



Α.Τ.Ε.Ι. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΡΩΝ
ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΑΜΥΛΟΖΗΣ-ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΟΡΟΥ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Σχολή ΣΤΕΤΡΟ-Δ,
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 ΤΘ 141, Θεσσαλονίκη

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΧΡΥΣΑΦΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΟΥΜΕ ΠΟΛΥ ΤΗΝ ANNA ΜΑΡΙΝΟΥΠΟΥΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ
ΠΟΥ ΜΑΣ ΠΡΟΣΕΦΕΡΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΑΣ
ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δείγματα συμπλόκων αμυλόζης με μυριστικό ή παλμιτικό ή στεατικό οξέα παρασκευάστηκαν στους 70°C παρουσία πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Τα δείγματα μελετήθηκαν με τις τεχνικές της θερμοδομετρίας διαφορικής ανίχνευσης, της φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, της περιθλασιμετρίας ακτίνων X και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε συνδυασμό με στοιχειακή μικροανάλυση ακτίνων X. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της πρωτεΐνης επηρεάζει τη δομή του συστήματος αν και δεν υπήρξαν ενδείξεις διασύνδεσης της με τα σύμπλοκα.

Περιεχόμενα	Σελίδα
1. Εισαγωγή	1
1.1 Γενικά περί αμύλου	1
1.1.1 Αμυλόζη	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	3
2.1 Σχηματισμός, ταυτοποίηση και φυσικοχημικές ιδιότητες συμπλόκων αμυλόζης	3
2.2 Δυνάμεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό συμπλόκων	3
2.3 Οργάνωση λιπιδίων μέσα στην έλικα της αμυλόζης	4
2.4 Κρυσταλλική δομή	5
2.5 Μεθοδολογία σχηματισμού συμπλόκων αμυλόζης	5
2.6 Θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων	7
2.7 Επίδραση του μήκους της αλυσίδας της αμυλόζης, των χαρακτηριστικών και της συγκέντρωσης των λιπιδίων στις ιδιότητες των συμπλόκων	7
2.7.1 Μήκος αλυσίδας της αμυλόζης	7
2.7.2 Τύπος λιπιδίου, μήκος αλυσίδας και βαθμός ακορεστότητας	8
2.7.3 Συγκέντρωση και διαλυτότητα συμπλεκόμενης ένωσης	9
2.8 Λειτουργικότητα συμπλόκων	10
2.8.1 <i>In situ</i> σχηματισμός συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων	10
2.8.2 Σύμπλοκα ως πρόσθετα	12
2.8.3 Αντιοξειδωτική δράση και επηρεασμός στην αντίληψη και την απελευθέρωση αρώματος	12
2.9 Θερμοδυναμική ασυμβατότητα πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών σε διαλύματα	13
2.9.1 Πρωτεΐνες και ανιονικοί πολυσακχαρίτες	13
2.9.2 Πρωτεΐνες και ουδέτεροι πολυσακχαρίτες	14
2.9.3 Πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες με σουλφιδικές ομάδες	14
2.9.4 Ασυμβατότητα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών παρουσία αλάτων	15
2.9.5 Ασυμβατότητα και pH	15
2.9.6 Σύμπλοκα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών	15
3. Σκοπός της εργασίας	17
4. Υλικά – Μέθοδοι	18
4.1 Υλικά – Όργανα	18
4.1.1 Πρώτες ύλες	18
4.1.2 Αντιδραστήρια	18
4.1.3 Όργανα	18
4.2 Εξαγωγή αμυλόζης από αρακά	19
4.3 Προσδιορισμός φαινομενικής αμυλόζης	20
4.4 Σχηματισμός συμπλόκων	21
4.5.Περίθλασιμετρία ακτίνων X	22
4.6. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης	22
4.7. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης	22
4.8.Φασματοσκοπία Υπερύθρου	23

5. Αποτελέσματα και Συζήτηση	24
5.1 SEM-X-ray microanalysis	24
5.2 DSC	25
5.3 XRD	29
5.4 FTIR	32
6. Συμπεράσματα	36
7. Βιβλιογραφία	37

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά περί αμύλου

Το άμυλο, που αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας, είναι κύριο συστατικό των δημητριακών και υπάρχει επίσης στα όσπρια και σε μερικά λαχανικά. Το άμυλο βρίσκεται στα φυτά με τη μορφή κόκκων, των οποίων το μέγεθος και το σχήμα διαφέρει ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Το άμυλο είναι πολυμερές της α-D-γλυκόζης, και συγκεκριμένα αποτελείται από δύο πολυμερή, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Υπάρχουν υβρίδια φυτών τα οποία έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν αμυλόκοκκους με υψηλό ποσοστό είτε σε αμυλόζη είτε σε αμυλοπηκτίνη. Έτσι για παράδειγμα, στο καλαμπόκι υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη, το ποσοστό της αμυλόζης είναι 30-70%. Η αναλογία στην οποία αυτά τα δύο πολυμερή βρίσκονται στους κόκκους του αμύλου επηρεάζει σημαντικά τις λειτουργικές του ιδιότητες (Charley and Weaver, 1998; Autio, 1996).

Στο άμυλο που έχει πηγή προέλευσης τα δημητριακά υπάρχουν λιπίδια σε ποσοστό 0,5 με 1%, ενώ στο άμυλο που δεν προέρχεται από τα δημητριακά το ποσοστό των λιπιδίων είναι ελάχιστο. Επίσης, στο άμυλο υπάρχουν χαμηλά ποσοστά φωσφόρου που βρίσκονται με τη μορφή φωσφολιπιδίων, καθώς επίσης και άζωτο. Μέρος του αζώτου προέρχεται από τα λιπίδια, ενώ το υπόλοιπο είναι πρωτεϊνικό, λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων ενζύμων (Hoseney, 1986).

1.1.1 Αμυλόζη

Μέσα στους κόκκους του αμύλου, τα μόρια της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης μαζί με περιορισμένη ποσότητα νερού οργανώνονται σε μικκύλια. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη είναι πολυμερή της α-D-γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη, όπως και η β-D-γλυκόζη είναι οι δύο κυκλικές δομές με τις οποίες τα μόρια της γλυκόζης υπάρχουν σε ένα διάλυμα, και διαφέρουν μόνο ως προς τον προσανατολισμό των ομάδων υδροξυλίου του πρώτου ατόμου άνθρακα (Zobel and Stephen, 1995; Charley and Weaver, 1998).

Η αμυλόζη, είναι ένα γραμμικό πολυμερές με μοριακό βάρος 250.000 περίπου, στο οποίο τα μόρια της α-D-γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι α-1,4 γλυκοζιτικοί δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ του πρώτου ατόμου άνθρακα του ενός μορίου γλυκόζης και του τέταρτου ατόμου

άνθρακα του άλλου μορίου γλυκόζης, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου νερού. Στο μόριο της αμυλόζης υπάρχουν και διακλαδώσεις, οι οποίες όμως είναι πολύ λίγες και τόσο μακριές, ώστε τελικά το μόριο εμφανίζεται χωρίς να έχει διακλαδώσεις (Hoseney, 1986).

Η γραμμικότητα του μορίου προσδίδει στην αμυλόζη κάποιες μοναδικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα την ικανότητά της να σχηματίζει σύμπλοκα με το ιώδιο, τις οργανικές αλκοόλες ή τα οξέα. Παρουσία αυτών των μορίων η αμυλόζη αποκτάει το σχήμα έλικας, μέσα στην οποία προσαρμόζονται τα παραπάνω μόρια. Η αμυλόζη μπορεί να κατακρημνιστεί από ένα διάλυμα αμύλου, με την προσθήκη n-βουτυλικής αλκοόλης. Η αλκοόλη σε αυτήν την περίπτωση σχηματίζει με την αμυλόζη ένα αδιάλυτο σύμπλοκο, το οποίο έχει παρόμοια φύση με το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ ιωδίου και αμυλόζης. Επίσης, τα μόρια της αμυλόζης μπορούν να συμπλέκονται μεταξύ τους και να κατακρημνίζονται από ένα διάλυμα. Εξαιτίας της έντονης τάσης για δημιουργία συμπλόκων, είναι δύσκολος ο χειρισμός της αμυλόζης, η οποία για να παραμείνει σε ένα διάλυμα θα πρέπει το pH να είναι υψηλό. Τότε, στις ομάδες υδροξυλίου των γειτονικών αλυσίδων της συγκεντρώνονται θετικά φορτία, με αποτέλεσμα αυτές να απωθούνται μεταξύ τους, και με τον τρόπο αυτόν αποφεύγεται η κατακρήμνισή τους (Hoseney, 1986; Charley and Weaver, 1998).

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Σχηματισμός, ταυτοποίηση και φυσικοχημικές ιδιότητες συμπλόκων αμυλόζης

Πολλές ουσίες με γραμμικά μόρια μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με την αμυλόζη, μεταξύ αυτών είναι και λιπίδια όπως λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και μονογλυκερίδια με μακριά ανθρακική αλυσίδα. Η παρουσία τους προκαλεί αλλαγή μοριακής διαμόρφωσης κατά την οποία συμβαίνει η μεταμόρφωση της διπλής έλικας της αμυλόζης σε μονή έλικα. Η προκύπτουσα V-αμυλόζη (όπως ονομάζεται η συμπλεγμένη αμυλόζη) έχει μορφή μονών αριστερόστροφων ελίκων, είναι συμπαγής και έχει μια κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα, μέσα στην οποία η αλυσίδα του φιλοξενούμενου μορίου, κατά την συμπλοκοποίηση, εδράζεται. Όμως κάθε σύστημα παρουσιάζει τις δικές του συγκεκριμένες μορφές όπως περιγράφεται για σύμπλοκα αμυλόζης με ιώδιο, υδροξείδιο του καλίου και διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO). Έτσι η διάμετρος της έλικας και οι διαστάσεις της προσδιορίζονται από την συμπλεκόμενη ένωση και την ποσότητα του νερού, η οποία είναι δεσμευμένη στις μονάδες γλυκόζης (Putseys et al., 2010).

2.2 Δυνάμεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό συμπλόκων

Η παρουσία μιας κατάλληλης συμπλεκόμενης ουσίας προκαλεί μια συμπαγή ελικοειδή διαμόρφωση της αμυλόζης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας έλικας, με μια υδροφοβική κοιλότητα στην οποία εγκαθίστανται τα άπολα μέρη των φιλοξενούμενων μορίων. Μετά από αυτή την αρχική μοριακή σύνδεση μεταξύ της αμυλόζης και της συμπλεκόμενης ουσίας και αναλόγως τις συνθήκες αντίδρασης, τα δημιουργούμενα σύμπλοκα μπορεί να αποκτήσουν, κατά ένα βαθμό, συγκεκριμένη διάταξη με αποτέλεσμα τη δημιουργία κρυστάλλων.

Η συμπλοκοποίηση μεταξύ αμυλόζης και ενός συμπλεκόμενου μορίου είναι αντιστρέψιμη διαδικασία. Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) των συμπλόκων δείχνει μια ενδόθερμη αντίδραση κατά την θέρμανση και μια εξώθερμη κατά την ψύξη. Η ανάγκη παροχής θερμότητας για τη διάσπαση του συμπλοκου, μεταξύ αμυλόζης και της συμπλεκόμενης ένωσης, υποδηλώνει ότι υπάρχουν συγκεκριμένες δυνάμεις οι οποίες σταθεροποιούν τη διαμόρφωση της έλικας. Ενδομοριακοί δεσμοί, όπως οι van der Waals δυνάμεις και δεσμοί υδρογόνου,

συμβαίνουν μεταξύ των στροφών κατά μήκος της έλικας και σταθεροποιούν τη μονή ελικοειδή αλυσίδα. Αντιθέτως, διαμοριακές δυνάμεις σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ της αμυλόζης και της συμπλεκόμενης ένωσης. Η αλυσίδα της αμυλόζης είναι υδρόφιλη στο εξωτερικό της μέρος και υδρόφοβη στην εσωτερική κοιλότητα, κάτι το οποίο ευνοεί τη δημιουργία υδρόφοβων επιδράσεων. Όμως έχει προταθεί επίσης, ότι οι van der Waals αλληλεπιδράσεις μπορούν να γίνουν μόνο μεταξύ των μεθυλικών ομάδων των λιπιδίων και του υδρογόνου του 5^{ου} άνθρακα της γλυκόζης (Putseys et al., 2010).

