

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ  
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επεξεργασία ανθεκτικού αμύλου με σκοπό τη χρήση του ως φορέα  
ενθυλάκωσης

Δέσποινα Ι. Καπαμά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ιωάννα Μαντάλα

Αθήνα, 2019

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επεξεργασία ανθεκτικού αμύλου με σκοπό τη χρήση του ως φορέα  
ενθυλάκωσης

Processing of resistant starch for its use as an encapsulating carrier

Δέσποινα Ι. Καπαμά

### **Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**

Ιωάννα Μαντάλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **Εξεταστική Επιτροπή**

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασιλική Ευαγγελίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άμυλο θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους πολυσακχαρίτες, η χρήση του οποίου αυξάνεται συνεχώς στη Βιομηχανία Τροφίμων και ειδικότερα του ανθεκτικού αμύλου, εξαιτίας των θετικών επιδράσεων που εμφανίζει στον οργανισμό του ανθρώπου.

Βασικοί στόχοι της παρούσας Μεταπτυχιακής Μελέτης είναι ο σχηματισμός νανοσωματιδίων ανθεκτικού αμύλου μέσω της μεθόδου της καταβύθισης με τη χρήση καυστικού νατρίου (NaOH) και η ενσωμάτωση σε αυτά ποσότητας β-καροτενίου. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του τρόπου ξήρανσης των δειγμάτων, η οποία ακολουθεί μετά το στάδιο της ενθυλάκωσης της ουσίας, αλλά και του χρονικού διαστήματος που αυτή διήρκησε, στην ενθυλάκωση του β-καροτενίου.

Μέσω της τεχνικής της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός νανοσωματιδίων καθώς το μέγεθος των κόκκων αμύλου στο δείγμα που προέκυψε μετά την εφαρμογή της μεθόδου της καταβύθισης ήταν 298,93 nm. Από την εφαρμογή της μεθόδου περίθλασης ακτινών X (XRD), διαπιστώθηκε η μεταβολή της κρυσταλλικότητας από τύπο Β στο ακατέργαστο άμυλο, σε τύπο V στο κατεργασμένο με καυστικό νάτριο άμυλο αλλά και στο ενθυλακωμένο με β-καροτένιο. Σύμφωνα με τη μέθοδο φασματοσκοπίας (FTIR) επιβεβαιώθηκε η ενθυλάκωση του β-καροτενίου στα διάφορα δείγματα αμύλου, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικές ποσοστιαίες διαφορές όσον αφορά την ομοιότητα των παραγόμενων δειγμάτων. Από την φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), καταγράφηκαν τα ποσοστά ενθυλάκωσης του β-καροτενίου με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρατηρείται στο επαναληπτικό δείγμα όπου κατά την παραγωγική διαδικασία εφαρμόζεται η τεχνική της ισχυροποίησης (annealing) και ακολουθεί ξήρανση σε φούρνο στους 40 °C για 6 ώρες. Το ποσοστό ανάκτησης που παρατηρήθηκε ήταν 42,53%.

Επιπλέον, μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) καταγράφηκε η μείωση της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης στο επεξεργασμένο δείγμα (HMNP). Από τον υπολογισμό της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι όλα εμφάνιζαν χαμηλές τιμές, δηλαδή μικρότερες από 0,6. Το δείγμα στο οποίο δεν εφαρμόστηκε θέρμανση στους 70 °C για 10 λεπτά (HMNPC) εμφάνιζε τιμή ενεργότητας 0,506 και ήταν εκείνο στο οποίο σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή υγρασίας (32,32%).

Οι συγκεκριμένες τεχνικές έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, γεγονός που σημαίνει ότι πιθανότατα θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή στη Βιομηχανία Τροφίμων.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Ανθεκτικό άμυλο, ενθυλάκωση, νανοσωματίδια, κρυσταλλικότητα, β-καροτένιο

## PROCESSING OF RESISTANT STARCH FOR ITS USE AS AN ENCAPSULATING CARRIER

### ABSTRACT

Starch is considered to be one of the most important polysaccharides. Its use in Food Industry is constantly increasing. In particular the use of resistant starch is rising because of its beneficial effect on human health.

The main objectives of this study are the formation of resistant starch nanoparticles by the precipitation method, using sodium hydroxide (NaOH) and the incorporation of  $\beta$ -carotene in those particles. We studied the effect of drying method that followed the encapsulation phase of the substance and its duration, on the encapsulation of  $\beta$ -carotene.

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements confirmed the formation of nanoparticles as the size of the starch granules after the application of precipitation method was 298,93 nm. The X-ray diffraction (XRD) method demonstrated the crystallinity conversion of native starch from B-type to V-type. V-type was observed in treated sample with sodium hydroxide (NaOH) and encapsulated amylose inclusion complexes. According to Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectroscopy method, the encapsulation of  $\beta$ -carotene in starch samples was confirmed, while significant differences concerning the similarity of the samples were observed. The  $\beta$ -carotene recovery (%) from the different starch samples was recorded by UV-Vis spectrophotometry method. The highest recovery percentage was observed in the repeat sample where the annealing technique was applied during the production process followed by drying process at 40 °C for 6 hours. The recovery rate of  $\beta$ -carotene was 42,53%.

Moreover, differential scanning calorimetry (DSC) recorded the reduction of gelatinization temperature in the treated sample (HMNP). According to the results of water activity ( $a_w$ ) all samples demonstrated low values, less than 0.6. The sample that heat treatment at 70 °C for 10 min was skipped (HMNPC), showed a water activity value of 0.506 and was the one with the highest humidity value (32.32%).

The techniques that are mentioned above have produced satisfactory results, which means they could be possibly applied to Food Industry.

**Keywords:** Resistant starch, encapsulation, nanoparticles, crystallinity,  $\beta$ -carotene

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Ιωάννα Μαντάλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων και επιβλέπουσα της συγκεκριμένης μελέτης, για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βασιλική Ευαγγελίου τόσο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση εργαστηριακού εξοπλισμού.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Χρήστο Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή, του εργαστήριου Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συνεργασία και τη βοήθεια του σε θέματα φασματοσκοπίας.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω στον κ. Κωνσταντίνο Μπεθάνη, Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Φυσικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στον κ. Παύλο Τζαμαλή, μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Φυσικής, για τη πολύτιμη βοήθεια τους σε θέματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την παραχώρηση εργαστηριακού εξοπλισμού.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Λουκόπουλο για τη βοήθεια και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης διατριβής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Dongwei Guo για την προμήθεια του δείγματος αραβοσίτου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη ηθική συμπαράσταση και στήριξη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 ΑΜΥΛΟ .....	8
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ .....	9
1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΜΥΛΟΥ .....	10
1.4 ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑ ΑΜΥΛΟΥ .....	14
1.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΑΜΥΛΟ .....	15
1.6 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ .....	17
1.6.1 ΝΑΝΟΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ .....	18
1.7 ΝΑΝΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ .....	19
1.8 ΙΣΧΥΡΟΠΟΙΗΣΗ (ANNEALING).....	22
1.9 β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ .....	23
1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	25
2.1 ΔΕΙΓΜΑ .....	25
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ .....	25
2.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ .....	27
2.4 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ.....	29
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΟΚΚΩΝ ΑΜΥΛΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS) .....	34
2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΕΡΙΘΛΑΣΕΩΣ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ (XRD).....	34
2.7 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ Fourier (FTIR).....	35
2.8 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ - ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis) .....	37
2.9 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSC) .....	40
2.10 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ .....	41
2.11 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΝΕΡΟΥ( $a_w$ ) .....	41
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
3.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ DLS .....	42
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΜΥΛΟΥ.....	43
3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR).....	51
3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ .....	60

