

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ε. Αποστολίδης^{1,*}, Ι. Μαντάλα¹

¹Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Μηχανικής, Επεξεργασίας και Συντήρησης Τροφίμων, ΓΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(*apostolidis.eft@gmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ανθεκτικό άμυλο (Resistant Starch, RS), διακρίνεται έναντι των υπολοίπων μορφών αμύλου λόγω των ιδιοτήτων του και των ευεργετικών δράσεων που επιφέρει στην ανθρώπινη υγεία^[1]. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η φυσική τροποποίηση του μεγέθους των ανθεκτικών δομών αμύλου με χρήση Υψηλής Πίεσης Ομογενοποίησης (HPH) σε διαφορετικές συνθήκες πίεσης (140 MPa, 200 MPa και 250 MPa), προκειμένου να παραχθούν νανοσωματίδια αμύλου με πιθανή εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων (π.χ χρήση σε γαλακτώματα τύπου “Pickering”^[2]). Ειδικότερα, η έρευνα εστιάστηκε στην επίδραση της τεχνικής HPH στις ιδιότητες της δομής του αμύλου, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους, της κρυσταλλικότητας, της διαλυτότητας και του βαθμού διόγκωσης μετά την επεξεργασία. Το μέγεθος των κόκκων αμύλου μετρήθηκε με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), η μορφολογία τους με τη χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και ο βαθμός κρυσταλλικότητας με Περίθλαση Ακτίνων Χ (X-ray Diffraction, XRD). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μέγεθος των κόκκων αμύλου παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση συναρτήσει της αύξησης της πίεσης και των κύκλων ομογενοποίησης. Το μικρότερο μέγεθος κόκκων επετεύχθη ύστερα από κατεργασία μετά από 4 κύκλους ομογενοποίησης, σε πίεση 250 MPa (540nm). Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε αλλαγή στη μορφολογία των κόκκων (σχηματισμός πόρων, αυλακώσεων). Από τη μελέτη της κρυσταλλικότητας, παρατηρήθηκε θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των κόκκων αμύλου και της κρυσταλλικότητάς τους. Παράλληλα, με την αύξηση της πίεσης παρατηρήθηκε αύξηση της διαλυτότητας και του βαθμού διόγκωσης. Συμπερασματικά, παρέχονται βασικές πληροφορίες για την περαιτέρω κατανόηση των ιδιοτήτων του τροποποιημένου ανθεκτικού αμύλου στις διαφορετικές πιέσεις επεξεργασίας και υποδεικνύουν τις πιθανές εφαρμογές των φυσικώς τροποποιημένων νανοσωματιδίων αμύλου στην παραγωγή τροφίμων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άμυλο είναι ένα ιδιαίτερα πολύτιμο υλικό, καθώς πρόκειται για τον πιο ευρέως διαδεδομένο πολυσακχαρίτη αποθηκευμένο στα φυτά^[3]. Οι κύριες δομικές μονάδες του αμύλου είναι η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη. Το ποσοστό αμυλόζης/αμυλοπηκτίνης καθορίζει τις λειτουργικές ιδιότητες του αμύλου^[4]. Το άμυλο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί διατροφικά με βάση τη συμπεριφορά του κατά τη διαδικασία της πέψης. Ως ανθεκτικό άμυλο (Resistant Starch, RS) ορίζεται το κλάσμα του αμύλου και των προϊόντων της αποικοδόμησής του που δεν απορροφάται και δεν πέπτεται από τις αμυλάσες στο λεπτό έντερο υγιών ατόμων, ενώ περνάει στο κόλον όπου υφίσταται ζύμωση από τη χλωρίδα του παχέος εντέρου^[5]. Το άπεπτο άμυλο (Resistant Starch) με τη σειρά του χωρίζεται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους: Το RS1 που βρίσκεται σε σπόρους και λαχανικά, RS2 που αποτελείται από φυσικούς κόκκους αμύλου και δεν διασπάται λόγω της δομής του, RS3 που αναφέρεται κυρίως στο αναδιατεταγμένο άμυλο και RS4 αυτό που παράγεται χημικά^[6].