2.3 Οργάνωση λιπιδίων μέσα στην έλικα της αμυλόζης

Θεωρητικά 18 έως 24 μονάδες γλυκόζης απαιτούνται για τη συμπλοκοποίηση ενός μορίου λιπιδίου οργανωμένο σε τρεις στροφές, με το κάθε βήμα (η απόσταση μεταξύ ομοίων σημείων σε δύο διαδοχικές στροφές) να περιέχει 6 έως 8 μόρια γλυκόζης. Κάποιες εξωτερικές διακλαδώσεις της αμυλοπηκτίνης έχουν μέσο μήκος αλυσίδας από 15 έως 25 μονάδες γλυκόζης και έτσι δυνητικά μπορούν μερικώς να συμμετάσχουν στο σχηματισμό των συμπλόκων, όπως πιστεύεται ότι έχει παρατηρηθεί σε άμυλα χωρίς αμυλόζη. (SLADE, L. and LEVINE, H. (1987).

Βασισμένο σε μοριακές αναλογίες αμυλόζης και μονοπαλμιτικής γλυκερόλης (GMP), υπολογίστηκε ότι μια μακριά αλυσίδα αμυλόζης (με βαθμό πολυμερισμού 900) μπορεί να περιέχει 10 έως 12 έλικες, με την κάθε έλικα να δεσμεύει τουλάχιστον ένα αλλά και συχνά δύο μόρια GMP. Επίσης έχει προταθεί ότι το κρίσιμο μέγεθος της αμυλόζης για σχηματισμό συμπλόκου, είναι το μήκος το οποίο απαιτείται για να φιλοξενήσει δύο μόρια λιπαρών οξέων (30 έως 40 μονάδες γλυκόζης απαιτούνται για την συμπλοκοποίηση παλμιτικού οξέος, ενώ 20 έως 30 μόρια γλυκόζης φαίνεται να είναι αρκετά για το λαυρικό οξύ).

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι στα περισσότερα σύμπλοκα αμυλόζης-λιπιδίων, τα μόρια των λιπιδίων βρισκονται με την αλειφατική τους αλυσίδα μέσα στην κοιλότητα της έλικας και με τις τερματικές μεθυλικές ομάδες να βρίσκονται απέναντι (Putseys et al., 2010).

2.4 Κρυσταλλική δομή

Η ημικρυσταλλική δομή τύπου II των συμπλόκων αμυλόζης είναι σε διάταξη lamella, σε αντίθεση με την τυχαία διάταξη του τύπου I. Οπότε απαιτούν μεγαλύτερη θερμοκρασία διάσπασης (από αυτά του τύπου I) και παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο περίθλασης ακτίνων X με κορυφές στις $7,5^\circ$, 13° , 20° (2θ). Όμως σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας οι κορυφές παρουσιάζουν μικρότερες γωνίες [$6,9^\circ$, 12° , $18,5^\circ$ (2θ)], με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας εκδοχής E-αμυλόζης.

Τα ημικρυσταλλικά σύμπλοκα έχουν ελικοειδή τμήματα αλυσίδας, διατεταγμένα σε δομές με διαστάσεις έως και 14,5 nm. Μετά τη συμπλοκοποίηση της συμπλεκόμενης ένωσης, γίνεται περαιτέρω συσσωμάτωση των ελίκων στη μορφή της lamella. Η παρατηρούμενη διπλοθλαστικότητα και το πάχος της lamellae (7,5 έως 10 nm) υποδηλώνει ότι υπάρχει αναδίπλωση της αλυσίδας στην ίδια ή στην επόμενη lamella.

Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι οι έλικες αμυλόζης είναι προσανατολισμένες κάθετα στη μορφή της lamella. Πως όμως αυτές οι δομές της lamella είναι οργανωμένες περαιτέρω, δεν είναι κατανοητό. Εάν οι κρύσταλλοι είναι διατεταγμένοι σε εξαγωνικές δομές πάχους 10 nm ή εάν είναι σφαιρικά ή ακτινικά στοιβαγμένες δεν είναι ξεκάθαρο (Putseys et al., 2010).

2.5 Μεθοδολογία σχηματισμού συμπλόκων αμυλόζης

Έχουν περιγραφεί τρεις κύριες κατηγορίες μεθόδων που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό συμπλόκων αμυλόζης. Οι μέθοδοι αυτοί είναι:

- 1) Αρχίζοντας από άμυλο και συμπλεκόμενη ένωση
- 2) Αρχίζοντας από αμυλόζη και συμπλεκόμενη ένωση
- 3) Συνθέτοντας αμυλόζη υπό την παρουσία συμπλεκόμενης ένωσης

Με το να προσθέτουμε συμπλεκόμενες ενώσεις σε ένα αιώρημα αμύλου και θερμαίνοντας, μπορεί να προκύψει *in situ* συμπλοκοποίηση, κατά τη διάρκεια ζελατινοποίησης του αμύλου. Οι αλυσίδες αμυλόζης θα πρέπει να έχουν αποκτήσει αρκετή κινητικότητα ώστε να αντιδράσουν με τις συμπλεκόμενες ενώσεις, οι οποίοι

πρέπει να βρίσκονται στην κατάλληλη φάση. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται επηρεάζει τη διαλυτότητα και του αμύλου και της συμπλεκόμενης ένωσης.

Η συμπλοκοποίηση στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου, με την αμυλόζη να διαχέεται εκτός κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης, έχει επίσης παρατηρηθεί.

Καθαρά σύμπλοκα αμυλόζης μπορούν να σχηματιστούν με διάλυση αμυλόζης, η οποία έχει εκχυλιστεί από άμυλο, μέσα σε DMSO ή σε αλκαλικά διαλύματα και αναμιγνύοντας την με την επιθυμητή συμπλεκόμενη ένωση. Στην περίπτωση χρησιμοποίησης DMSO η αμυλόζη διαλύεται μέσα σε θερμό DMSO, το οποίο στη συνέχεια αραιώνεται σε βραστό νερό. Μετά την εξισορρόπηση του αιωρήματος στην επιθυμητή θερμοκρασία, η συμπλεκόμενη ένωση, αφού έχει διαλυθεί σε θερμή αλκοόλη ή θερμό νερό, προστίθεται σταγονομετρικά. Το μίγμα αυτό κρατείται σε αυξημένη θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρόνο και μετά αφήνεται να ψυχθεί, με αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα την καθίζηση των σχηματισμένων συμπλόκων αμυλόζης.

Στη μέθοδο που χρησιμοποιούνται αλκαλικά διαλύματα, η αμυλόζη διαλύεται σε 0,01 M KOH με επακόλουθη την προσθήκη της συμπλεκόμενης ένωσης στο ίδιο διάλυμα. Μετά από εξουδετέρωση, το μίγμα ψύχεται αργά και παραμένει σε ακινησία για μία ημέρα.

Οι εκχυλισμένες αλυσίδες αμυλόζης, που σχηματίζονται και με τις δύο μεθόδους, είναι πιθανότατα πολύ μακριές για να σχηματίσουν σύμπλοκα και γι'αυτό μπορεί να παρουσιάζονται ελεύθερα άκρα. Ανάλογα την προέλευση και τις ιδιότητες της αμυλόζης και οι δύο μέθοδοι έχουν ως αποτέλεσμα δημιουργία συμπλόκων αμυλόζης με διαφορετικού μήκους αλυσίδα .

Σύμπλοκα αμυλόζης μπορούν επίσης να σχηματιστούν χρησιμοποιώντας φωσφορυλάση της πατάτας. Το ένζυμο αυτό επιμηκύνει μια αρχική μικρού μήκους αλυσίδα , όπως η μαλτοεξόζη ή η μαλτοεπταόζη, με μεταφορά της γλυκόζης της φωσφορικής-1-γλυκόζης στο μη αναγωγικό άκρο της αρχικής αλυσίδας. Όταν συμβαίνει αυτή η αντίδραση υπό την παρουσία κατάλληλης συμπλεκόμενης ένωσης, οι αλυσίδες αμυλόζης που δημιουργούνται συμπλοκοποιούνται μαζί της και ακολουθεί καθίζηση. Για πολυεστέρες ή νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος, η αμυλόζη συντίθεται γύρω από την μεγάλου μήκους συμπλεκόμενη ένωση. Για ενώσεις μικρότερου μήκους όπως τα λιπίδια, οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις με την αμυλόζη δεν είναι ακόμα ξεκάθαρες (Putseys et al., 2010).

2.6 Θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων

Τα σύμπλοκα αμυλόζης μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ξεχωριστές καταστάσεις. Στην λιγότερη διατεταγμένη κατάσταση τύπου I και στην ημικρυσταλλική κατάσταση τύπου II.

Σύμπλοκα τύπου I σχηματίζονται κάτω από 60 °C και αποτελούνται από μεμονωμένα ελικοειδή τμήματα, τα οποία είναι τυχαία προσανατολισμένα. Χαμηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα υψηλό ρυθμό πυρηνογένεσης, κάτι το οποίο οδηγεί στο γρήγορο πάγωμα των ελικών στη θέση τους, με αποτέλεσμα μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας (εάν υπάρχει και αυτός). Αυτού του είδους τα σύμπλοκα διασπώνται μεταξύ 95 °C και 105 °C.

Αντιθέτως τα σύμπλοκα τύπου II, παραλαμβάνονται με θέρμανση του μίγματος της αμυλόζης σε υψηλότερες θερμοκρασίες (τουλάχιστον 90 °C). Υπό αυτές τις συνθήκες, ο ρυθμός πυρηνογένεσης είναι χαμηλός επιτρέποντας επαρκή διάδοση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δομών με σαφώς καθορισμένες κρυσταλλικές δομές. Τα σύμπλοκα τύπου II μπορούν επιπλέον να υποδιαιρεθούν σε τύπου II_α και II_β. Τα ημικρυσταλλικά τύπου II_α σύμπλοκα, τήκονται περίπου στους 115 °C και μπορούν να ανοιπηθούν περαιτέρω ώστε να σχηματίσουν περισσότερο θερμοσταθερά σύμπλοκα τύπου II_β με το να τήκονται και να ανακρυσταλλώνονται (Putseys et al., 2010).

2.7 Επίδραση του μήκους της αλυσίδας της αμυλόζης, των χαρακτηριστικών και της συγκέντρωσης των λιπιδίων στις ιδιότητες των συμπλόκων

2.7.1 Μήκος αλυσίδας της αμυλόζης

Ο βαθμός πολυμερισμού της αμυλόζης έχει επιπτώσεις στις ιδιότητες των συμπλόκων. Μακριές αλυσίδες αμυλόζης μπορούν να συμπλοκοποιήσουν περισσότερα μόρια λιπιδίων και έτσι να δώσουν κρυστάλλους με υψηλότερες θερμοκρασίες τήξης. Η θερμοκρασία τήξης, η σταθερότητα, το μέγεθος των κρυστάλλων και ο βαθμός οργάνωσης των συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων αυξάνονται με την αύξηση της αλυσίδας της αμυλόζης. Όμως εάν οι αλυσίδες είναι πολύ μακριές, τότε παρουσιάζονται δομικές διαταραχές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσία σφαλμάτων στην ημικρυσταλλική δομή. Αντιθέτως, εάν

είναι πολύ κοντές μπορούν να διαταράξουν τον σχηματισμό των κρυστάλλων. Συγκεκριμένα η αλυσίδα αμυλόζης με βαθμό πολυμερισμού 20 είναι πολύ κοντή και δεν μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με λιπίδιο, ενώ η αμυλόζη με βαθμό πολυμερισμού 60 δεν μπορεί να διαταχθεί στα περισσότερα οργανωμένα τύπου II σύμπλοκα (Putseys et al., 2010).