3.5 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ .....	62
3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ .....	65
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	66
5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	75

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΑΜΥΛΟ

Το άμυλο χαρακτηρίζεται ως ένας χαμηλού κόστους, ανανεώσιμος, μη τοξικός υδατάνθρακας (Kim and Huber., 2016). Η χρήση του καταγράφεται από τους αρχαίους χρόνους και συγκεκριμένα στην Αρχαία Αίγυπτο όπου χρησιμοποιήθηκε με στόχο τη δημιουργία μιας περγαμηνής παπύρου και μιας κόλλας η οποία είχε ως βασικό της συστατικό το άμυλο. Επιπλέον, οι Ρωμαίοι το χρησιμοποιούσαν ως λευκαντικό και ενισχυτικό για κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα (Kearsley and Dziedzic., 1995). Άλλες αναφορές περιγράφουν τη χρήση του από τους Αρχαίους Έλληνες σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα (Tester et al., 2001). Στην Ευρώπη, η κύρια χρήση του αμύλου, το οποίο προερχόταν από την πατάτα, ήταν ως παράγοντας ταξινόμησης σε προϊόντα κλωστοϋφαντουργίας. Κατά την μεταπολεμική περίοδο στην Ευρώπη, η πατάτα σταμάτησε να αποτελεί την βασική πηγή αμύλου λόγω της εποχικότητάς της και αντικαταστάθηκε από τον αραβόσιτο, η καλλιέργεια του οποίου θα μπορούσε να αλέθεται κατά τη διάρκεια όλου του χρόνου (Kearsley and Dziedzic., 1995). Όλες οι παραπάνω αναφορές υποδεικνύουν τη μεγάλη σημασία του αμύλου η οποία συνέβαλε στη χρήση του μεταγενέστερα.

Το άμυλο, όντας ένα φυσικό, οικονομικό βιοπολυμερές το οποίο έχει τη δυνατότητα να βιοαποικοδομείται, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και στις μέρες μας, έχοντας ευρεία χρήση και διαφορετικές εφαρμογές αφότου πρώτα μετατραπεί σε νανοσωματίδια. Μια από τις βασικές εφαρμογές του είναι η δημιουργία συμπλόκων που θα μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορους τομείς όπως είναι ο τομέας των καλλυντικών, της φαρμακευτικής και των τροφίμων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το άμυλο λειτουργεί ως μήτρα (matrix), ρόλος της οποίας είναι να προστατέψει το υλικό το οποίο εμπεριέχεται σε αυτή (Kim et al., 2015). Ενσωματώνοντας κάποιο συστατικό στα νανοσωματίδια αμύλου επιτυγχάνεται η βελτίωση των μηχανικών, θερμικών ιδιοτήτων του όπως και της βιοαποικοδόμησής του, εξαιτίας των φυσικών ιδιοτήτων που προσφέρει το άμυλο. Ορισμένες από αυτές τις ιδιότητες είναι η υψηλή μηχανική αντοχή, η βιοδιαθεσιμότητά του και η ανθεκτικότητα στο νερό (Kristo and Biliaderis., 2007).

Λόγω της μη τοξικότητας και της βιοσυμβατότητας του αμύλου, καθιστά έναν ιδανικό φορέα για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Τα νανοσωματίδια έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν διάφορα μόρια σε διαφορετικές θέσεις του σώματος για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους και της



αυξημένης κινητικότητάς τους (Kim et al., 2015). Μία από τις εφαρμογές του αμύλου ήταν ως φορέας ουσίας η οποία είχε σαν στόχο καρκινικά κύτταρα (Suyao et al., 2006).

Το άμυλο χρησιμοποιείται επίσης ως σταθεροποιητής γαλακτωμάτων. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα εφαρμογής του αμύλου σε γαλάκτωμα αναφέρεται στην μελέτη που πραγματοποίησαν οι Li et al (2012), οι οποίοι παρασκεύασαν ένα γαλάκτωμα με ισοδύναμο όγκο νερού και παραφίνης και παρατήρησαν ότι η προσθήκη νανοσωματιδίων αμύλου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 0,02% wt σταθεροποίησε το γαλάκτωμα για περισσότερο από δύο μήνες, αποφεύγοντας τη συνένωση σταγονιδίων ελαίου.

Όσον αφορά τη βιομηχανία του χαρτιού, το άμυλο χρησιμοποιείται ως συνδετικό υλικό κατά την δημιουργία του χαρτιού και κατά τη χρήση του ως υλικό επίστρωσης. Όπως αναφέρουν οι Kim et al (2015) η απόδοσή του ως υλικό σύνδεσης αυξήθηκε όταν το μαγειρεμένο άμυλο αντικαταστάθηκε από νανοσωματίδια αμύλου.

Ένα ακόμα γεγονός που αποδεικνύει τη σημαντικότητα του αμύλου είναι η ύπαρξη του εξειδικευμένου περιοδικού Starch/Starke το οποίο κυκλοφορεί για περισσότερο από 50 χρόνια και στο οποίο περιλαμβάνονται μελέτες όπου εφαρμόζονται νέες τεχνολογίες επεξεργασίας των διαφόρων υδατανθράκων.

Σύμφωνα με τους Angellier et al (2004), οι βασικές πηγές του αμύλου παγκοσμίως είναι ο αραβόσιτος (82%), το σιτάρι (8%) , οι πατάτες (5%) και η ταπιόκα (5%). Η παγκόσμια αγορά αμύλου κατά το έτος 2000, υπολογίστηκε σε 48,5 εκατομμύρια τόνους, στους οποίους περιλαμβάνονται τα μη επεξεργασμένα αλλά και τα τροποποιημένα άμυλα.

## **1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ**

Το άμυλο είναι ένας υδατάνθρακας που δεν πέπτεται πλήρως στο λεπτό έντερο αλλά μέρος αυτού διασπάται αργότερα στο παχύ έντερο. Για το λόγο αυτό είναι δυνατή η ταξινόμηση του αμύλου σε τρεις κατηγορίες οι οποίες είναι το ταχέως εύπεπτο άμυλο (Rapidly Digestible Starch, RDS), το βραδέως εύπεπτο άμυλο (Slowly Digestible Starch, SDS) και το ανθεκτικό άμυλο (Resistant Starch, RS). Η ταξινόμηση αυτή προκύπτει μετά από ελεγχόμενη ενζυμική υδρόλυση και μέτρηση της απελευθέρωσης της (Englyst et al., 1992).

Το ταχέως εύπεπτο άμυλο (RDS) αποτελείται κυρίως από άμορφο και διεσπαρμένο άμυλο και βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες σε αμυλούχα τρόφιμα όπως το ψωμί και η πατάτα (Sajilata et al., 2006). Το συγκεκριμένο κλάσμα αμύλου διασπάται και

απορροφάται ταχέως με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση της γλυκόζης στο αίμα (Giuberti et al., 2015).