Ο ρυθμός πέψης και απορρόφησης του αμύλου είναι καθοριστικής σημασίας για την μεταβολική απόκριση ενός γεύματος. Τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες, που πέπτονται και

απορροφούνται βραδέως είναι ευνοϊκές για την διατροφική διαχείριση μεταβολικών διαταραχών, όπως ο διαβήτης και η υπερλιπιδαιμία^[7]. Το ανθεκτικό άμυλο τύπου 2 (RS2) φέρει Ισχυρισμό Υγείας από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων^[8]. Ο ισχυρισμός έχει αποδοθεί λόγω της επίδρασης του RS2 στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα/επίπεδα ζαχάρων (“healthy blood glucose/sugar levels”).

Η παραγωγή νανοσωματιδίων αμύλου έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς πρόκειται για μη τοξικά βιοπολυμερή, χαμηλού κόστους, με δυνατότητα χρήσης στη βιομηχανία τροφίμων ως υποκαταστάτες λίπους, πηκτικά μέσα, εμπεδωμένες δομές (υδρογέλες), σταθεροποιητές γαλακτωμάτων, νανοσύνθετα βιοαποικοδομήσιμα υλικά συσκευασίας, καθώς επίσης και ως φορείς ενθυλάκωσης^[9]. Η βιομηχανία τροφίμων, απευθυνόμενη σε ένα καταναλωτικό κοινό το οποίο αποζητά τρόφιμα απαλλαγμένα από χημικά πρόσθετα, προτιμά τη χρήση φυσικών μεθόδων επεξεργασίας, διασφαλίζοντας την διατήρηση της σύστασης των τροφίμων.

Πολλά υποσχόμενη φυσική μέθοδος με δυνητικές εφαρμογές και στην βιομηχανία τροφίμων είναι η τεχνολογία υψηλής πίεσης, με κύριο εκπρόσωπο την Υψηλή Πίεση Ομογενοποίησης (High Pressure Homogenization, HPH). Κατά την διεργασία της ομογενοποίησης με υψηλή πίεση, στα υγρά ασκούνται ταυτόχρονα υψηλές πιέσεις, υψηλοί ρυθμοί διάτμησης, στροβιλισμού και σπηλαιώσης λόγω της ταχείας αλλαγής της πίεσης^[10]. Παράλληλα, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η μείωση του μεγέθους των κόκκων αμύλου αραβόσιτου με χρήση υψηλής πίεσης^[11].

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη νανοκρυστάλλων ανθεκτικού αμύλου, οι οποίοι έχουν υποστεί μηχανική επεξεργασία με χρήση υπερυψηλής πίεσης ομογενοποίησης (HPH). Παράλληλα, η έρευνα εστιάζει στην επίδραση της τεχνικής HPH στις ιδιότητες των κόκκων αμύλου, συμπεριλαμβανομένων του μεγέθους, της δομής, της κρυσταλλικότητας, της διαλυτότητας και του βαθμού διόγκωσης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υπό μελέτη δείγμα είναι το «HI-MAIZE®260» ανθεκτικό άμυλο (Ingredion Inc., USA). Είναι μη χημικά τροποποιημένο άμυλο από καλαμπόκι υψηλής αμυλόζης. Έχει χαρακτηριστεί ως διαιτητική ίνα στα πλαίσια των κανόνων επισήμανσης τροφίμων, με τις μεθόδους AOAC985.29 και AOAC 991.43. Το προϊόν πληροί τα κριτήρια συμμετοχής στο πρόγραμμα Ingredion incorporated’s TRUETRACE® Idensity Preserved Program για μη γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (HI-MAIZE®260, datasheet).