2.7.2 Τύπος λιπιδίου, μήκος αλυσίδας και βαθμός ακορεστότητας

Όχι μόνο η αλυσίδα της αμυλόζης αλλά και επίσης και το μήκος της αλυσίδας του λιπιδίου, ο βαθμός ακορεστότητας και η ταυτότητα του πολικού άκρου έχουν επίπτωση στις ιδιότητες των συμπλόκων. Η θερμοκρασία διάσπασης συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων αυξάνεται με το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας του λιπιδίου. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρότερης υδροφιλικότητας των μακρύτερων λιπιδικών αλυσίδων που τους επιτρέπει να διευθετηθούν μέσα στην υδρόφοβη ελικοειδή κοιλότητα. Οι μακρύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες επιτρέπουν περισσότερες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το εσωτερικό της έλικας, απαιτώντας υψηλότερες θερμοκρασίες για την διάσπαση των δεσμών αυτών. Λιπίδια με μήκος αλυσίδας των 10 ή λιγότερων ατόμων άνθρακα, εμφανίζονται να είναι πολύ κοντά για να δημιουργήσουν σύμπλοκα, ίσως επειδή είναι πολύ διαλυτά σε υδατικό περιβάλλον ώστε να παραμείνουν στην υδρόφοβη κοιλότητα της έλικας.

Το αν λιπίδια με 14 άτομα άνθρακα ή λιπίδια με 16 και 18 άτομα άνθρακα μπορούν να δημιουργήσουν πιο εύκολα σύμπλοκα με την αμυλόζη δεν είναι εξακριβωμένο.

Επίσης ο αριθμός των διπλών δεσμών στη λιπιδική αλειφατική αλυσίδα επηρεάζει σημαντικά τις θερμικές ιδιότητες των συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων. Όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός ακορεστότητας, τόσο μικρότερη είναι η θερμική σταθερότητα του συμπλόκου.

Ο τύπος του λιπιδίου επίσης επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του συμπλόκου. Λιπαρά οξέα, μονο και δι-ακυλογλυκερόλες μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με την αμυλόζη, ενώ αντιθέτως τριακυλικά λιπίδια δεν μπορούν. Τα σύμπλοκα με λιπαρά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα από αυτά με μονοακυλογλυκερόλη. Το γεγονός αυτό έχει να κάνει με την ικανότητα των λιπαρών οξέων να εισχωρούν βαθύτερα μέσα στην έλικα και έτσι σταθεροποιούνται σε

μεγαλύτερο βαθμό. Όμως μόνο μονοακυλογλυκερόλες με κοντή αλειφατική αλυσίδα (10 έως 12 άτομα άνθρακα) μπορούν εύκολα να σχηματίσουν ημικρυσταλλικά σύμπλοκα, ενώ τα λιπαρά οξέα δεν μπορούν (Putseys et al., 2010).

2.7.3 Συγκέντρωση και διαλυτότητα συμπλεκόμενης ένωσης

Η συγκέντρωση της συμπλεκόμενης ένωσης και η διαλυτότητά της καθορίζουν το βαθμό σχηματισμού συμπλόκων. Αρκετοί συγγραφείς δηλώνουν ότι ένα σύμπλοκο καθιζάνει μόνο όταν κορεστεί η αλυσίδα της αμυλόζης. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η αναλογία συμπλεκόμενης ένωσης και αμυλόζης είναι καθοριστικός παράγοντας επηρεασμού των χαρακτηριστικών του συμπλόκου. Κατά μέσο όρο, 10 % σε λιπίδιο είναι αρκετό για να την συμπλοκοποίηση όλων των μόνιμων αμυλόζης, όμως αυτό δεν είναι πάντα δυνατό λόγω πιθανής στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση αυτή, τα μη συμπλοκοποιημένα μόρια λιπιδίου μπορούν να παγιδευτούν στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των ελικών. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συμπλεκόμενης ένωσης, η αμυλόζη μπορεί να υιοθετήσει μια διαμόρφωση διπλής έλικας η οποία οδηγεί σε ανταγωνισμό με τη διαμόρφωση μονής έλικας που απαιτείται για τα σύμπλοκα. Όσο μακρύτερες είναι οι αλυσίδες αμυλόζης, τόσο πιο γρήγορα συμπλοκοποιούνται με ενώσεις χαμηλής συγκέντρωσης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συμπλεκόμενης ένωσης, μικρότερες αλυσίδες επίσης συμμετέχουν στην συμπλοκοποίηση. Όμως μεγάλες συγκεντρώσεις οδηγούν σε λιγότερο συγκεκριμένους δεσμούς, με την αμυλοπηκτίνη πιθανότατα να μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση. Για συμπλοκοποίηση ιονικών συμπλεκόμενων ενώσεων, όπως δωδεκα-τριμεθυλο-βρωμιούχο-αμμώνιο, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ένωσης οδηγούν σε πιο δύσκολη στοίβαξη και έτσι οδηγούν σε σύμπλοκα με μικρότερες θερμοκρασίες διάσπασης, λόγω των απωστικών ιονικών δυνάμεων που υπάρχουν.

Τέλος, η συμπλεκόμενη ένωση πρέπει να βρίσκεται σε διάλυμα ώστε να αντιδράσει με την αμυλόζη. Έτσι η διαλυτότητά της είναι καθοριστικός παράγοντας στη συμπλοκοποίηση της με την αμυλόζη (Putseys et al., 2010).

2.8 Λειτουργικότητα συμπλόκων

2.8.1 *In situ* σχηματισμός συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων

Αντιδράσεις μεταξύ λιπιδίου και αμύλου μειώνουν την ικανότητα διόγκωσης του αμύλου, την διαλυτότητα και την διάρρηξη των αμυλοκόκκων κατά την ζελατινοποίηση. Επίσης αυξάνουν την θερμοκρασία ζελατινοποίησης. Επιπλέον εξωγενή καθαρά λιπίδια μπορούν να σχηματίσουν ένα αδιάλυτο στρώμα γύρω από τους κόκκους, αποτρέποντας την είσοδο του νερού. Όμως *in situ* συμπλοκοποίηση μεταξύ αμυλόζης και λιπιδίων, είτε στην επιφάνεια, είτε στο εσωτερικό των κόκκων, συμβάλλουν στην παρουσία των φαινομένων αυτών κυρίως λόγω αποτροπής της εξόδου διαλυτών υδατανθράκων. Όσο μεγαλύτερη είναι η αλυσίδα του λιπιδίου και όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωσή του, τόσο περισσότερο καθυστερεί η επικόλληση και η ζελατινοποίηση του εναιωρήματος αμύλου. Η συμπεριφορά των συμπλεκόμενων ενώσεων, που συμπλοκοποιούνται με την αμυλόζη κατά τον σχηματισμό πηκτής από άμυλο, εξαρτάται από το μήκος αλυσίδας της ένωσης σε σχέση με την αμυλόζη που περιέχεται στο άμυλο και την ποσότητα του νερού που περιέχεται στο σύστημα. Έχουν παρατηρηθεί διαφορετικές επιπτώσεις στο ιξώδες και στην ζελατινοποίηση του αμύλου σε σχέση με την ένωση που προστίθεται. Από τη μία η προσθήκη συστατικών ενσωμάτωσης μπορεί να περιορίσει τη διόγκωση των κόκκων και ακολούθως να μειώσει το μέγιστο και το τελικό ιξώδες. Το μέγεθος αυτής της μεταβολής εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας και την πολικότητα της συμπλεκόμενης ένωσης. Από την άλλη, τα σύμπλοκα αμυλόζης μπορούν να λειτουργήσουν ως ζώνες διακρυσταλλικών κόμβων οι οποίοι ευνοούν την ζελατινοποίηση και έτσι οδηγούν σε αύξηση του ιξώδους. Όμως δεν είναι ξεκάθαρο εάν η αύξηση του ιξώδους κατά την προσθήκη μιας ένωσης συμπλοκοποίησης αμύλου είναι παρατηρήσιμη μόνο κατά την περίοδο ψύξης ή για το τελικό σημείο ιξώδους. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμύλου, η προσθήκη γαλακτωματοποιητών ή συστατικών γεύσης και η επακόλουθη συμπλοκοποίησή τους με την αμυλόζη, βοηθά τη ζελατινοποίηση. Το διακρυσταλλικό πλέγμα, το οποίο αποτελείται από σύμπλοκα αμυλόζης, παρέχει φυσικές διασυνδέσεις μεταξύ υπολειματικών κόκκων αυξάνοντας έτσι τον βαθμό ζελατινοποίησης και το ιξώδες. Σε πηκτές όμως με μεγάλες συγκεντρώσεις αμύλου η συμπλοκοποίηση είτε από γαλακτωματοποιητές, είτε από συστατικά γεύσης περιορίζει την κρυστάλλωση κατά την ψύξη, με αποτέλεσμα την

παρουσία ασθενέστερων πηκτών αμύλου όταν οι συμπλεκόμενες ενώσεις είναι παρούσες.

Ο σχηματισμός των συμπλόκων μειώνει την διαλυτότητα και την κινητικότητα της αμυλόζης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη στερεοχημική παρεμπόδιση που παρουσιάζεται λόγω συμπλοκοποίησης, αποτρέπει τον σχηματισμό αμυλόζης διπλής έλικας και την κρυστάλλωση της. Οι διπλές έλικες αμυλόζης μπορούν να λειτουργήσουν ως πυρήνες για αναδιάταξη, με το να κρυσταλλώνουν μαζί με την αμυλοπηκτίνη. Η αναδιάταξη σε αυτή την περίπτωση, ορίζεται ως ανακρυστάλλωση των πλευρικών αλυσίδων της αμυλοπηκτίνης. Η προσθήκη λιπιδίων μπορεί να επηρεάσει την διεργασία με δύο τρόπους. Πρώτον τα σύμπλοκα αμυλόζης-λιπιδίων μπορούν να αποτρέψουν την συνεργιστική κρυστάλλωση με την αμυλοπηκτίνη και δεύτερον τα λιπίδια δυνητικά μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με τις εξωτερικές διακλαδώσεις της αμυλοπηκτίνης και έτσι να αναστείλουν την αναδιάταξη με έναν πιο άμεσο τρόπο. Η επίδραση των επιφανειοδραστικών ουσιών ή των γαλακτωματοποιητών στην ανάπτυξη της δομής του ψωμιού έχει συζητηθεί εκτεταμένα. Δεν έχει βγει συμπέρασμα όμως εάν τα πρόσθετα αυτά μειώνουν την αρχική σκληρότητα της ψύχας ή εάν μειώνουν το βαθμό μπαγιατέματος του ψωμιού.

Η προσθήκη λιπιδίων σε ένα σύστημα που περιέχει άμυλο, είναι αφορμή έναρξης ανταγωνισμού μεταξύ συμπλοκοποίησης αμυλόζης-λιπιδίων και της κρυστάλλωσης της αμυλόζης. Η κρυσταλλική αμυλόζη αποτελείται από διπλές έλικες και είναι συνήθως το κύριο μέρος αντίστασης του αμύλου μετά τη θέρμανση και την ψύξη ενός δείγματος αυτού. Οι περισσότερες συμπλεκόμενες ενώσεις, κατάλληλες για συμπλοκοποίηση, ευνοούν τη δημιουργία αμυλόζης μονής έλικας (V-αμυλόζη) και στη συνέχεια το φαινόμενο της συμπλοκοποίησης. Όμως η υδροξυλιωμένη λυσολεκιθίνη ευνοεί την κρυστάλλωση της αμυλόζης. Τα σύμπλοκα αμυλόζης τα οποία σχηματίζονται, είναι λιγότερο ευπαθή σε ενζυμική διάσπαση και μπορεί να θεωρηθούν ως μέρος του ανθεκτικού τμήματος του αμύλου. Έτσι πρόσφατα δείγματα αμύλου τα οποία περιέχουν ενώσεις συμπλοκοποίησης, υδρολύονται σε χαμηλότερο βαθμό από τα δείγματα με απουσία αυτών. Όταν όμως αφήνονται να αναδιαταχθούν για μερικές ημέρες, το μέρος των δειγμάτων που περιέχει τα πρόσθετα υδρολύεται σε μεγαλύτερο βαθμό, διότι στην περίπτωση αυτή έχει σχηματισθεί άμυλο με μικρότερη αντίσταση.

Συμπερασματικά, αν και άμυλο που ευκολότερα διασπάται, σχηματίζεται με προσθήκη συμπλεκόμενης με την αμυλόζη ένωσης, τα σύμπλοκα που σχηματίζονται είναι από μόνα τους λιγότερο αποικοδομήσιμα από την άμορφη αμυλόζη και σε μερικές περιπτώσεις θεωρούνται ως διαιτητικές ίνες. (Putseys et al., 2010).