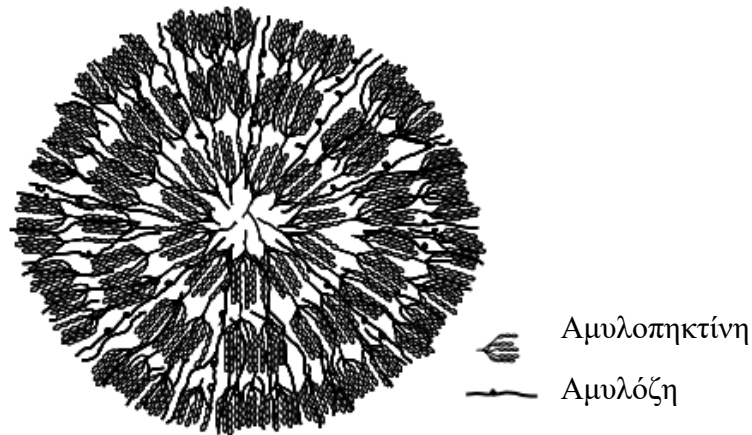
Τόσο το βραδέως εύπεπτο άμυλο (SDS) όσο και το ανθεκτικό άμυλο (RS) έχουν σημαντικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Το βραδέως εύπεπτο άμυλο διασπάται πλήρως στο λεπτό έντερο αλλά με αργό ρυθμό και για το λόγο αυτό επιτυγχάνεται η διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα (Zhong et al., 2018). Αποτελείται από φυσικά μη προσβάσιμο άμυλο και ακατέργαστο άμυλο κρυσταλλικής δομής τύπου Α και τύπου C, όπως είναι αυτό που περιέχεται στα δημητριακά αλλά και από άμυλο τύπου Β που βρίσκεται είτε σε κοκκώδη μορφή είτε σε αναδιαταγμένη μορφή σε μαγειρεμένα τρόφιμα πατάτα (Sajilata et al., 2006).

Όσον αφορά το ανθεκτικό άμυλο (RS), πρόκειται για το κλάσμα του αμύλου το οποίο δεν υφίσταται πέψη στο λεπτό έντερο αλλά ζυμώνεται στο παχύ έντερο από τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Sajilata et al., 2006). Το ανθεκτικό άμυλο (RS) θα περιγραφεί αναλυτικότερα στη συνέχεια.

### **1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΜΥΛΟΥ**

Το άμυλο θεωρείται ο αφθονότερος αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης στα φυτά και αποτελεί την κύρια διαιτητική πηγή υδατανθράκων (Sajilata et al., 2006). Εμφανίζεται υπό τη μορφή κόκκων στο χλωροπλάστη των πράσινων φύλλων και στον αμυλοπλάστη των σπόρων και των κονδύλων (Ellis et al., 1998). Ύστερα από την εξαγωγή του αμύλου από τα φυτά, αυτό εμφανίζεται σαν μια λευκή πούδρα η οποία προσομοιάζει με το αλεύρι και είναι αδιάλυτη στο κρύο νερό. Ανάλογα με τη βοτανική προέλευση του αμύλου, η διάμετρος των κόκκων οι οποίοι αποτελούν τη πούδρα, κυμαίνεται από 2 έως 100 μm. Επίσης, η ποικιλία των φυτών επηρεάζει το σχήμα, το χημικό περιεχόμενο και τους συντελεστές μετατροπής (Le Corre et al., 2010). Το άμυλο αποτελείται από δύο κύρια δομικά συστατικά, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη (Εικόνα 1).

Η πλειονότητα των αμύλων αποτελείται από 25% αμυλόζη και 75% αμυλοπηκτίνη, αλλά το ποσοστό της αμυλοπηκτίνης μπορεί να ανέρχεται σε 95% στα κηρώδη άμυλα και στα χαμηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη ή να παρατηρείται σε μικρά ποσοστά στα άμυλα που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη (Conde-Petit et al., 2006).



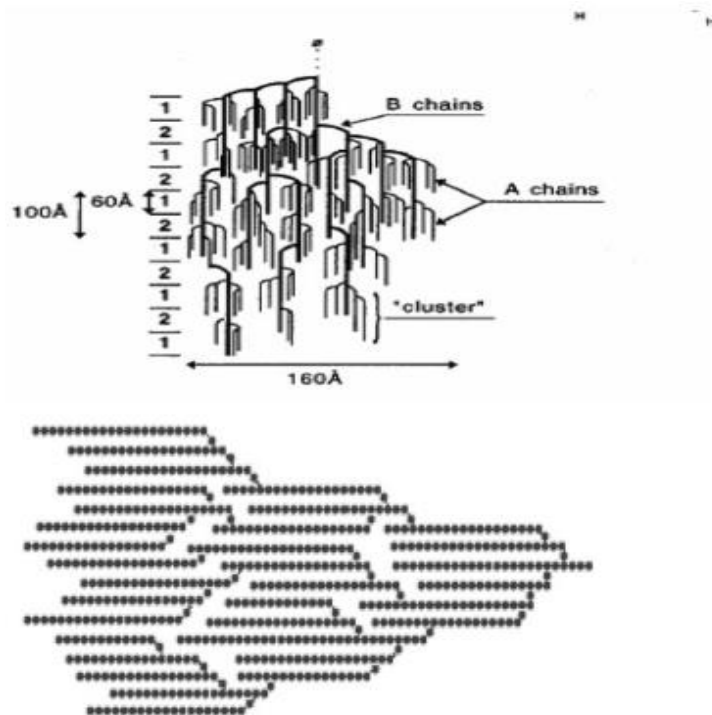
**Εικόνα 1.** Δομικά συστατικά κόκκου αμύλου: αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη (Jane, 2009).

Η αμυλόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης οι οποίες ενώνονται με (1-4) α-D-γλυκοζιτικό δεσμό και είναι ελαφρώς διακλαδισμένη μέσω (1-6) α-δεσμών. Το μέσο μοριακό της βάρος αγγίζει το 1 εκατομμύριο και ο βαθμός πολυμερισμού της (DP, Degree of Polymerization) ανέρχεται τις 6000 μονάδες γλυκόζης (Le Corre et al., 2010; Sajilata et al., 2006).

Η αμυλοπηκτίνη χαρακτηρίζεται ως ένα από τα μεγαλύτερα μόρια καθώς είναι ιδιαίτερα διακλαδισμένη με (1-6) α-δεσμούς, με το μοριακό της βάρος να ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια. Ο βαθμός πολυμερισμού της (DP) ανέρχεται περίπου στα 2 εκατομμύρια. Τα συνηθισμένα μήκη των αλυσίδων αποτελούνται από 20 έως 25 μονάδες γλυκόζης μεταξύ των διακλαδισμένων σημείων (Le Corre et al., 2010; Sajilata et al., 2006). Χαρακτηρίζεται από σύνθετη μοριακή αρχιτεκτονική και δομή σαν δέντρο όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, η οποία μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την προέλευση του αμύλου όσον αφορά τη θέση και το μήκος των διακλαδώσεων (Copeland et al., 2009).

Η αμυλόζη έχει την ικανότητα να σχηματίζει μονά ελικοειδή σύμπλοκα εγκλεισμού τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως V-αμυλόζη (Morrison et al., 1993). Τα σύμπλοκα V-αμυλόζης σχηματίζονται με μία ποικιλία ενώσεων όπως είναι οι αλκοόλες, τα λιπαρά οξέα, το υδροξείδιο του καλίου (KOH), το ιώδιο και υδρόφοβα οργανικά πολυμερή (Obiro et al., 2012). Σύμφωνα με έρευνες έχει αποδειχθεί ότι τα συγκεκριμένα σύμπλοκα έχουν δυνατότητα εφαρμογής στον τομέα των τροφίμων. Όπως αναφέρουν οι Lesmes et al (2009), ορισμένα παραδείγματα χρήσης των συμπλόκων αυτών είναι η νανοενθυλάκωση ευαίσθητων αρωματικών ενώσεων ή βιοενεργών ουσιών οι οποίες είναι χημικά ασταθείς και ευαίσθητες στην υποβάθμιση λόγω οξείδωσης (Shishir et al., 2018). Επιπλέον, μέσω