Για την επίτευξη της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων του αμύλου, χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής υψηλής πίεσης (FPG 12800 PRESSURE CELL HOMOGENISER, STANSTED FLUID POWER LTD). Με το συγκεκριμένο μοντέλο ομογενοποιητή, καθίσταται δυνατή η εφαρμογή πίεσης στο εκάστοτε δείγμα από 0 έως 400 MPa ή 60000 Psi. Οι πιέσεις που μελετήθηκαν είναι οι εξής: 140 MPa, 200 MPa, 250 MPa και διαφορετικοί κύκλοι ομογενοποίησης από 1 έως 4. Η συγκέντρωση του εναιωρήματος ήταν 0,5 % w/v.

Για τον υπολογισμό του μεγέθους των κόκκων του αμύλου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), μέσω της χρήσης του μηχανήματος Zetasizer nano Zs της εταιρείας Malvern. Αρχικά, για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων παρασκευάστηκε εναιώρημα αμύλου με υπερκάθαρο νερό συγκέντρωσης 0,5%w/v. Λόγω των φαινομένων της ταχύτατης συσσωμάτωσης και καταβύθισης, ο χρόνος ανάδευσης ορίστηκε βάσει των καλύτερων αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, η ανάδευση του εναιωρήματος επετεύχθη μέσω της συσκευής ομογενοποίησης T 25 digital ULTRA-TURRAX®, της εταιρείας IKA, στις 3000 στροφές για 3 λεπτά. Ως δείκτης διάθλασης για το νερό ορίστηκε 1,33 και για το άμυλο 1,53^[12].

Για τη διεξαγωγή των επιμέρους μετρήσεων του πρωτοκόλλου, όπως ο προσδιορισμός της κρυσταλλικότητας (XRD) και οι μετρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM), κατόπιν της

επεξεργασίας των δειγμάτων μέσω Υπερυψηλής Πίεσης Ομογενοποίησης, τα δείγματα έπρεπε να είναι σε απόλυτα ξηρή κατάσταση. Για την επίτευξη αυτών των συνθηκών, το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας ήταν η απομάκρυνση του νερού από το επεξεργασμένο εναιώρημα αμύλου με Υπερυψηλή Πίεση Ομογενοποίησης, μέσω περιστροφικού εξατμιστή κενού (Waterbath B-480, Buchi, Switzerland). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην συσκευή λυοφιλίωσης για 72 ώρες.

Κατόπιν κατάλληλης προετοιμασίας των υπό μελέτη δειγμάτων, πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (JSM-6380LV, JEOL) στα 15 Kv. Ακολούθησε μελέτη κρυσταλλικότητας με την τεχνική Περιθλάσεως Ακτινών Χ (XRD). Σε αυτό το στάδιο του πειράματος, υπολογίστηκε η κρυσταλλικότητα τόσο του ακατέργαστου δείγματος αμύλου, όσο και των επεξεργασμένων με υπερυψηλή πίεση δειγμάτων αμύλου (D8 Advanced, Bruker). Η λειτουργία του μηχανήματος, βάσει βιβλιογραφίας, ρυθμίστηκε στα 40 kV και 40 mA, ακτινοβολίας Cu K α με μήκος κύματος 0,1542 nm ως πηγή ακτίνων Χ. Η σάρωση ορίστηκε να εκτελείται με γωνία περιθλάσεως (2θ) από 3° έως 35° με ταχύτητα σάρωσης 10°/ λεπτό και μέγεθος βήματος 0,05°^[13]. Η μέτρηση της διαλυτότητας και του βαθμού διόγκωσης έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Choi et al., (2009)^[14].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το αρχικό μέγεθος των ακατέργαστων κόκκων μετρήθηκε 7,168 μm . Η μεγαλύτερη μείωση στο μέγεθος των κόκκων επετεύχθη ύστερα από κατεργασία με 4 κύκλους ομογενοποίησης σε πίεση 250 MPa (544,44 nm)(Σχήμα 1).