2.8.2 Σύμπλοκα ως πρόσθετα

Ο σχηματισμός συμπλόκων είναι τεχνολογικής σημασίας. Συγκεκριμένα κατά το ψήσιμο η ενσωμάτωση λιπαρών οξέων μονογλυκεριδίων στη ζύμη είναι γνωστό ότι επιβραδύνει το μπαγιάτεμα του ψωμιού. Μονογλυκερίδια επίσης προσθέτονται σε αφυδατωμένους κόκκους πατάτας που χρησιμοποιούνται για στιγμιαίο πουρέ, ώστε να αποτρέψουν την αύξηση του κολλώδους.

Σύμπλοκα αμυλόζης-λιπιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετα σπάνια. Έχει αναφερθεί όμως ότι επηρεάζουν την αναδιάταξη του αμύλου θετικά μόνο μετά από προηγηθείσα θέρμανση, δηλαδή έχουν διασπαστεί πριν εισαχθούν σε συστήματα που περιέχουν άμυλο. Έτσι τα λιπίδια πρέπει να καταστούν διαθέσιμα για αντίδραση ώστε να επηρεάσουν τα συστήματα αμύλου. Μερική στερεοχημική παρεμπόδιση που συμβαίνει λόγω παρουσίας συμπλόκου, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μικρότερο βαθμό κρυστάλλωσης των εξωτερικών διακλαδώσεων της αμυλοπηκτικής αλλά το φαινόμενο αυτό είναι πολύ μικρότερο όταν συγκρίνεται με αυτό της ασυμπλοκοποίητης συμπλεκόμενης ένωσης.

Συνδυασμός καθαρών λιπιδίων και συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί σαν πρόσθετα σε πηκτές αμύλου. Σε αντίθεση με γαλακτωματοποιητές, τα πρόσθετα αυτά σχημάτισαν πηκτές που παρέμειναν σταθερές κατά την σε κύκλους θέρμανση-ψύξη. Αυτό συμβαίνει λόγω της απελευθέρωσης των συμπλεκόμενων ενώσεων κατά τη θέρμανση (Raphaelides, 1986; Putseys et al., 2010).

2.8.3 Αντιοξειδωτική δράση και επηρεασμός στην αντίληψη και την απελευθέρωση αρώματος

Το άρωμα προϊόντων που περιέχουν άμυλο μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από την οξείδωση. Η συμπλοκοποίηση της αμυλόζης μπορεί να προστατέψει μόρια ευαίσθητα στην οξείδωση, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (συζευγμένο λινολεϊκό

οξύ, βιταμίνες). Η ενθυλάκωση μέσα σε σύμπλοκα αμυλόζης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την σταθεροποίηση πτητικών συστατικών αρώματος (αρωματικά μόρια) αυξάνοντας έτσι την διατήρησή τους (Putseys et al., 2010).

2.9 Θερμοδυναμική ασυμβατότητα πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών σε διαλύματα

Η θερμοδυναμική ασυμβατότητα πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών είναι γενικής φύσεως. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται υπό συνθήκες οι οποίες αναστέλλουν την συμπλοκοποίηση μεταξύ τους και οι οποίες προωθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ μακρομορίων του ίδιου τύπου (π.χ. αυτό-οργάνωση βιοπολυμερών). Οι συνθήκες για ασυμβατότητα εξαρτώνται από τη δομή και τη σύνθεση ενός συγκεκριμένου βιοπολυμερικού ζεύγους. Η ασυμβατότητα μειώνεται με την ακόλουθη σειρά: πολυσακχαρίτες που περιέχουν καρβοξύλια > ουδέτεροι πολυσακχαρίτες > πολυσακχαρίτες που περιέχουν σουλφιδικές ομάδες. Συνήθως οι γραμμικοί πολυσακχαρίτες είναι περισσότερο ασύμβατοι με τις πρωτεΐνες σε σχέση με τους διακλαδισμένους. Η διαφορά στην υδροφιλικότητα μεταξύ πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών (το λεγόμενο Δχ φαινόμενο), είναι μεγάλης σημασίας για την ισορροπία φάσεων σε συστήματα πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη-νερού και επηρεάζει σημαντικά το φαινόμενο αυτό.

Όλα τα παραπάνω σημαίνουν ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες κάθε σύστημα πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη-νερού, διαχωρίζεται αυθόρμητα σε δύο υγρές φάσεις ως αποτέλεσμα του διαχωρισμού της πρωτεΐνης και του πολυσακχαρίτη. Οι συνθήκες οι οποίες απαιτούνται για τον διαχωρισμό φάσης ποικίλουν ανάλογα τη δομή, τη σύνθεση, το μοριακό βάρος και τη διαμόρφωση των βιοπολυμερών (Grinberg and Tolstoguzov, 1997).

2.9.1 Πρωτεΐνες και ανιονικοί πολυσακχαρίτες

Οι πρωτεΐνες και οι ανιονικοί πολυσακχαρίτες δυνητικά μπορούν να αλληλεπιδράσουν σχηματίζοντας διαλυτά και αδιάλυτα ενδοπολυηλεκτρονικά σύμπλοκα. Η συμπλοκοποίηση αναστέλλεται σε σημαντικά υψηλή ιονική ισχύ, όπως και σε τιμές pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Το τελευταίο

αντιστοιχεί σε συνθήκες όπου και τα δύο βιοπολυμερή φέρουν όμοια δίκτυα αρνητικά φορτισμένα (like negative net charges). Ως εκ τούτου η θερμοδυναμική ασυμβατότητα μεταξύ πρωτεϊνών και ανιονικών πολυσακχαριτών παρατηρείται σε τιμές pH πάνω του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών ή σε αρκετά υψηλή ιονική ισχύ (Grinberg and Tolstoguzov, 1997).

2.9.2 Πρωτεΐνες και ουδέτεροι πολυσακχαρίτες

Παρομοίως οι πρωτεΐνες και οι ουδέτεροι πολυσακχαρίτες, μπορούν να σχηματίσουν ασθενή διαβιοπολυμερή σύμπλοκα σε συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος και σε τιμές pH διαφορετικές από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Αυτά τα διαβιοπολυμερή σύμπλοκα δεν είναι σταθερά σε σχετικά υψηλή ιονική ισχύ, ούτε και υπό την παρουσία ουρίας. Λόγω αυτών, τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-ουδέτερων πολυσακχαριτών μοιάζουν πολύ με αυτά των πρωτεϊνών-ανιονικών πολυσακχαριτών. Η ομοιότητα αυτή είναι μη αναμενόμενη καθώς οι ουδέτεροι πολυσακχαρίτες δεν περιέχουν ιοντικές ομάδες (Grinberg and Tolstoguzov, 1997).

2.9.3 Πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες με σουλφιδικές ομάδες

Συνήθως οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες με σουλφιδικές ομάδες, είναι πλήρως συμβατοί σε μεγάλο εύρος τιμών pH. Σε χαμηλές τιμές pH φαίνονται να είναι απολύτως συμβατά, ενώ με την αύξηση του pH ενισχύεται η ασυμβατότητά τους. Το τελευταίο φαίνεται να είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού διαλυτών συμπλόκων πολυσακχαριτών-πρωτεΐνης σε τιμές pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει κυρίως, λόγω σχηματισμού ιονικών ζευγών μεταξύ των ιονισμένων σουλφιδικών ομάδων του πολυσακχαρίτη και των αμινομάδων των πρωτεϊνών. Όμως όταν το pH αυξάνεται, ο βαθμός διάστασης των αμινομάδων μειώνεται και το φορτίο των πρωτεϊνών γίνεται περισσότερο αρνητικό. Έτσι οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις απόσεως μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και των πολυσακχαριτών, με σουλφιδικές ομάδες, αυξάνονται και τα διαβιοπολυμερικά σύμπλοκα αποσυντίθενται. Αυτό οδηγεί σε ενίσχυση της ασυμβατότητας του συγκεκριμένου συστήματος, με αύξηση του pH (Grinberg and Tolstoguzov, 1997)

2.9.4 Ασυμβατότητα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών παρουσία αλάτων

Η ασυμβατότητα των πρωτεϊνών με όλους τους τύπους πολυσακχαριτών, γίνεται πιο έντονη με την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων. Πιθανότατα αυτό οφείλεται λόγω της ενίσχυσης της αυτο-οργάνωσης των πρωτεϊνών. Η αύξηση του ρυθμού συσσωμάτωσης σημαίνει ότι το νερό γίνεται κακός διαλύτης αυτών, αλλά παραμένει καλό διαλύτης για τους πολυσακχαρίτες. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως Δχ-φαινόμενο και ευνοεί την ασυμβατότητα των πολυμερών στο διάλυμα (Grinberg and Tolstoguzov, 1997).

2.9.5 Ασυμβατότητα και pH

Η ασυμβατότητα μεταξύ πρωτεϊνών και ουδέτερων ή περιεχόντων καρβοξύλια πολυσακχαριτών μειώνεται με την αύξηση του pH. Αυτό αντανακλά μια μείωση στο Δχ φαινόμενο, αφού ηλεκτροστατικές απώσεις των όμοια φορτισμένων μορίων πρωτεΐνης εντείνονται με την αύξηση του pH και έτσι αποτρέπεται η αυτο-οργάνωση των πρωτεϊνών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο επηρεασμός του pH στην ασυμβατότητα είναι ισχυρότερος για τους ουδέτερους πολυσακχαρίτες απ' ότι για αυτούς που περιέχουν καρβοξύλια (Grinberg and Tolstoguzov, 1997).

2.9.6 Σύμπλοκα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών

Πρόσφατα, ένα υδατοδιαλυτό τριμερές σύμπλοκο το οποίο ήταν αποτέλεσμα της αυτό-οργάνωσης αμυλόζης, πρωτεΐνης και ελεύθερου λιπαρού οξέος, θεωρήθηκε ότι ανακαλύφθηκε από ομάδα επιστημόνων, όταν μέσω της παρατήρησης κατά την ψύξη ενός τέτοιου συστήματος εμφανίστηκε ένα μέγιστο ιξώδους

Περαιτέρω μελέτες έγιναν, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού και σύστημα σκέδασης ακτίνας λέιζερ πολλαπλών γωνιών, δείχνοντας ένα διακριτό υδατοδιαλυτό τριαδικό σύμπλοκο, το οποίο περιείχε αμυλόζη, πρωτεΐνη και ελεύθερο λιπαρό οξύ, με μοριακό βάρος της τάξης των 10^6 με 10^7 Da. Ο ταυτόχρονος σχηματισμός του τριαδικού συμπλόκου και οι αλλαγές στο ιξώδες κατά την περίοδο ψύξης, κατέδειξαν την ύπαρξή του ως ένα καινούργιο δομικό συστατικό το οποίο επηρέασε τις ρεολογικές ιδιότητες του συστήματος.

Αποτελέσματα πειραμάτων, χρησιμοποιώντας διάφορα άλευρα σιτηρών στα οποίο υπήρχε παρουσία αμύλου, πρωτεΐνης και λιπιδίων, έδειξαν επίσης την πιθανή ύπαρξη του τριαδικού συμπλόκου υπονοώντας έτσι ότι το σύστημα αυτό μπορεί να είναι καθολικός τρόπος λειτουργίας αντιδράσεων μεταξύ των τριών αυτών συστατικών.

Το τριαδικό σύμπλοκο μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως μεταφορέας λιπόφιλων λειτουργικών μορίων, όπως τα λιπόφιλα ελεύθερα λιπαρά οξέα, κυρίως με την παρουσία του υπό μορφή ενός υποσυμπλόκου αμυλόζης-ελεύθερου λιπαρού οξέος. Παρόμοια με το συμβατικό σύμπλοκο αμυλόζης-ελεύθερου λιπαρού οξέος, μπορεί να μεταφέρει και να διατηρήσει τη δομική ακεραιότητα του βιοδραστικού λιπαρού οξέος (όπως το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ) προστατεύοντάς το από οξειδωση. Επιπροσθέτως, η υδατοδιαλυτότητα του τριαδικού συμπλόκου, η οποία διαφέρει από την μικρή διαλυτότητα του συμβατικού συμπλόκου αμυλόζης-λιπιδίων, παρέχει πολυάριθμες δυνατότητες για την χρησιμοποίησή του στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων ή την χορήγηση φαρμάκων (ενσωμάτωση λειτουργικών λιπόφιλων υλικών σε ποτά ή χρησιμοποίηση τους ως μέθοδος χορήγησης φαρμάκων για την διαλυτοποίηση αδιάλυτων στο νερό φαρμάκων).