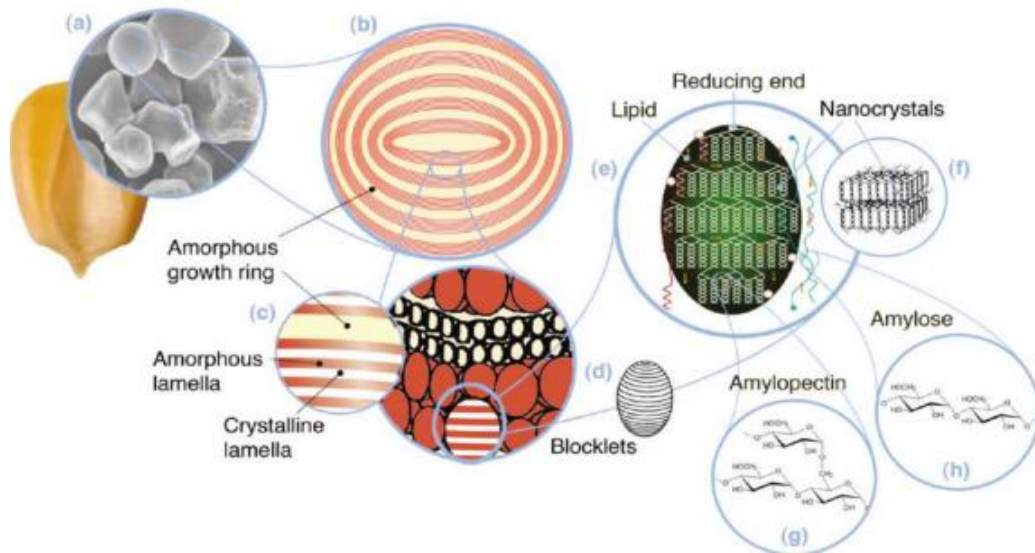
των συγκεκριμένων συμπλόκων επιτυγχάνεται και η τροποποίηση των ρεολογικών ιδιοτήτων του αμύλου (Lesmes et al., 2009).



**Εικόνα 2.** Δομή αμυλοπηκτίνης (Sajilata et al., 2006).

Η σύνδεση της αμυλόζης με κάποια ουσία υπό τις κατάλληλες συνθήκες είναι δυνατόν να παράξει κρυσταλλικές δομές. Οι κρύσταλλοι V-αμυλόζης μπορεί να εμφανίζονται είτε σε άνυδρη ( $V_a$ ) είτε σε ενυδατωμένη μορφή ( $V_h$ ).

Η εσωτερική δομή των κόκκων, όπως παρουσιάζεται και από την Εικόνα 3 χαρακτηρίζεται από δακτυλίους ανάπτυξης (growth rings). Πρόκειται για πολυάριθμους ομόκεντρους κύκλους (lamellae) των οποίων η διάμετρος αυξάνεται από το κέντρο (hilum) προς την επιφάνεια των κόκκων (Kim et al., 2015). Το πάχος τους κυμαίνεται από 100 έως 400 nm (Buléon et al., 1998). Η μορφή των κόκκων θυμίζει τη δομή ενός κρεμμυδιού όπου εναλλάσσονται άμορφες και κρυσταλλικές περιοχές. Αυτές οι εναλλασσόμενες στρώσεις (lamellae) σχηματίζουν μεγαλύτερες δομές σε μορφή σφαίρας, οι οποίες ονομάζονται «πακέτα» (blocklets). Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 20-500 nm, ανάλογα με την βοτανική προέλευση του αμύλου και την περιοχή στην οποία βρίσκεται ο κόκκος (Gallant et al., 1997). Η δομή αυτών των πακέτων (blocklets) είναι ασύμμετρη με αναλογία άξονα 2:1 ή 3:1 (Tang et al., 2006), ενώ το μέγεθος στις ημικρυσταλλικές στρώσεις είναι μικρότερο από εκείνο των κρυσταλλικών.



**Εικόνα 3.** Δομή των κόκκων αμύλου (Le Corre et al., 2010).

Όταν οι κόκκοι του αμύλου θερμαίνονται στο νερό, τα πεπτικά ένζυμα αποκτούν πρόσβαση στα μόρια και η διαδικασία αυτή ονομάζεται ζελατινοποίηση (gelatinization). Για την προετοιμασία αμυλούχων τροφίμων που προορίζονται για κατανάλωση λαμβάνει χώρα μια ενυδατωμένη διαδικασία μαγειρέματος η οποία καθιστά τα τρόφιμα εύπεπτα. Η θερμοκρασία ενυδάτωσης του αμύλου συνήθως κυμαίνεται από 40 °C έως 120 °C και εξαρτάται από την πηγή προέλευσης του αμύλου και την περιεκτικότητά του σε αμυλόζη. Κατά την ψύξη του αμύλου πραγματοποιείται η επανασύνδεση των αλυσίδων και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αναδιάταξη (retrogradation) (Haralampu, 2000).

Το νερό δε θεωρείται καλός διαλύτης του αμύλου και κατά συνέπεια προάγει τη σύνδεση των γραμμικών τμημάτων του αμύλου και το σχηματισμό διπλών ελίκων. Κατά την παρουσία όμως κατάλληλων μορίων (guest molecules) η αμυλόζη μετατρέπεται σε μια μονή έλικα η οποία σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου.

Η εξωτερική επιφάνεια της μονής αριστερόστροφης αλυσίδας είναι υδρόφιλη ενώ η εσωτερική επιφάνεια του ελικοειδούς καναλιού είναι υδρόφοβη και ως εκ τούτου θεωρείται κατάλληλη για τη φιλοξενία λιπόφιλων μορίων κατάλληλων διαστάσεων. Αυτού του τύπου τα σύμπλοκα εγκλεισμού αμυλόζης σταθεροποιούνται σε σημαντικό βαθμό από υδρόφοβες δυνάμεις (Kong and Ziegler., 2014; Conde-Petit et al., 2006).

Η αμυλόζη έχει την ιδιότητα να σχηματίζει με ευκολία σύμπλοκα με κατάλληλα μόρια καθώς η συμπλοκοποίηση δεν παρεμποδίζεται από την ύπαρξη πλευρικών αλυσίδων. Παρ' όλα αυτά, ο γρήγορος σχηματισμός διπλών ελίκων από την αμυλόζη εμποδίζει τη δημιουργία συμπλόκων εξαιτίας της απουσίας ενός κεντρικού καναλιού. Η αμυλοπηκτίνη

αντίθετα έχει περιορισμένη ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων καθώς μόνο οι εξωτερικές μακρές διακλαδώσεις μπορούν να σχηματίζουν έλικες (Conde-Petit et al., 2006).

## 1.4 ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑ ΑΜΥΛΟΥ

Αποτελέσματα ερευνών αναφέρουν ότι οι κόκκοι αμύλου εμφανίζουν ημικρυσταλλικό χαρακτήρα και κατά συνέπεια παρατηρείται υψηλός βαθμός προσανατολισμού των μορίων γλυκάνης. Η κρυσταλλική μορφή θεωρείται ότι καταλαμβάνει το 30% της συνολικής μάζας του κόκκου αμύλου, ενώ το 70% αποτελεί την άμορφη περιοχή. Η βασική ποσότητα της αμυλόζης εμφανίζεται στις άμορφες περιοχές. Στις συγκεκριμένες όμως περιοχές υπάρχει και μια υπολογίσιμη ποσότητα αμυλοπηκτίνης. Η αμυλοπηκτίνη θεωρείται το κύριο συστατικό της κρυσταλλικής περιοχής του κόκκου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτινών X, η κρυσταλλικότητα του αμύλου ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες οι οποίες είναι οι τύπου A, τύπου B και τύπου C. Οι κατηγορίες αυτές προκύπτουν από το μήκος της αλυσίδας που σχηματίζουν το πλέγμα της αμυλοπηκτίνης, την πυκνότητα του συμπλέγματος εντός των κόκκων και από την παρουσία νερού (Hsien-Chih and Sarko, 1978).

