 2024, **147**, 109379.
- [5] Z.B. Liu, S.Y. Ha, C.F. Guo, D. Xu, L.B. Hu, Li, H.Z. Mo, *Food Hydrocolloids* 2024, **146**, 109170.
- [6] X. Ma, M. Yang, Y. He, C.T. Zhai, C.L. Li, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2021, **35**, 1.
- [7] Z.B. Liu, X. Chen, Q.Y. Dai, D. Xu, L.B. Hu, H.B. Li, *Food Hydrocolloids* 2023, **139**, 108497.
- [8] S.K. Leist, J. Zhou, *Virtual Phys. Prototyping* 2016, **11**, No. 4, 249.
- [9] J.M.R. Patino, A.M.R. Pilosof, *Food Hydrocolloids* 2011, **25**, No. 8, 1925.
- [10] A. Le-Bail, B.C. Maniglia, P. Le-Bail, *Current Opinion Food Sci.* 2020, **35**, 54.