Πρέπει να σημειωθεί ότι το πώς ο λιπόφιλος πυρήνας της ελικοειδούς αμυλόζης, της πολυιονικής πρωτεΐνης και του αμφίφυλου ελεύθερου λιπαρού οξέος συμβάλλουν στην αυτό-οργάνωση του συμπλόκου, παραμένει άγνωστο (Zhang et al., 2010).

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας πρωτεΐνης σε σύμπλοκα αμυλόζης-λιπαρών οξέων με τη χρήση προχωρημένων τεχνικών ανάλυσης

4 Υλικά – Μέθοδοι

4.1 Υλικά – Όργανα

4.1.1 Πρώτες ύλες

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε αμυλόζη από άμυλο αρακά. Το άμυλο από αρακά παραλήφθηκε από ξηρούς καρπούς μπιζελιών που αγοράστηκαν από την τοπική αγορά (Γιαννόπουλος Ε., Θεσσαλονίκη, Ελλάδα).

Τα χαρακτηριστικά του αμύλου ήταν τα εξής:

Υγρασία: 8,59% ($\pm 0,2$) (Ο προσδιορισμός έγινε με σταθμική ανάλυση, θερμαίνοντας το δείγμα στους 130°C για 1h και 30 min)

Πρωτεΐνη: 0,09% ($\pm 0,1$) (Ο προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο Kjeldahl μέθοδο)

Τα χαρακτηριστικά του αμύλοζης ήταν τα εξής:

Υγρασία: 11,8% ($\pm 0,3$) (Ο προσδιορισμός έγινε με σταθμική ανάλυση, θερμαίνοντας το δείγμα στους 130°C για 1h και 30 min)

Καθαρότητα αμυλόζης: 94% (Ο προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο Morisson & Laignelet, 1983)

Τα λιπαρά οξέα, μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C:18), (καθαρότητας 97%, 99% και 99% αντίστοιχα) ήταν της εταιρείας Sigma Chemical Company.

4.1.2 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (AR).

4.1.3 Όργανα

- Σφυρόμυλος (NorthFleet Graversend and DartFord Kent, Apex construction LTP, type 3.14)
- Φυγόκεντρος τύπου SORVAL RC-285.SUPRAspeed
- Ρεόμετρο (TR-1 RHEOMETER, Raphaelides & Georgiadis, 2006)
- Φυγόκεντρος (GallenKamp, England)
- Φασματοφωτόμετρο (model Helios, Thermo Scientific)
- DSC (Perkin-Elmer, Model DSC 6, Connectinut, USA)
- XRD (PANalytical X'Pert Pro diffractometer, Netherlands)
- FT-IR Nicolet 380 FT-IR Spectrometer-Thermo Scientific)

- Οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss , model Axion Star)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Carl Zeiss, SMT, Ltd, UK (model Zeiss EVO 50 VP).

4.2 Εξαγωγή αμυλόζης από αρακά

Ζυγίστηκαν 1 kg αρακά και στη συνέχεια προστέθηκαν 3 L νερό και 15 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Μετά από ανάδευση αφέθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37 °C για 48 h. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το δείγμα αλέσθηκε σε σφυρόμυλο (NorthFleet Graversend and DartFord Kent, Apex construction LTP, type 3.14) δύο φορές, με ταυτόχρονη προσθήκη επιπλέον απαιτούμενου νερού, ώστε ο βαθμός άλεσης του αρακά να είναι ικανοποιητικός.

Αφού ολοκληρώθηκε η άλεση του αρακά ακολούθησε κοσκίνιση με κόσκινο βροχίδων διαμέτρου 250 nm από το οποίο πέρασαν το άμυλο και μια ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ κατακρατήθηκαν οι φυτικές ίνες και η υπόλοιπη ποσότητα της πρωτεΐνης. Η καταστροφή των αμυλοκόκκων βρέθηκε να είναι αμελητέα μετά την δοκιμή με ερυθρό του Κονγκό. Το δείγμα με το άμυλο και την πρωτεΐνη τοποθετήθηκε στο ψυγείο για 24 h ώστε να κατακρημνιστεί το άμυλο με την πρωτεΐνη και να συσσωρευτεί στον πυθμένα του δοχείου. Μετά το πέρας των 24 h ακολούθησε απόχυση, ώστε να απομακρυνθεί μικρή ποσότητα πρωτεΐνης και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 30 min στις 5000 rpm για τον διαχωρισμό του αμύλου με την πρωτεΐνη. Έπειτα από το τέλος της φυγοκέντρησης, η ελαφριά φάση (πρωτεΐνη γκριζοπράσινου χρώματος) απομακρύνθηκε ενώ το άμυλο (λευκού χρώματος) που λήφθηκε από την βαριά φάση, αραιώθηκε σε νερό και για περαιτέρω καθαρισμό του αμύλου από την πρωτεΐνη ακολούθησε κοσκίνιση με κόσκινο βροχίδων διαμέτρου 250 nm και επαναφυγοκεντρήθηκε. Το καθαρό άμυλο ξεπλύθηκε με ακετόνη και διηθήθηκε μέσω διηθητικού χωνιού τύπου gooch νούμερο 2. Στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει στους 25°C υπό την διοχέτευση συνεχούς ρεύματος αέρα για 24 h, ώστε η υγρασία να φθάσει στο επιθυμητό ποσοστό, ώστε να απομακρυνθεί εντελώς η ακετόνη και η υπολειμματική υγρασία.

Η επόμενη διαδικασία που εκτελέστηκε, ήταν η ζελατινοποίηση του αμύλου σε ρεόμετρο (TR-1 RHEOMETER), στους 75 °C για 30 min. Βάση της χωρητικότητας του δοχείου ζελατινοποίησης, αναμίχθηκαν 60 g αμύλου με 1200 mL νερό. Αμέσως μετά την ζελατινοποίηση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 min στις 4000 rpm. Από τη φυγοκέντρηση προέκυψε ο διαχωρισμός της αμυλοπηκτίνης

(στερεή φάση) και της αμυλόζης (υγρή φάση). Το διάλυμα της αμυλόζης, αφού διήλθε από κόσκινο για την κατακράτηση μικρών σωματιδίων αμυλοπηκτικής και τοποθετήθηκε στο ψυγείο στους 4 °C για 24 h ώστε να κρυσταλλώσει η αμυλόζη.

Τέλος έγινε και μια τρίτη φυγοκέντρηση για 30 min στις 4000 rpm, κατά την οποία η αμυλόζη παραλήφθηκε σαν ίζημα από την βαριά φάση. Στη συνέχεια η αμυλόζη ξεπλύθηκε με ακετόνη, διηθήθηκε μέσω διηθητικού χωνιού gooch και αφέθηκε να στεγνώσει στους 25°C υπό την διοχέτευση συνεχούς ρεύματος αέρα, όπως και στην περίπτωση του αμύλου, ώστε να παραληφθεί στην άνυδρη, κρυσταλλική της πλέον μορφή, μετά από 48 h.

4.3. Προσδιορισμός φαινομενικής αμυλόζης.

Η τιμή της Blue Value ορίζεται ως η απορρόφηση/cm στα 635 nm των 10 mg άνυδρου αμύλου διαλυμένου σε 100 ml αραιού διαλύματος ιωδιούχου καλίου στους 20°C (Morrison και Laignelet, 1983). Η Blue Value μετατρέπεται σε περιεκτικότητα φαινομενικής αμυλόζης χρησιμοποιώντας εξίσωση παλινδρόμησης για τη συνολική αμυλόζη.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του αμύλου σε αμυλόζη προσδιορίστηκε με την μέθοδο του Morrison και Laignelet (1983). Συμφωνά με τη μέθοδο ~20 mg αμυλόζης, ζυγίστηκαν σε σωλήνα PYREX των 10 ml με βιδωτό καπάκι επενδυμένο με τεφλόν. Στους σωλήνες προστέθηκαν 10 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), ακολούθησε έντονη ανάδευση και έπειτα τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο για διάστημα 15-20 λεπτών. Η χρήση του DMSO κρίνεται απαραίτητη καθώς βοηθά στη διαλυτοποίηση της αμυλόζης. Μετά το πέρας των 20 λεπτών και αφού η αμυλόζη διαλυτοποιήθηκε πλήρως, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 100°C όπου παρέμειναν για 60 λεπτά. Μετά από ψύξη στους 20°C, ποσότητα 1ml από το κάθε δείγμα (αμυλόζη-DMSO) τοποθετήθηκε σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml (εις τριπλούν) και προστέθηκαν 95 ml νερό και 2 ml ιωδιούχου καλίου (2 mg I₂, 20 mg KI/ml). Το περιεχόμενο της κάθε φιάλης συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό στα 100 ml. Παράλληλα παρασκευάστηκε σε μια ογκομετρική φιάλη διάλυμα 2 ml ιωδιούχου καλίου και 98 ml απεσταγμένου νερού. Η ογκομετρική φιάλη αυτή αποτέλεσε το λευκό προσδιορισμό (χωρίς δείγμα). Στη συνέχεια όλες οι ογκομετρικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 20 °C όπου παρέμειναν για 15 λεπτά. Έπειτα

μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 635 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου έγινε με το λευκό διάλυμα.

Η τιμή της Blue Value μετατράπηκε σε περιεκτικότητα (%) φαινομενικής (ελεύθερης) αμυλόζης χρησιμοποιώντας της εξίσωση

$$\text{Ελεύθερη αμυλόζη (\%)} = (28,414 * \text{Blue Value}) - 6,2$$
$$\text{Blue Value} = (\text{Απορρόφηση} * 10) / \text{βάρος δείγματος (}\gamma\rho\text{)}$$

4.4. Σχηματισμός συμπλόκων

Η παρασκευή των συμπλόκων αμυλόζης-λιπαρών οξέων- πρωτεΐνης ορού πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο των Karkalas et al. 1995, με ορισμένες τροποποιήσεις. Αναλυτικά 600 mg αμυλόζης διαλύθηκαν σε 40 ml 0,1N υδροξύλιο του καλίου (KOH). Το υδροξύλιο του καλίου επιλέχθηκε γιατί θεωρείται καλός διαλυτής καθώς δεν ανταγωνίζεται με τα φιλοξενούμενα μόρια για να αντιδράσει με την αμυλόζη σε αντίθεση με το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) το οποίο ενώ θεωρείται εξαιρετικός διαλύτης για την αμυλόζη, σχηματίζει συμπλόκα με την αμυλόζη (Winter and Sarko, 1974, Nakanishi et al., 1993, Cheetham and Tao, 1998, Cheetham and Tao, 1997, Radosta et al. 2001, Germino and Valletta, 1964)

Η διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε αρχικά στους 25°C υπό συνεχή ανάδευση και παραμονή για 24 ωρών και ακολούθησε αύξηση της θερμοκρασίας στους 90°C για 2-3 λεπτά ώστε να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση της αμυλόζης. Το διάλυμα της αμυλόζης διηθήθηκε μέσω διηθητικού χωνιού τύπου «gooch». Έπειτα το διάλυμα της αμυλόζης ψύχθηκε σε θερμοκρασία 70°C, η οποία επιλέχθηκε ως η θερμοκρασία παρασκευής των συμπλόκων. Όσον αφορά στη διαλυτοποίηση των λιπαρών οξέων (μυριστικό, παλμιτικό, στεατικό), 60mg λιπαρού οξέος διαλύθηκαν σε 0,1N KOH (60 ml) υπό συνεχή ανάδευση στους 90° C μέχρις ότου το λιπαρό οξύ να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Έπειτα το διάλυμα του λιπαρού οξέος ψύχθηκε στην επιλεγμένη θερμοκρασία συμπλοκοποίησης (70°C). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάμειξη των δυο διαλυμάτων και ρύθμιση του pH στο 4,6 αρχικά με 5 M υδροχλωρικό οξύ (HCl) και έπειτα με 2 M HCl. Το pH του αρχικού διαλύματος πριν τη ρύθμιση ήταν 12,23. Για την παρασκευή του τριμερούς συμπλόκου αμυλόζης-

λιπαρού οξέος-πρωτεΐνης μετά την ανάμειξη του διαλύματος αμυλόζης και λιπαρού οξέος στην επιλεγμένη θερμοκρασία συμπλοκοποίησης (70 °C) ακολούθησε ρύθμιση του pH στο 8,3 με 5N HCl και έπειτα προστέθηκε η πρωτεΐνη ορού (60 mg). Μετά τη διάλυση της πρωτεΐνης ορού, το διάλυμα αμυλόζης-λιπαρού οξέος-πρωτεΐνης ορού τοποθετήθηκε σε υπέρηχους (Elma S30H Elmasonic ,Germany) οπού παρέμεινε για διάστημα 30 min σε στους 25°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος σε φυγόκεντρο (GallenKamp, England) στα 4500 x g για 30min, με σκοπό την παραλαβή των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

Στη συνέχεια για τη αφαίρεση της περίσσειας των λιπαρών οξέων που δεν συμπολοκοποιήθηκαν με την αμυλόζη, τα σύμπλοκα ξεπλύθηκαν με διάλυμα αιθανόλης/νερό (50%v/v) και επαναφυγοκεντρήθηκαν στα 4500 x g για 30min. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές.