Τύπος A: Η αμυλοπηκτίνη της δομής τύπου A αποτελείται από 23 έως 29 μονάδες γλυκόζης. Ο σχηματισμός της εξωτερικής διπλής ελικοειδούς δομής πραγματοποιείται με τη συμβολή των δεσμών υδρογόνου οι οποίοι υπάρχουν μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου των αλυσίδων των μορίων της αμυλοπηκτίνης. Ανάμεσα σε αυτά τα μικύλια, το πακετάρισμα των γραμμικές αλυσίδων της αμυλόζης πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις εξωτερικές γραμμικές αλυσίδες της αμυλοπηκτίνης. Οι δομές τύπου A είναι στενά συνδεδεμένες με μόρια νερού μεταξύ κάθε διπλής ελικοειδούς δομής (Kim et al., 2015). Η δομή τύπου A συναντάται κυρίως στα δημητριακά (Sajilata et al., 2006).

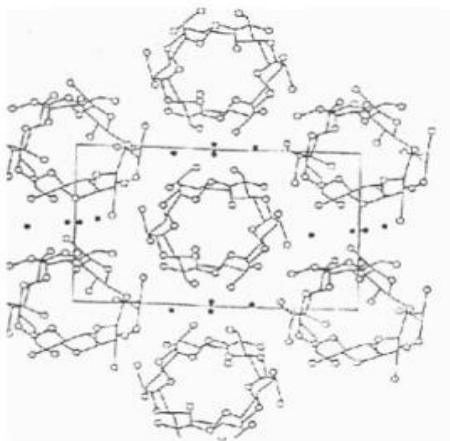
Τύπος B: Η αμυλοπηκτίνη της δομής τύπου B έχει μήκος αλυσίδας από 30 έως 44 μονάδες γλυκόζης ανάμεσα στις οποίες παρατηρείται διασπορά νερού. Οι δομές τύπου B δεν είναι τόσο στενά συνδεδεμένες και τα μόρια νερού που σχηματίζονται από έξι διπλές έλικες εντοπίζονται στην κεντρική κοιλότητα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Το μοντέλο αυτό συναντάται σε μπανάνα και άγουρη πατάτα (Sajilata et al., 2006), όπως και σε κονδύλους και άμυλα υψηλής περιεκτικότητας αμυλόζης (Kim et al., 2015).

Τύπος C: Οι δομές τύπου C αποτελούν έναν συνδυασμό των τύπων A και B και η αμυλοπηκτίνη αποτελείται από 26 έως 29 μόρια γλυκόζης (Sajilata et al., 2006). Πιστεύεται

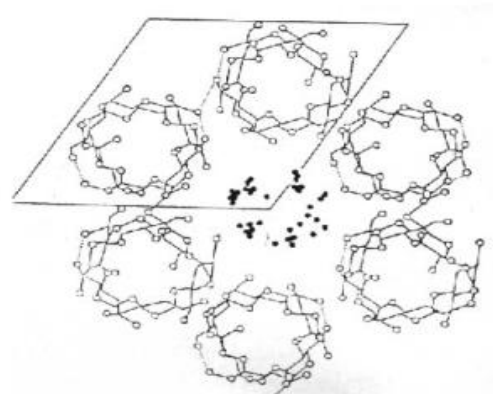
ότι ο τύπος Β εντοπίζεται στο κέντρο του κόκκου και ο τύπος Α στην περιβάλλουσα περιοχή (Kim et al., 2015). Το συγκεκριμένο μοντέλο παρατηρείται σε άμυλα μπιζελιών και φασολιών και σε ορισμένες ρίζες λαχανικών.

Σε διογκωμένους κόκκους παρατηρείται μια ακόμη δομή η οποία ονομάζεται δομή τύπου V η οποία περιγράφηκε αναλυτικότερα σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Τύπος Α



Τύπος Β



**Εικόνα 4.** Κρυσταλλικές δομές Τύπου Α και Τύπου Β (Sajilata et al., 2006, Hsien-Chih and Sarko 1978).

## 1.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΑΜΥΛΟ

Το κλάσμα του αμύλου που διαφεύγει της πέψης, δηλαδή δεν διασπάται από την παγκρεατική αμυλάση στο λεπτό έντερο των ανθρώπων, αλλά υφίσταται ζύμωση από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου ορίζεται ως ανθεκτικό άμυλο (Resistant Starch, RS) (Sajilata et al., 2006, Englyst et al., 1985).

Η ζύμωση των υδατανθράκων από τα αναερόβια βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, που δύνανται να μειώσουν το pH, ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα σχηματισμού καρκινικών όγκων στο κόλον (Yao

et al., 2009). Μια ακόμα επίδραση του ανθεκτικού αμύλου στην υγεία του ανθρώπου είναι η μείωση του γλυκαιμικού δείκτη καθώς η αργή πέψη του συγκεκριμένου αμύλου έχει ως αποτέλεσμα την ελεγχόμενη απελευθέρωση γλυκόζης (Sajilata et al., 2006, Raben et al., 1994). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Higgins et al (2004) η αντικατάσταση μικρού μέρους των διαιτητικών υδατανθράκων με ανθεκτικό άμυλο, αυξάνει την οξείδωση των λιπιδίων και ενδεχομένως να μειώνει την συσσώρευση του λίπους.

Σύμφωνα με τους Sajilata et al (2006), το ανθεκτικό άμυλο ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της συνολικής ποσότητας αμύλου (Total Starch, TS), η οποία προκύπτει από δείγμα που έχει υποστεί ομογενοποίηση και χημική επεξεργασία και του αθροίσματος του ταχέως εύπεπτου αμύλου (Rapidly Digestible Starch, RTS) και του βραδέως εύπεπτου αμύλου (Slowly Digestible Starch, SDS), το οποίο προκύπτει από μη ομογενοποιημένα δείγματα τροφίμων μέσω ενζυμικής πέψης και εκφράζεται από την Εξ. (1):

$$RS = TS - (RDS + SDS) \quad (1)$$

Το ανθεκτικό άμυλο διαχωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση του αμύλου, τη πηγή προέλευσης και τον βαθμό πέψης του.

Τύπος RS1: Αντιπροσωπεύει το φυσικώς μη προσβάσιμο άμυλο, το οποίο βρίσκεται προστατευμένο στα φυτικά κύτταρα. Εντοπίζεται σε μερικώς αλεσμένους κόκκους και σπόρους όσο και στα όσπρια (Sajilata et al., 2006, Eerlingen et al., 1995). Η δομή του παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.