Παρατηρήθηκε ότι τόσο η κατεργασία σε υψηλότερες συνθήκες πίεσης, όσο και η εφαρμογή περισσότερων κύκλων ομογενοποίησης επιφέρουν στατιστικά σημαντική μείωση στο μέγεθος των κόκκων αμύλου, με την πίεση να επιδρά περισσότερο στη μείωση του μεγέθους τους. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1 η επίδραση της πίεσης στο μέγεθος του δείγματος ($n^2=0,737$) είναι κατά 1,5 φορά μεγαλύτερη από την επίδραση των κύκλων ομογενοποίησης ($n^2=0,479$), ενώ ο μεταξύ τους συνδυασμός επιδρά οριακά στατιστικά σημαντικά στη μείωση του μεγέθους των κόκκων ($p\text{-value} = 0.055$). Συνεπώς, η κατεργασία του δείγματος σε υψηλότερη πίεση μπορεί να επιφέρει μεγαλύτερη μείωση στο μέγεθος των κόκκων συγκριτικά με την κατεργασία σε χαμηλότερη πίεση με περισσότερους κύκλους ομογενοποίησης.

Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των κόκκων αμύλου και της κρυσταλλικότητάς τους. Συγκεκριμένα, με την αύξηση της πίεσης ομογενοποίησης παρατηρήθηκε μείωση τόσο στο μέγεθος όσο και στην κρυσταλλικότητα των κόκκων αμύλου. Η μείωση της κρυσταλλικότητας μετά την εφαρμογή υψηλότερης πίεσης από 15,4% σε 7,7%, μπορεί να αποδοθεί στην αναδιάταξη της μορφής του αμύλου (Πίνακας 2, Σχήμα 2).

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι τόσο το σχήμα όσο και η χαρακτηριστική ομαλή επιφάνεια των κόκκων αμύλου επηρεάζεται ανάλογα με την επεξεργασία του δείγματος (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, η μικροσκοπική ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων επιβεβαιώνει την αλλαγή της δομής των κόκκων με την αύξηση της πίεσης. Στα δείγματα που επεξεργάστηκαν στις ίδιες συνθήκες πίεσης αλλά σε 4 κύκλους ομογενοποίησης εκτός από την αύξηση του αριθμού των μικρότερων σωματιδίων, παρατηρήθηκε και αλλαγή στη μορφολογία των κόκκων, όπου εμφανίζονται σχηματισμένοι πόροι. Στα δείγματα που επεξεργάστηκαν αντίστοιχα για 4 κύκλους ομογενοποίησης παρατηρήθηκαν κόκκοι μικρότερου μεγέθους, αρκετοί κατεστραμμένοι κόκκοι, καθώς και πιο έντονα συσσωματώματα.

Τέλος, παρατηρήθηκε επίδραση της πίεσης και των διαφορετικών κύκλων ομογενοποίησης στη διαλυτότητα και στο βαθμό διόγκωσης των κόκκων αμύλου (Πίνακας 2). Συγκεκριμένα, με την αύξηση της πίεσης ομογενοποίησης, αυξάνονται τόσο η διαλυτότητα όσο και ο βαθμός διόγκωσης.

Πίνακας 1

Tests of Between-Subjects Effects

Εξαρτημένη Μεταβλητή:

Μέγεθος_κόκκου

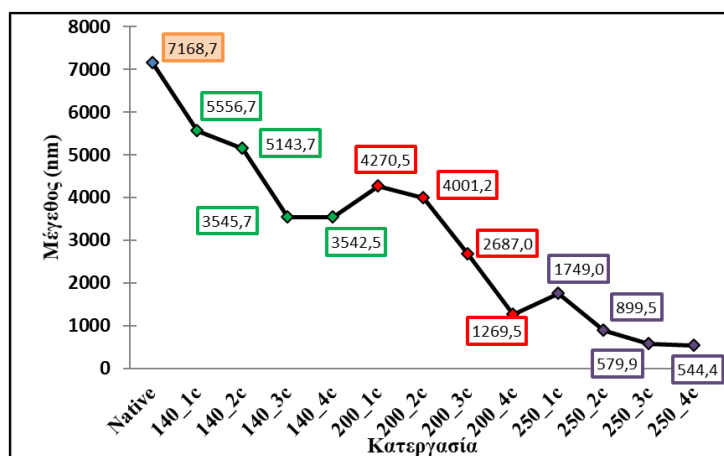
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	314276161,347 ^a	12	26189680,1	31,9	,000	,855
Intercept	878770259,484	1	878770259,5	1070,8	,000	,943
Πιέσεις	149423787,801	2	74711893,9	91,0	,000	,737
Κύκλοι_ομογενοποίησης	49132258,726	3	16377419,6	19,95	,000	,479
Πιέσεις * Κύκλοι_ομογενοποίησης	10780267,679	6	1796711,3	2,2	,055	,168
Error	53344531,627	65	820685,1			
Total	1141886944,260	78				
Corrected Total	367620692,973	77				

a. R Squared = ,855 (Adjusted R Squared = ,828)

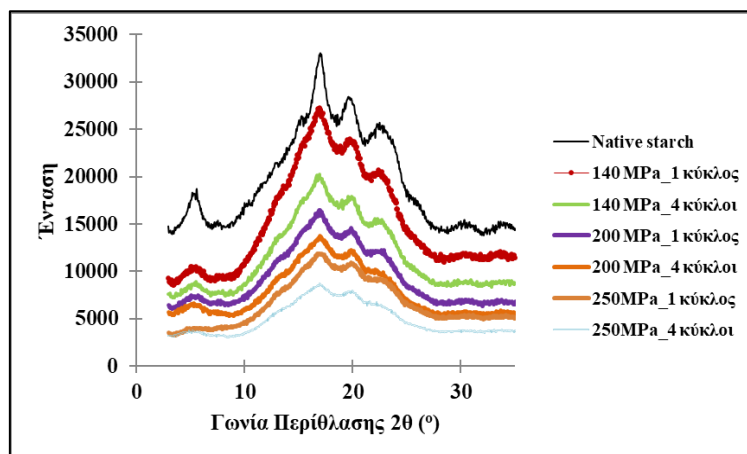
Πίνακας 2

Μετρήσεις Διαλυτότητας - Βαθμού διόγκωσης - Κρυσταλλικότητας

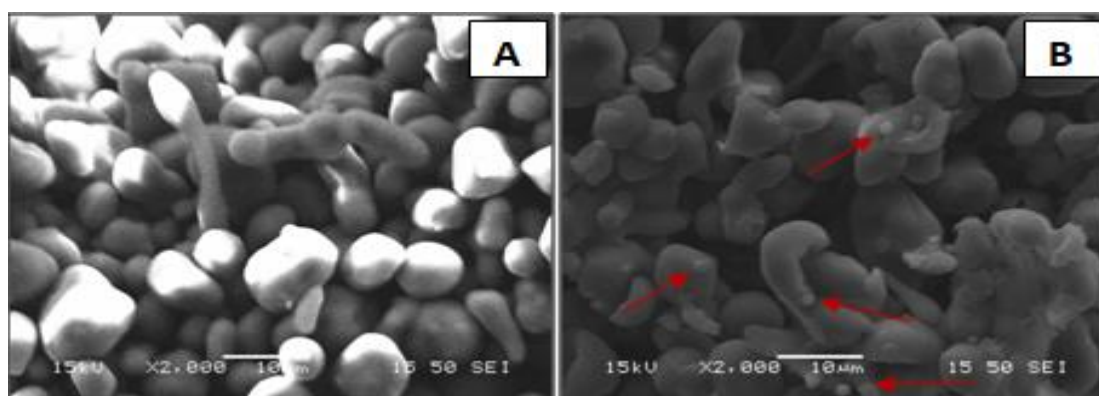
Πίεση(MPa)/Αριθμός κύκλων	Διαλυτότητα (%)	Βαθμός διόγκωσης (g/g)	Πρόσληψη νερού (g _{νερού} /g _{ιζήματος})	Κρυσταλλικότητα (%)
Ακατέργαστο	1,72	2,61	1,61	15,4
140/1	1,84	2,53	1,53	10,9
140/4	2,24	2,95	1,95	10,6
200/1	2,26	2,97	1,97	9,6
200/4	3,3	3,63	2,63	8,9
250/1	2,21	3,2	2,2	7,8
250/4	10,98	3,59	2,59	7,7