Μετά το πέρας της όλης διαδικασίας τα σύμπλοκα πλέον τοποθετήθηκαν σε petri και αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 25°C υπό την διοχέτευση συνεχούς ρεύματος αέρα.

4.5.Περιθλασιμετρία ακτίνων X

Τα δείγματα σε μορφή σκόνης εξετάστηκαν με το περιθλασίμετρο PANalytical X'Pert Pro, με ακτινοβολία στο μήκος κύματος $\lambda=1,5405980\text{\AA}$. Η λειτουργία του περιθλασίμετρου ρυθμίστηκε στα 45 kV και στα 40mA, και η λήψη των μετρήσεων έγινε μεταξύ 6-35° (2 θ).

4.6. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Carl Zeiss, SMT, Ltd, UK (model Zeiss EVO 50 VP). Κατά τη εξέταση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εφαρμόστηκε τάση επιτάχυνσης 5kV, και πίεση 30 Pa.

4.7. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

Οι μετρήσεις διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential, Scanning Calorimetry, DSC) πραγματοποιήθηκαν σε θερμιδόμετρο Perkin-Elmer (Model DSC 6, Connecticut, USA) για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξης των συμπλόκων

αμύλοζης-λιπαρών οξέων- πρωτεΐνης ορού. Τα δείγματα θερμάνθηκαν κάτω από συνεχή ροή αερίου N₂ από τους 15 έως τους 130°C, με σταθερό ρυθμό 5 °C/min.

4.8.Φασματοσκοπία Υπερύθρου

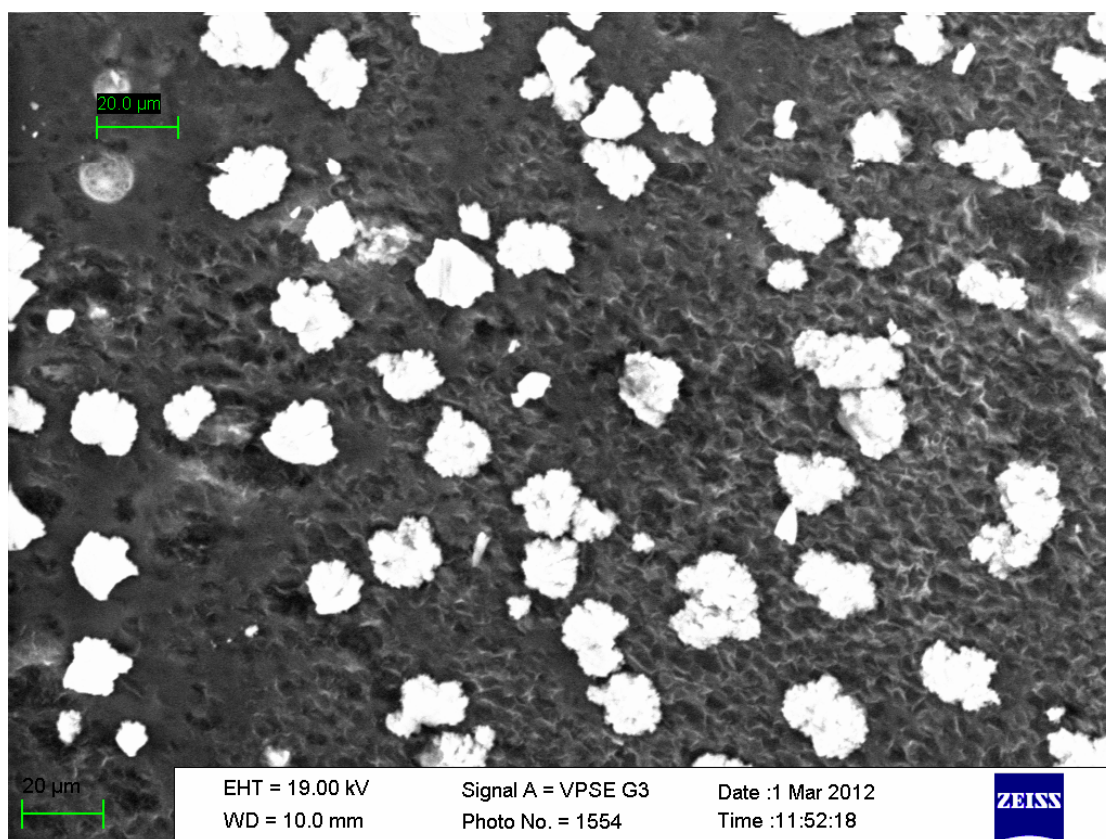
Η παρουσία συζευγμένης πρωτεΐνης στα σύμπλοκα αμυλόζης-λιπαρών οξέων- πρωτεΐνης ορού, επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία FTIR. Τα φάσματα FTIR ελήφθησαν σε φασματόμετρο υπερύθρου NICOLET 380 της εταιρείας Thermo.

5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Η πιθανότητα δημιουργίας τριμερούς συμπλόκου αμυλόζης-λιπαρού οξέος-πρωτεΐνης ορού γάλακτος διερευνήθηκε με τη χρήση τεσσάρων αναλυτικών τεχνικών και συγκεκριμένα Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) και στοιχειακή μικροανάλυση ακτίνων X, διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD) και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR).

5.1 SEM-X-ray microanalysis

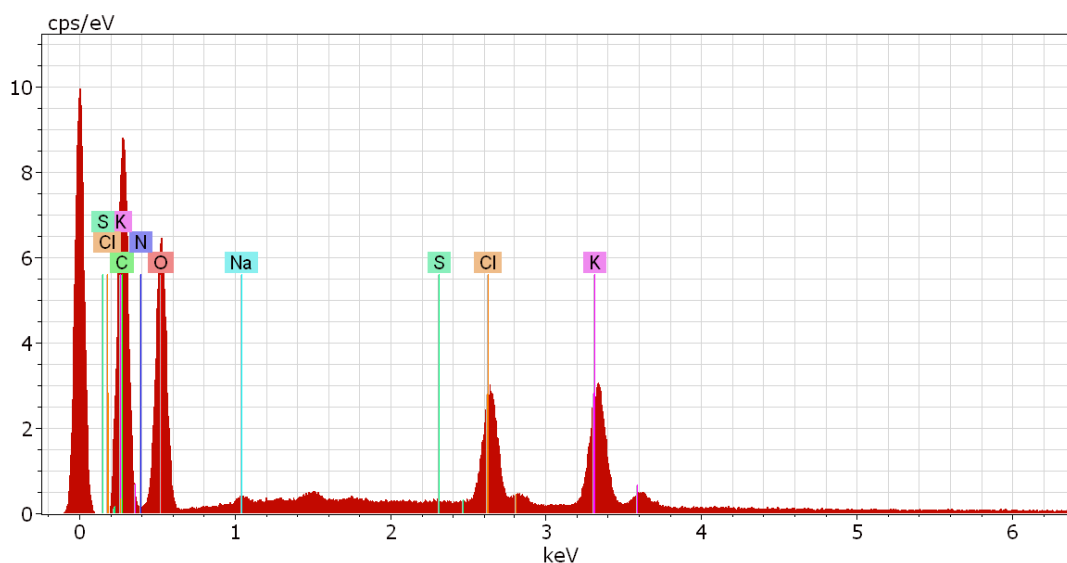
Το Σχήμα 1 παρουσιάζει μικροφωτογραφία συστήματος αμυλόζης-στεατικού οξέος-πρωτεΐνης παρουσία κρυστάλλων KCl που είναι τα λευκά σωματίδια επάνω στο matrix του συστήματος. Το KCl σχηματίζεται κατά την εξουδετέρωση του KOH με το HCl και κατά την αφυδάτωση του δείγματος σχηματίζει κρυστάλλους



Σχήμα 1. Μικροφωτογραφία συστήματος αμυλόζης-στεατικού οξέος-καζεΐνης

Η στοιχειακή μικροανάλυση έδειξε (Σχήμα 2) ότι στο matrix της αμυλόζης δεν υπάρχει ίχνος από τη πρωτεΐνη πράγμα που σημαίνει ότι δεν παρέμεινε πρωτεΐνη στο σύστημα όταν αυτό κατά τη φυγόκεντρηση παραλήφθηκε ως ίζημα, ενώ

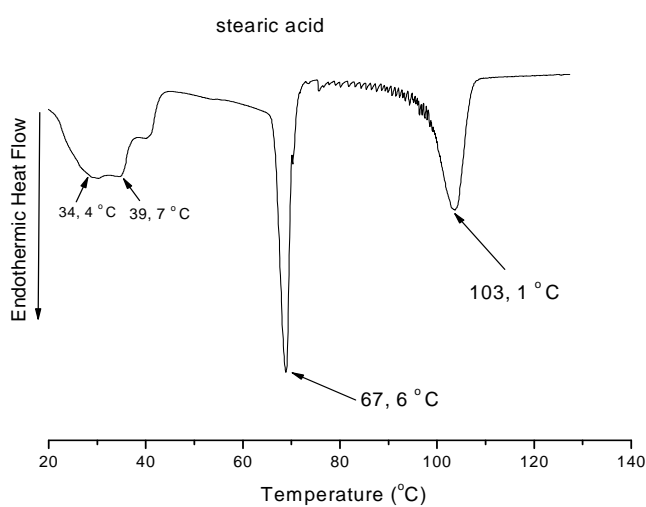
ποσότητα KCl είχε παραμείνει λόγω εξαλάτωσης από τη κατεργασία του συστήματος με υδατικό διάλυμα αιθανόλης.



Σχήμα 2. Στοιχειακή μικροανάλυση επιφάνειας δείγματος συστήματος αμυλόζης-στεατικού οξέος-πρωτεΐνης .

5.2 DSC

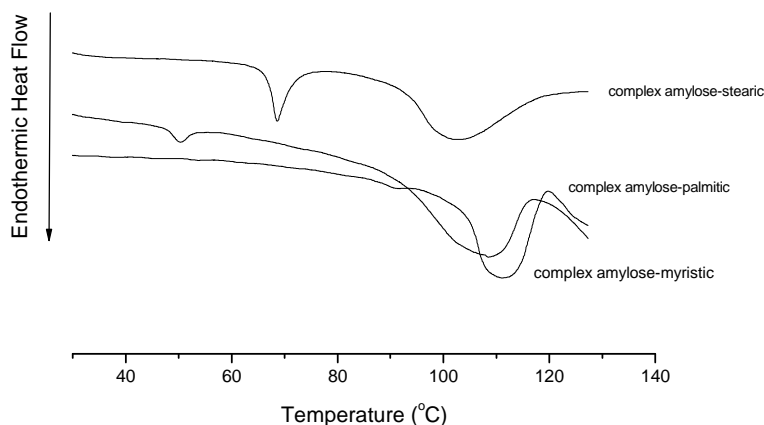
Η DSC τεχνική θεωρείται και είναι μια από τις καλύτερες μεθόδους για τη μελέτη των συμπλόκων αμυλόζης με λιπαρά οξέα όπως επίσης και για τη μελέτη των πολυμορφικών τύπων των λιπαρών οξέων.