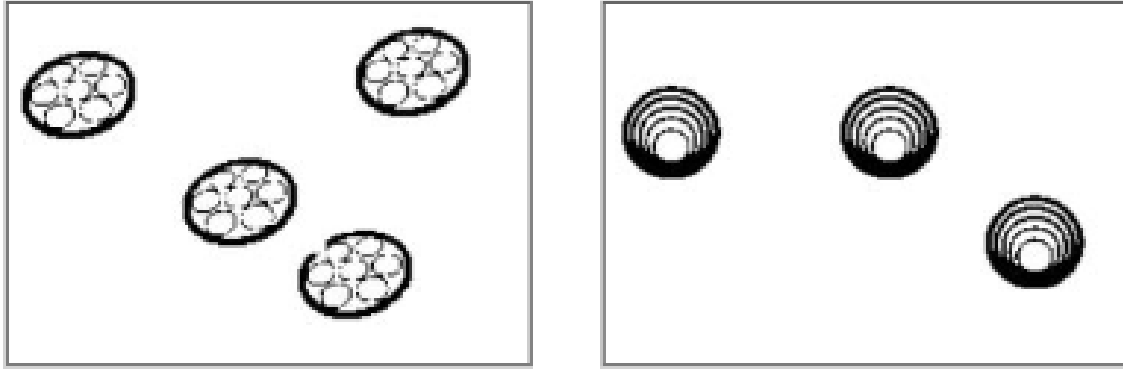
Τύπος RS2: Μη ζελατινοποιημένο άμυλο σε μορφή κόκκων, κρυσταλλικότητας τύπου B. Εμπεριέχεται σε άμυλο υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη, μη επεξεργασμένη πατάτα και άγουρη μπανάνα (Nugent, 2005, Eerlingen et al., 1995).

Τύπος RS3: Αναδιαταγμένο (retrograded) άμυλο. Εντοπίζεται σε μαγειρεμένες πατάτες καθώς και σε κονσερβοποιημένα μπιζέλια ή φασόλια (Nugent, 2005, Eerlingen et al., 1995).

Τύπος RS4: Πρόκειται για χημικά τροποποιημένο άμυλο. Στη συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνονται άμυλα που έχουν εστεροποιηθεί ή συνδεθεί με χημικές ουσίες με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνεται η πεπτικότητα τους (Nugent, 2005).

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και μια πέμπτη κατηγορία (τύπος RS5) στην οποία ανήκει ένα άμυλο όπου η αμυλόζη που περιέχεται σε αυτό σχηματίζει σύμπλοκα με λιπίδια, γεγονός που το καθιστά πιο θερμικά σταθερό. Χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό καθώς αντιστέκεται στην ενζυμική υδρόλυση (Ordonio and Matsuoka, 2016, Hasjim et al., 2013, Jiang et al., 2010).





**Εικόνα 5.** Δομή ανθεκτικού αμύλου τύπου RS1 και τύπου RS2, αντίστοιχα (Sajilata et al., 2006).

## 1.6 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ

Οι ποικίλες εφαρμογές του αμύλου είχαν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων σχηματισμού νανοσωματιδίων αμύλου, οι οποίες διακρίνονται σε φυσικές, χημικές ή σε συνδυασμό αυτών.

Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για το σχηματισμό νανοσωματιδίων πολυσακχαριτών είναι η όξινη υδρόλυση καθώς θεωρείται απλή και τα στάδια από τα οποία αποτελείται ελέγχονται με ευκολία. Κατά το αρχικό στάδιο παρατηρείται γρήγορη υδρόλυση του αμύλου κάτι που οφείλεται στην υδρόλυση των άμορφων μερών των κόκκων του αμύλου. Ακολουθείται από μια πιο αργή διαδικασία υδρόλυσης η οποία είναι αποτέλεσμα της καταστροφής των κρυσταλλικών περιοχών του αμύλου (Kim et al., 2015). Η όξινη υδρόλυση μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ως βασικά αντιδραστήρια είτε το υδροχλωρικό οξύ (HCl) (Putaux et al., 2003) είτε το θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ( Angellier et al., 2004). Κάποια βασικά μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι πρόκειται για μια ενεργοβόρα διαδικασία και η απόδοσή της είναι χαμηλή.

Η πραγματοποίηση μιας ενζυμικής επεξεργασίας του αμύλου η οποία προηγείται της όξινης υδρόλυσης, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να μειώσει τη χρονική διάρκεια η οποία απαιτείται για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αμύλου αλλά και να αυξήσει την απόδοση (LeCorre et al., 2012). Μέσω όμως αυτών των τεχνικών επιτυγχάνεται η δημιουργία νανοσωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους συγκριτικά με εκείνα που σχηματίζονται μετά από εφαρμογή μόνο της όξινης υδρόλυσης.

Η επιθυμία των καταναλωτών να αγοράζουν τρόφιμα τα οποία δεν περιέχουν χημικά πρόσθετα έχει ωθήσει τις βιομηχανίες τροφίμων στη χρησιμοποίηση φυσικών μεθόδων επεξεργασίας, μέσω των οποίων διασφαλίζεται η υγεία του καταναλωτικού κοινού. Επιγραμματικά αναφέρονται οι κυριότερες φυσικές μέθοδοι που απαντώνται και είναι η

υψηλή πίεση ομογενοποίησης (High Pressure Homogenization, HPH), η χρήση υπερήχων (ultrasonication), η χρήση αντιδραστικής εξώθησης (reactive extrusion).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η νανοκαταβύθιση (nanoprecipitation). Πρόκειται για μία ήπια διαδικασία που απαιτεί χαμηλά ποσά ενέργειας, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω.

### **1.6.1 NANOKΑΤΑΒΥΘΙΣΗ**

Η νανοκαταβύθιση χαρακτηρίζεται ως μια απλή και εύκολα αναπαράξιμη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη συνεχή προσθήκη αραιού διαλύματος πολυμερούς σε κάποιο διαλύτη κάτι που οδηγεί στην κατακρήμνιση του πολυμερούς σε νανοκλίμακα. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η διεπιφανειακή εναπόθεση των πολυμερών η οποία παρατηρείται ύστερα από τη μετατόπιση ενός ημιπολικού διαλύτη που είναι αναμίξιμος με το νερό από ένα λιπόφιλο διάλυμα. Κάτι τέτοιο παρουσιάζει ποικίλα πλεονεκτήματα όπως είναι η αποφυγή χρήσης μεγάλων ποσοτήτων τοξικών διαλυτών και πηγών ενέργειας καθώς και η παραγωγή σωματιδίων μικρών διαστάσεων (Kim et al., 2015).

Οι Fessi et al (1989) επιχείρησαν την ανάπτυξη νανοσωματιδίων πολυγαλακτικού οξέος (PLA) χρησιμοποιώντας την ακετόνη ως οργανικό διαλύτη. Σύμφωνα με την προηγούμενη μέθοδο, οι Govender et al (1999) σχημάτισαν νανοσωματίδια μετά τη διάλυση του πολυμερούς PLGA [Poly(dl-lactide-co-glycolide)] σε ακετονουτρίλιο και την προσθήκη στάγδην οργανικού διαλύτη στο διάλυμα αυτό. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την πλήρη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.

Παρόμοιες έρευνες πραγματοποιήθηκαν από τους Ma et al (2008). Τα νανοσωματίδια αμύλου σχηματίστηκαν προσθέτοντας στάγδην αιθανόλη, σε διάλυμα ζελατινοποιημένου αμύλου. Όταν η αιθανόλη προστίθεται σε ζελατινοποιημένο άμυλο λειτουργεί ως παράγοντας κατακρήμνισης. Κατά συνέπεια η ζελατινοποίηση οδήγησε στην καταστροφή της κρυσταλλικής δομής Α-τύπου του άμυλου καλαμποκιού και στο σχηματισμό σωματιδίων με κρυσταλλική δομή τύπου V<sub>H</sub>.