Σχήμα 1. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στις διάφορες κατεργασίες (Πίεση/Κύκλοι)



Σχήμα 2. Διαγράμματα περίθλασης Ακτίνων Χ



Εικόνα 1. Εικόνα από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο: A) ακατέργαστου δείγματος, B) 250 MPa/4 κύκλοι, (σημαίνονται με κόκκινο τα νανοσωματίδια επεξεργασμένου αμύλου)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η φυσική τροποποίηση του μεγέθους των κόκκων ανθεκτικού αμύλου, κατόπιν μηχανικής επεξεργασίας με Υψηλή Πίεση Ομογενοποίησης (ΗΡΗ), και η μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων των επεξεργασμένων κόκκων.

Υποδεικνύεται ότι το μέγεθος των κόκκων αμύλου παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση συναρτήσει της αύξησης της πίεσης και των κύκλων ομογενοποίησης ($p < 0,05$). Παράλληλα, παρέχονται βασικές πληροφορίες για την περαιτέρω κατανόηση των φυσικών ιδιοτήτων του τροποποιημένου ανθεκτικού αμύλου, κατόπιν επεξεργασίας με ΗΡΗ σε διαφορετικές πιέσεις.

Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, όμως θα πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα, αν η κατεργασία με υψηλή πίεση οδηγεί στη δημιουργία αναδιατεταγμένης δομής αμύλου, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού πέψης του, καθώς μια τέτοια τροποποιημένη μορφή αμύλου έχει πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε θερμά την Καθηγήτρια Δρ. Γλυκερία Κακάλη της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και την ερευνητική της ομάδα, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των μετρήσεων της κρυσταλλικότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhong, Y., Zhu, H., Liang, W., Li, X., Liu, L., Zhang, X., ... & Guo, D. (2018). *JOCS*, 81: 8-14.
- [2] Ge, S., Xiong, L., Li, M., Liu, J., Yang, J., Chang, R., ... & Sun, Q. (2017). *Food Chem*, 234: 339-347.
- [3] Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 5(1), 1-17.
- [4] Raguin, A., & Ebenhöf, O. (2017). *Biochem Soc Trans*, 45(4), 885-893.
- [5] Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1985). *Am J Clin Nutr.*, 42(5), 778-787.
- [6] Nugent, A. P. (2005). *Food Nutr Bull*, 30(1), 27-54.
- [7] Sharavathy, M. K., Urooj, A., & Puttaraj, S. (2001). *Food chem*, 75(2), 241-247.
- [8] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). *EFSA J*, 9(4), 2024.
- [9] Kim, H. Y., Han, J. A., Kweon, D. K., Park, J. D., & Lim, S. T. (2013). *Carbohydr Polym*, 93(2), 582-588.
- [10] Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). *J Dairy Res*, 70(3), 297-305.
- [11] Song, D., Thio, Y. S., & Deng, Y. (2011). *Carbohydr Polym*, 85(1), 208-214.
- [12] Che, L., Li, D., Wang, L., Özkan, N., Chen, X. D., & Mao, Z. (2007). *Int J Food Prop*, 10(4), 911-922.
- [13] Yang, J., Xie, F., Wen, W., Chen, L., Shang, X., & Liu, P. (2016). *Int J Biol Macromol*, 84, 268-274.
- [14] Choi, H. S., Kim, H. S., Park, C. S., Kim, B. Y., & Baik, M. Y. (2009). *Carbohydr Polym*, 78(4), 862-868.