Σχήμα 3. Θερμόγραμμα στεατικού οξέος παρουσία νερού

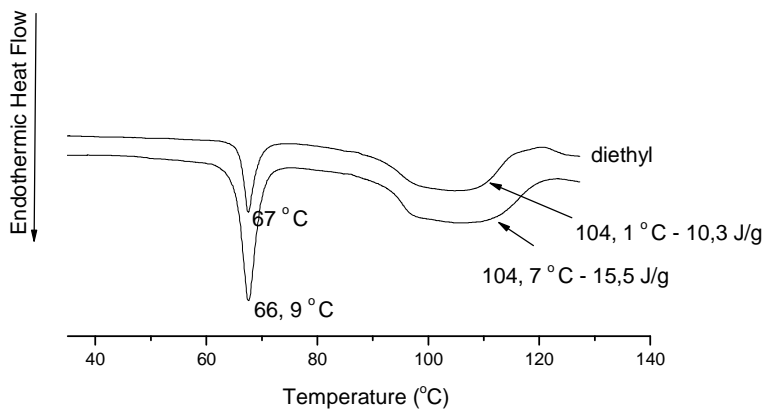
Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται θερμόγραμμα καθαρού στεατικού οξέος σε υδατικό περιβάλλον όπου εμφανίζονται οι κορυφές των σημείων τήξης δύο μορφών δηλ. της β' (~40°C) και της β (67,6°C) στις οποίες κρυσταλλώνει το στεατικό οξύ που ως γνωστό είναι πολύμορφο όπως όλα τα λιπίδια και το σημείο βρασμού του νερού 103°C που λόγω της παρουσίας του στεατικού οξέος έχει υποστεί ανύψωση.

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται θερμογράμματα συμπλόκων αμυλόζης με λιπαρά οξέα. Όπως φαίνεται εκτός από τις ενδοθήρμους των ελεύθερων λιπαρών οξέων (στεατικού και παλμιτικού) εμφανίζονται και οι ενδόθερμες διάσπασης των συμπλόκων αμυλόζης με τα λιπαρά οξέα.

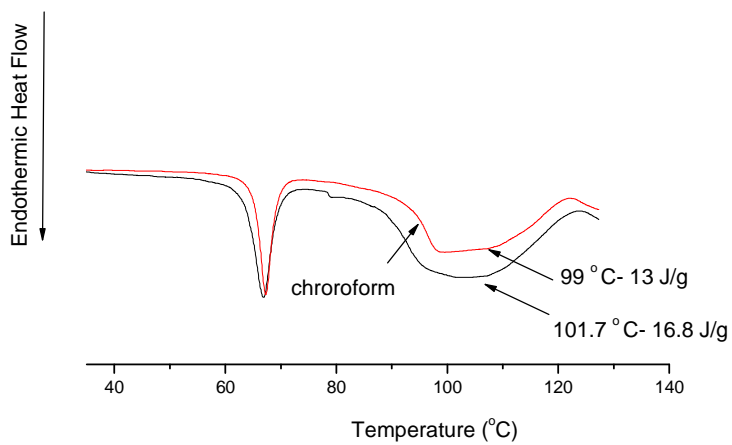


Σχήμα 4. Θερμογράμματα συμπλόκων αμυλόζης-λιπαρών οξέων

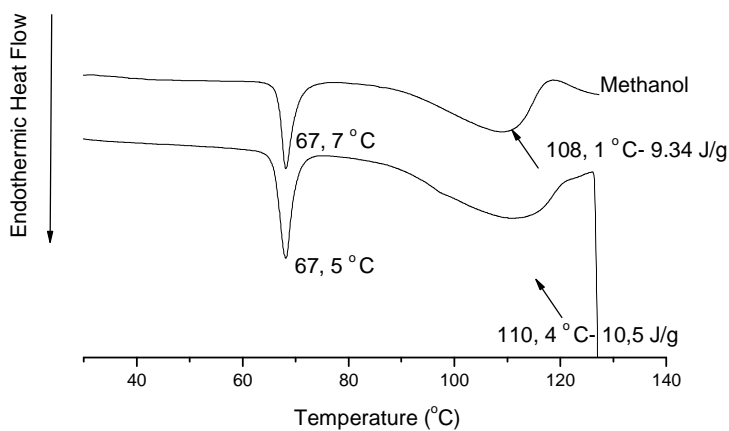
Τα Σχήματα 5,6 και 7 παρουσιάζουν θερμογράμματα συμπλόκων αμυλόζης στεατικού οξέος που έχουν κατεργαστεί με διάφορους διαλύτες δηλ. διαιθυλαιθέρα (Σχ.5), χλωροφόρμιο (Σχ.6) και μεθανόλη (Σχ. 7) με σκοπό την απομάκρυνση από το σύμπλοκο ποσοτήτων ελευθέρων λιπαρών οξέων.



Σχήμα 5. Θερμογράμματα συμπλόκου αμυλόζης-στεατικού οξέος ως έχει και μετά από κατεργασία με διαθλαιθέρα



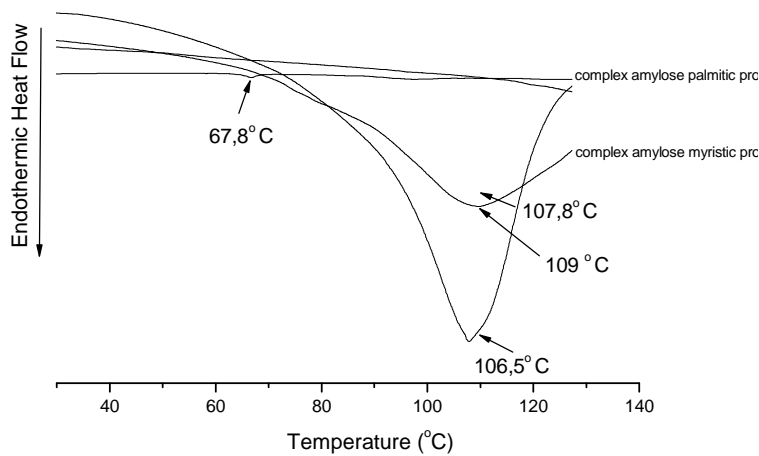
Σχήμα 6. Θερμογράμματα συμπλόκου αμυλόζης-στεατικού οξέος ως έχει και μετά από κατεργασία με χλωροφόρμιο



Σχήμα 7. Θερμογράμματα συμπλόκου αμυλόζης-στεατικού οξέος ως έχει και μετά από κατεργασία με μεθανόλη

Τα θερμογράμματα έδειξαν ότι οι ενδόθερμες κορυφές που οφείλονται στο ελεύθερο στεατικό οξύ παρέμειναν αν και στις περιπτώσεις του διαιθυλαιθέρα και της μεθανόλης με μικρότερο εμβαδόν γεγονός που αποδεικνύει ότι ένα μέρος του λιπαρού οξέος παγιδεύτηκε μεταξύ των ελίκων της συμπλεγμένης αμυλόζης και δεν μπόρεσε να αποσπαστεί από τους διαλύτες.

Το Σχήμα 8 παρουσιάζει τα θερμογράμματα συστημάτων αμυλόζης-λιπαρών οξέων-πρωτεΐνης όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση των ενδόθερμων κορυφών των συμπλόκων αμυλόζης με το μυριστικό και το παλμιτικό οξέα από τη παρουσία της πρωτεΐνης, κάτι που δεν συμβαίνει με τη περίπτωση του στεατικού οξέος όπου εμφανίζεται η ενδόθερμος του ελεύθερου οξέος αλλά όχι του συμπλόκου.

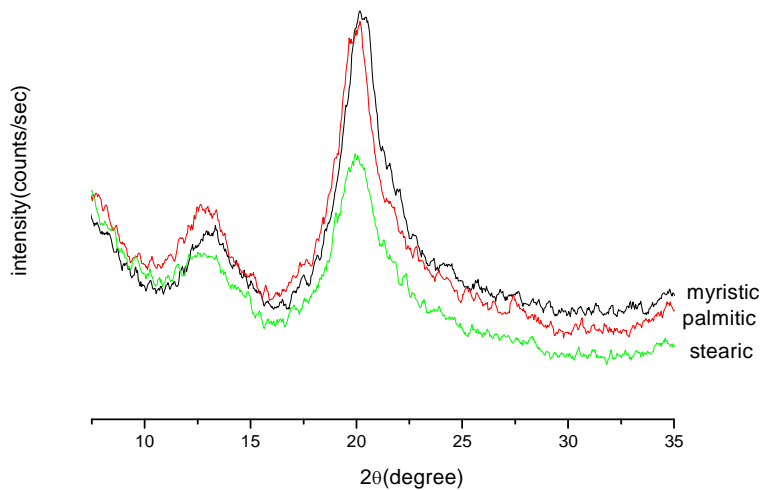


Σχήμα 8. Θερμογράμματα συμπλόκων αμυλόζης-λιπαρών οξέων-πρωτεΐνης

Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο βαθμός συμπλοκοποίησης του λιπαρού οξέος είναι αντιστρόφως ανάλογος του μήκους της αλυσίδας του λιπαρού οξέος όταν στο περιβάλλον του συμπλόκου υπάρχει πρωτεΐνη.

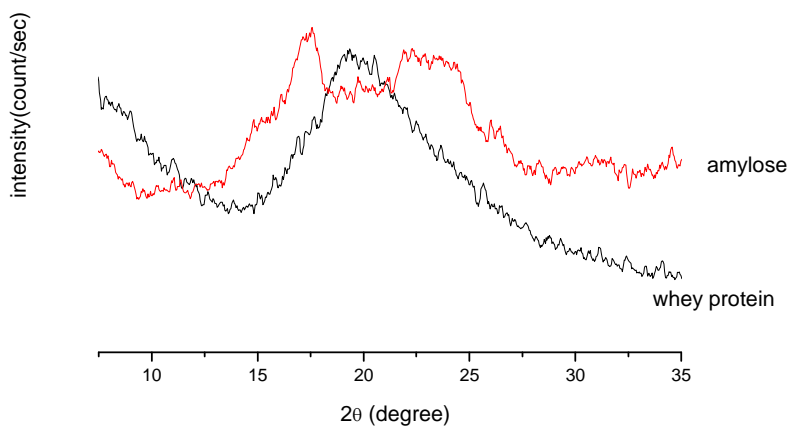
5.3 XRD

Η περιθλασιμετρία ακτίνων X είναι ίσως η καλύτερη μέθοδος για την έρευνα της δομής των κρυσταλλικών υλικών και κυρίως για τη ταυτοποίηση τους. Ιδιαίτερα στη περίπτωση των συμπλόκων αμυλόζης αυτά εμφανίζουν τη χαρακτηριστική V-δομή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 9. Τα σύμπλοκα αυτά παρασκευάστηκαν στους 70°C και η χαρακτηριστική της V-δομής κορυφή στις 19,7 ° έχει το ίδιο εμβαδόν και για τα τρία λιπαρά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν που σημαίνει και στις τρεις περιπτώσεις ο βαθμός συμπλοκοποίησης ήταν ο ίδιος.



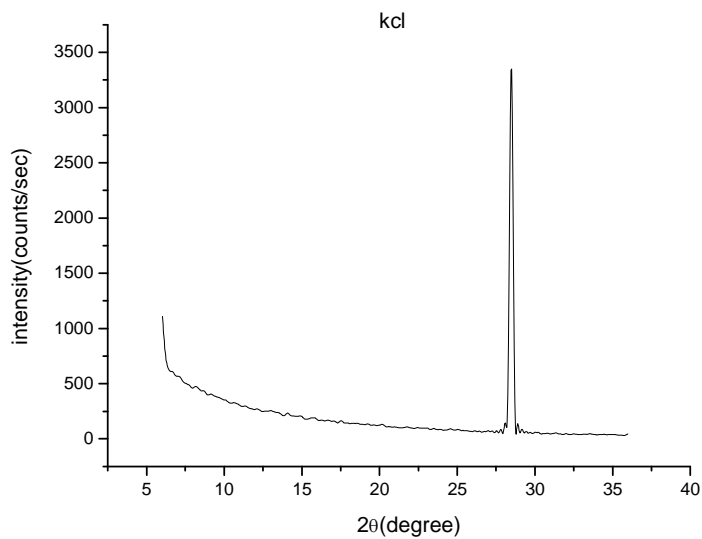
Σχήμα 9. Ακτινογράμματα συμπλόκων αμυλόζης με λιπαρά οξέα

Το Σχήμα 10 παρουσιάζει ακτινογράμματα της κρυσταλλικής αμυλόζης που εμφανίζει τη χαρακτηριστική μορφή Β-τύπος και της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Όπως φαίνεται η πρωτεΐνη παρουσιάζει μέγιστο στην ίδια τιμή της γωνίας 2θ που εμφανίζει και η V-δομή πράγμα που δυσκολεύει πολύ την σωστή αποτίμηση των ακτινογραμμάτων δειγμάτων που περιέχουν σύμπλοκα αμυλόζης και πρωτεΐνη.