Οι Chin et al (2011) προχώρησαν στο σχηματισμό νανοσωματιδίων αμύλου μέσω μιας απλής διαδικασίας νανοκαταβύθισης. Τα νανοσωματίδια παρήχθησαν μέσω της προσθήκης διαλύματος αμύλου σε περίσσεια καθαρής αιθανόλης υπό συνεχή μηχανική ανάδευση. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του αμύλου ήταν διάλυμα

NaOH/ουρίας (0,8:1 wt%). Το καυστικό νάτριο (NaOH) έχει την ιδιότητα να διασπά τους ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου των μορίων του αμύλου ενώ η ουρία χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητικός παράγοντας καθώς αποτρέπει την επανασύνδεση των μορίων. Επιπλέον, τα αντιδραστήρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν γιατί είναι φθηνά, μη τοξικά και ασφαλή για το περιβάλλον. Τα βασικά όμως μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής ήταν ότι για την επίτευξη της καταβύθισης απαιτούνταν μεγάλες ποσότητες διαλύτη και ότι το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων ήταν αρκετά μεγάλο (400-600nm).

Με στόχο τον σχηματισμό νανοσωματιδίων από συνθετικά ή φυσικά πολυμερή τα οποία θα έχουν μικρότερο μέγεθος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτοπισμού του διαλύτη (solvent displacement method) όπου η νανο-καταβύθιση λαμβάνει χώρα ακαριαία όταν το πρωτεύον διάλυμα προστίθεται στάγδην στο σύστημα που δεν είναι διαλύτης.

Οι Hebeish et al (2014) σχημάτισαν νανοσωματίδια αμύλου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εκτοπισμού του διαλύτη αφού πρώτα εφαρμόστηκαν κάποιες τροποποιήσεις. Έτσι λοιπόν ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ένα υδατικό αλκαλικό μέσο ενώ η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός μη-διαλύτης. Σκοπός αυτών των αλλαγών ήταν να επιτευχθεί η εύρεση μιας απλής και εύκολα αναπαράξιμης μεθόδου σχηματισμού νανοσωματιδίων, χωρίς να απαιτείται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων διαλύτη.

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ποσότητα των σχηματιζόμενων σωματιδίων αλλά και το μέγεθός τους είναι η αρχική συγκέντρωση του αμύλου αλλά και η συγκέντρωση τυχόν επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο οποίος προστίθεται πριν από την καταβύθιση. Η ισχυρή μηχανική ανάδευση που εφαρμόζεται κατά τη διάλυση του αμύλου στον υδατικό αλκαλικό διαλύτη έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των δεσμών των μακρομορίων του αμύλου, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και οι δεσμοί υδρογόνου σε διογκωμένη κατάσταση. Με την προσθήκη του διαλύματος καυστικού νατρίου τα μικρά σωματίδια απομακρύνονται, ενώ η στάγδην προσθήκη της αιθανόλης λειτουργεί ως παράγοντας κατακρήμνισης (Hebeish et al., 2014).

Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν τη βάση για την επιλογή της μεθόδου που περιγράφεται από τον Hebeish et al (2014) για το σχηματισμό νανοσωματιδίων αμύλου.

## 1.7 NANOΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

Η τεχνική της ενθυλάκωσης περιγράφει τη διαδικασία εγκλωβισμού ευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων στη μήτρα (matrix) διάφορων μορίων. Εφαρμόζεται ευρέως στις φαρμακοβιομηχανίες και στις βιομηχανίες τροφίμων, διότι μέσω της συγκεκριμένης

μεθόδου επιτυγχάνεται η ασφαλής μεταφορά των ουσιών αυτών καθώς προστατεύονται από αντίξοα περιβάλλοντα και απελευθερώνονται ελεγχόμενα σε στοχευμένες περιοχές (Ahmad et al., 2019, Ezhilarasi et al., 2013).

Οι δύο βασικές κατηγορίες της ενθυλάκωσης είναι η μικρο-ενθυλάκωση και η νανο-ενθυλάκωση και αποτελεί στόχο τους η βελτίωση των προϊόντων στα οποία εφαρμόζονται (Shishir et al., 2018). Αρχικά η μέθοδος της ενθυλάκωσης εφαρμόστηκε με τη χρήση μικρο-μορίων. Τα τελευταία όμως χρόνια έχει πραγματοποιηθεί η αντικατάσταση των μικρο-μορίων από νανο-μόρια, καθώς λόγω αυξημένης επιφάνειας (surface area) έχει παρατηρηθεί υψηλότερη ικανότητα εγκλωβισμού, βελτίωση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητας όπως και η ελεγχόμενη απελευθέρωση (Shishir et al., 2018, Paredes et al., 2016, Ezhilarasi et al., 2013). Σύμφωνα με τους Hu et al (2002), η επιλογή ενός μικρότερου μεγέθους σωματιδίων (νανοδομές) βελτιώνει τη διαπερατότητα των κυττάρων και τη διαλυτότητα. Κατά συνέπεια παρατηρείται η επιτυχής απορρόφηση των νανοενθυλακωμένων ουσιών στους ιστούς και στα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και η αυξημένη βιοδιαθεσιμότητά τους. Επιπλέον επιτυγχάνεται η αύξηση της βιοδραστικότητας και της σταθερότητας τους με αποτέλεσμα την αποφυγή της υποβάθμισή τους κατά την επαφή τους με άλλα συστατικά κατά τη διάρκεια της πέψης (Ahmad et al., 2019).

Όσον αφορά τις τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό ενθυλακωμένων συστημάτων, αυτές διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες οι οποίες είναι: από την κορυφή προς τη βάση (top-down) και από τη βάση προς την κορυφή (bottom-up) (Joye and McClements, 2014). Στην πρώτη κατηγορία, η μείωση του μεγέθους μεγάλων σωματιδίων και η διαμόρφωση της δομής τους γίνεται μέσω της εφαρμογής δυνάμεων που σκοπό έχουν τη μηχανική τους επεξεργασία. Σε αυτές περιλαμβάνονται η άλεση, ο τεμαχισμός, η γαλακτωματοποίηση, ο συνδυασμός γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη καθώς και τεχνικές εξώθησης που χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων συστατικών. Στη δεύτερη κατηγορία (bottom-up), ο σχηματισμός των σωματιδίων προκύπτει από την αυτό-οργάνωση (self-organization) και την αυτό-συναρμολόγηση (self-assembly) και επηρεάζεται από τις μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (όπως θερμοκρασία, συγκέντρωση κ.ά). Σε αυτές περιλαμβάνονται η ξήρανση μέσω ψεκασμού (spray-drying), η συσσωμάτωση, η συμπλοκοποίηση εγκλεισμού, η ηλεκτροϊνοποίηση (electrospinning), αλλά και η νανοκαταβύθιση η οποία είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι

συγκεκριμένες μέθοδοι καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια και επιτυγχάνεται ο καλύτερος έλεγχος του μεγέθους των σωματιδίων (Jia et al., 2016, Joye and McClements, 2014).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα ενθυλάκωσης διαφόρων ουσιών και καταγράφονται οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για τη ζελατινοποίηση του αμύλου αλλά και για την ενσωμάτωση των μορίων. Για την ενσωμάτωση του β-καροτενίου οι Kong et al (2018) αφού διέλυσαν το άμυλο σε προθερμασμένο διάλυμα DMSO στους 90 °C, στην συνέχεια πρόσθεσαν διάλυμα DMSO/ β-καροτενίου το οποίο θερμάνθηκε ξανά στους 90 °C. Οι Kong and Ziegler (2014) αφού ζελατινοποίησαν το άμυλο σε υδατόλουτρο στους 100 °C, πρόσθεσαν μέσω ηλεκτροψεκασμού (electrospinning) ποσότητα CTAB. Οι Bamidele et al (2019) μελέτησαν την ενθυλάκωση σε μόρια αμύλου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη μέσω της εφαρμογής ξήρανσης υπό ψεκασμό (spray drying). Επιπλέον οι Hasanvand et al (2015) εξέτασαν την ανάπτυξη σωματιδίων στα οποία θα είναι ενθυλακωμένη ποσότητα βιταμίνης D<sub>3</sub>.