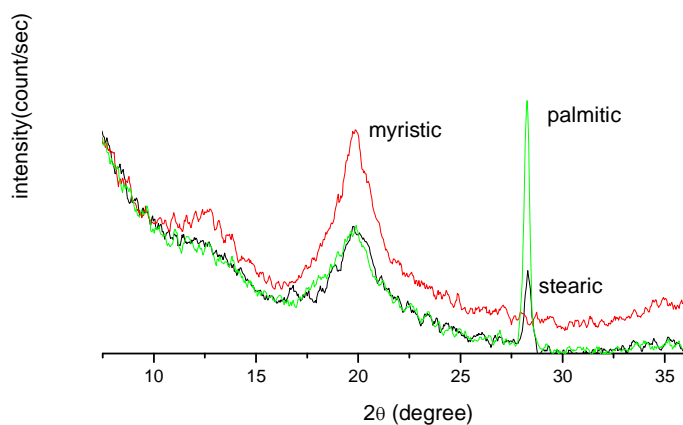


Σχήμα 10. Ακτινογράμματα αναδιαταγμένης(κρυσταλλικής) αμυλόζης και πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

Το Σχήμα 11 παρουσιάζει ακτινόγραμμα του KCl άλατος που παραμένει όπως προαναφέρθηκε σε κάποια από τα αποξηραμένα δείγματα των συστημάτων των συμπλόκων.

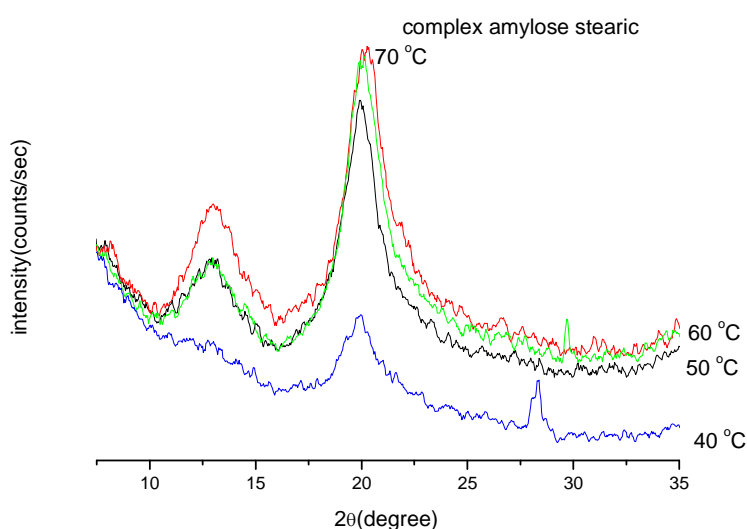


Σχήμα 11. Ακτινόγραμμα καθαρού κρυσταλλικού KCl



Σχήμα 12. Ακτινογράμματα συμπλόκων αμυλόζης λιπαρών οξέων παρουσία πρωτεΐνης και KCl

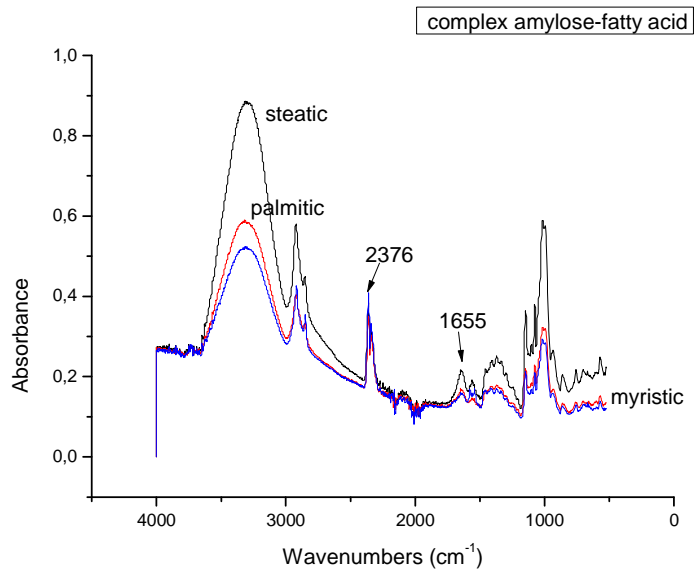
Όταν στο σύστημα αμύλου-λιπαρού οξέος προστίθεται πρωτεΐνη ορού γάλακτος τότε παρατηρείται ότι ο βαθμός συμπλοκοποίησης αμυλόζης- λιπαρού οξέος είναι μειωμένος σε σχέση με αυτόν όταν απουσιάζει η πρωτεΐνη όπως φαίνεται στο Σχήμα 12. Επίσης παρατηρείται ότι η παρουσία του KCl είναι σαφώς πιο έντονη από ότι όταν δεν υπάρχει η πρωτεΐνη. Θα πρέπει να τονισθεί ότι η προετοιμασία όλων των δειγμάτων έγινε στους 70°C καθότι στη θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται πολύ μεγαλύτερος βαθμός κρυσταλλικότητας από ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως φαίνεται και στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13. Ακτινογράμματα συμπλόκων αμυλόζης στεατικού οξέος παρασκευασθέντων σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

5.4 FTIR

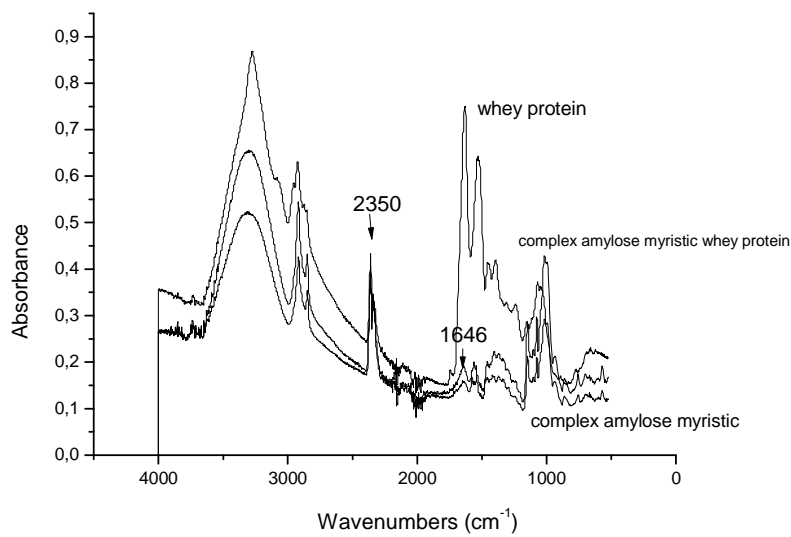
Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της δημιουργίας των συμπλόκων με τη μέτρηση της απορρόφησης χαρακτηριστικών ομάδων όπως καρβονυλίων περίπου στα 1690-1700 cm^{-1} και μεθυλενο ομάδων στα 2300-2400 cm^{-1} .



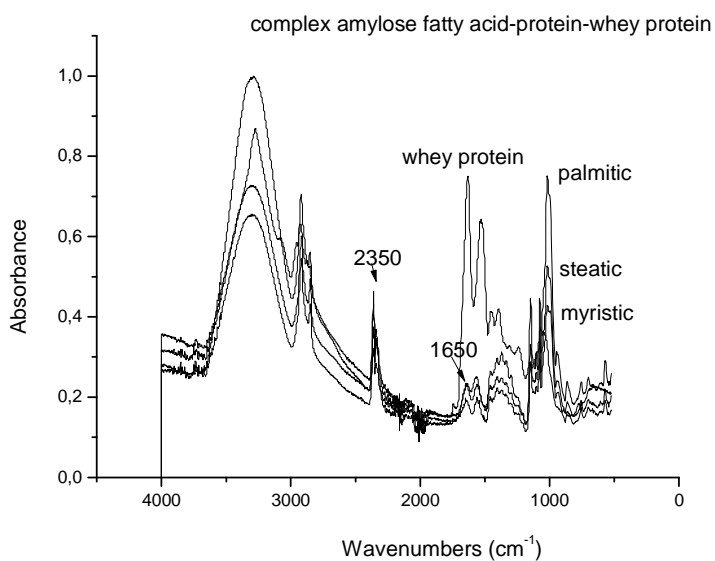
Σχήμα 14. Φασματογραφήματα υπερύθρου συμπλόκων αμυλόζης-λιπαρών οξέων

Το Σχήμα 14 παρουσιάζει φασματογραφήματα των συμπλόκων αμυλόζης με τα τρία λιπαρά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν όπου φαίνονται και οι απορροφήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων όπως προαναφέρθηκαν.

Το Σχήμα 15 παρουσιάζει φασματογραφήματα υπερύθρου συμπλόκου αμυλόζης μυριστικού οξέος χωρίς και με τη παρουσία πρωτεΐνης όπως και φασματογράφημα υπερύθρου πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Όπως προαναφέρθηκε, παρατηρείται ότι το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στην απορρόφηση των καρβονυλίων μειώνεται παρουσία της πρωτεΐνης. Στο Σχήμα 16 επιβεβαιώνεται η διαπίστωση αυτή και για τα σύμπλοκα του παλμιτικού και του στεατικού οξέων.



Σχήμα 15. Φασματογραφήματα υπερύθρου συμπλόκου αμυλόζης – μυριστικού οξέος με παρουσία ή χωρίς πρωτεΐνης και πρωτεΐνης (μάρτυρας).



Σχήμα 16. Φασματογραφήματα υπερύθρου συμπλόκου αμυλόζης – λιπαρών οξέων με ή χωρίς παρουσία πρωτεΐνης και πρωτεΐνης (μάρτυρας).

Η παρουσία πρωτεΐνης στο περιβάλλον των συμπλόκων αμυλόζης-λιπαρών οξέων φαίνεται να επηρεάζει τη φυσικοχημική τους συμπεριφορά αν και πιστεύεται με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα ότι δεν υπάρχει διασύνδεση συμπλόκων με τη

πρωτεΐνη γιατί διαφορετικά η στοιχειακή μικροανάλυση θα καταδείκνυε την παρουσία έστω ιχνών πρωτεΐνης.

Η παρουσία της πρωτεΐνης αν δεν περιορίζει τη δημιουργία των συμπλόκων αμυλόζης – λιπαρών οξέων, τουλάχιστο ελαττώνει τη κρυσταλλικότητα των συμπλόκων.

6. Συμπεράσματα

Η δομική συμπεριφορά των συστημάτων αμυλόζης - λιπαρων οξέων, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης ώστε να διαπιστωθεί αν η προσθήκη πρωτεΐνης παρεμποδίζει τη συμπλοκοποίηση ή αν παρεμποδίζει τη κρυστάλλωση των συστημάτων αυτών.

7. Βιβλιογραφία

Grinberg, V. & Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*. **11**, 147-158.

Karkalas, J. & Raphaelides, S. (1986). Quantitative aspects of amylose-lipid Interactions. *Carbohydrate Research*. **157**, 215-234.

Putseys, J., Lamberts, L. & Delcour, J. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*. **51**, 238-247.

Shah, A., Zhang, G., Hamaker, B. & Campanella, O. (2011). Rheological properties of a soluble self-assembled complex from starch, protein and free fatty acids. *Journal of Food Engineering*. **105**, 444-452.

Tester, R., Karkalas, J. & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. **39**, 151-165.

ZHANG, G., MALADEN, M., CAMPANELLA, O. & HAMAKER, B. (2010). Free Fatty Acids Electronically Bridge the Self-Assembly of a Three-Component Nanocomplex Consisting of Amylose, Protein, and Free Fatty Acids. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9164-9170.