Ως φορείς ενθυλάκωσης χρησιμοποιούνται ευρέως οι πολυσακχαρίτες καθώς είναι εύκολα διαθέσιμοι και υπάρχουν διάφορες πηγές προέλευσης (πχ ζώα, φυτά). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το άμυλο αποτελεί ένα από τους αφθονότερους και οικονομικότερους πολυσακχαρίτες. Καθώς είναι υδρόφιλο, δίνεται η δυνατότητα ενθυλάκωσης υδρόφοβων βιοδραστικών ουσιών. Οι Jeon et al (2003), μελέτησαν την ενθυλάκωση αρωματικών ενώσεων οι οποίες προέρχονται από τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας επεξεργασίας κρέατος. Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελεί η χρήση του αμύλου ως φορέας ενθυλάκωσης πολυφαινόλων και συγκεκριμένα γαλλικού οξέος (gallic acid) (Robert et al., 2012). Ακόμη έχει μελετηθεί ο σχηματισμός συμπλόκων αμυλόζης με συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA), εστέρες βιταμινών και λιπαρών οξέων καθώς και ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (Kong and Ziegler, 2014).

Λόγω των ιδιοτήτων του αμύλου το οποίο εμφανίζει στοχευμένη δράση και προστατεύει τις ουσίες οι οποίες έχουν ενθυλακωθεί, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός συμπλόκων με βελτιωμένες μηχανικές και θερμικές ιδιότητες. Επιπλέον, μέσω της εφαρμογής της ενθυλάκωσης στον τομέα των τροφίμων είναι δυνατή η επικάλυψη ανεπιθύμητων αρωμάτων (οσμών), ο περιορισμός της απώλειας των διαφόρων ουσιών λόγω εξάτμισης ή πτητικότητας, καθώς και η βελτίωση της σταθερότητας, της ενεργότητας αλλά και της διάρκειας ζωής των βιοδραστικών ενώσεων (Shishir et al., 2018).

**Πίνακας 1.** Μέθοδοι σχηματισμού ενθυλακωμένων μορίων.

Φορέας Ενθυλάκωσης	Ενθυλακωμένη Ουσία	Ζελατινοποίηση	Ενθυλάκωση	Βιβλιογραφία
Άμυλο καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη	β-καροτένιο	DMSO + Θέρμανση (90 °C)	DMSO + Θέρμανση (90 °C)	Kong et al., 2018
Άμυλο καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη	CTAB	DMSO + Θέρμανση (100 °C)	Ηλεκτροψεκασμός (electrospinning)	Kong and Ziegler, 2014
Άμυλο καλαμποκιού	β-καροτένιο	Θέρμανση (90 °C)	Αιθανόλη + Θέρμανση (90 °C)	Kim and Huber, 2016
Άμυλο αραβοσίτου	AscP	Αιθανόλη + Θέρμανση (95°)	Αιθανόλη + Θέρμανση (60 °C)	Dries et al., 2017
Άμυλο αραβοσίτου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη	AscP	Θέρμανση (50 °C)	Ξήρανση υπό ψεκασμό (Spray drying)	Bamidele et al., 2019
Άμυλο καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη	Βιταμίνη D <sub>3</sub>	KOH + Θέρμανση (80 °C)	Υπέρηχοι (60 κύκλοι-10 sec)	Hasanvand et al., 2019
Άμυλο καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη	Ω3 λιπαρά οξέα	KOH + Θέρμανση (80 °C)	Υπερυψηλή Πίεση	Gökmen et al., 2011

DMSO: Dimethyl sulfoxide

CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide

AscP: Ascorbyl palmitate

## 1.8 ΙΣΧΥΡΟΠΟΙΗΣΗ (ANNEALING)

Η ισχυροποίηση (annealing) ορίζεται ως μια υδροθερμική επεξεργασία η οποία εφαρμόζεται στο άμυλο υπό την παρουσία περίσσειας νερού για παρατεταμένο χρόνο (Zavareze and Dias, 2011). Οι Jayakody and Hoover (2008) αναφέρουν ότι η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα υπερβαίνει τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (glass transition temperature) αλλά βρίσκεται χαμηλότερα από τη θερμοκρασία ζελατινοποίησης.

Μέσω της διαδικασίας αυτής παρατηρείται η τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων του αμύλου, όπως η βελτίωση της κρυσταλλικότητας του και η διευκόλυνση της αλληλεπίδρασης των αλυσίδων του. Άλλες μεταβολές που έχουν παρατηρηθεί μετά την εφαρμογή της ισχυροποίησης είναι η αύξηση της σταθερότητας των κόκκων και η αναδιοργάνωση της δομής τους, ο σχηματισμός διπλών αλυσίδων, η μείωση της διόγκωσης των κόκκων, η μείωση της έκπλυσης της αμυλόζης, η αύξηση της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης καθώς και η μείωση του εύρους της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης. Τόσο η κρυσταλλικότητα όσο και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμυλόζης και λιπιδίων εξαρτώνται από τη βοτανική προέλευση του αμύλου (Zavareze and Dias, 2011, Chung et al., 2009, Tester and Debon, 2000).

## 1.9 β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ

Τα καροτενοειδή αποτελούν την πιο διαδεδομένη κατηγορία φυσικών χρωστικών ουσιών. Πρόκειται για έντονα χρωματισμένα φυτικά συστατικά, στα οποία παρατηρείται ισχυρή σύζευξη. Χαρακτηρίζονται ως ασταθή όταν εκτεθούν στο φως ή στο οξυγόνο. Τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζουν προληπτική δράση τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους έναντι σε μεγάλες διαταραχές της υγείας όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, ο εκφυλισμός ωχράς κηλίδας κλπ. Επιπλέον αρκετές από τις ενώσεις καροτενοειδών έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης (Palozza et al, 2006).

Το β-καροτένιο είναι ένα μικροθρεπτικό συστατικό το οποίο απαντάται σε αφθονία σε διάφορα φρούτα και λαχανικά και εντοπίζεται κυρίως στα καρότα. Στο εσωτερικό του σώματος το β-καροτένιο μετατρέπεται σε ρετινόλη ενώ διαθέτει επιπλέον δραστηριότητα προβιταμίνης Α, καθώς θεωρείται πρόδρομος της. Έχει μελετηθεί αρκετά λόγω των ποικίλων λειτουργιών του οι οποίες συνδέονται με την υγεία του ανθρώπου, όπως είναι η προστασία που προσφέρει ενάντια στον καρκίνο και σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Kim and Huber, 2016, Van Poppel and Goldbohm, 1995). Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης, το β-καροτένιο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των εκφυλιστικών ασθενειών.

Η βασική μοριακή του δομή αποτελείται από οκτώ μονάδες ισοπροπενίου, που περιέχουν 40 άτομα άνθρακα και δύο δακτυλίους στο τέλος της συζευγμένης αλυσίδας διπλού δεσμού. Η χημική του δομή παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Το πορτοκαλί χρώμα του β-καροτενίου αποδίδεται στη μακρά συζευγμένη αλυσίδα (Ribeiro et al, 2008).

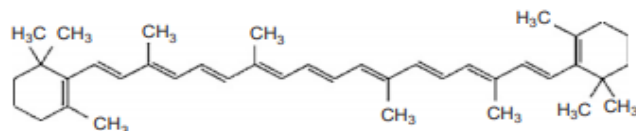


Fig. 2. Chemical structure of  $\beta$ -carotene.

**Εικόνα 6.** Χημική δομή  $\beta$ -καροτενίου (Ribeiro et al., 2008).

Η βιοδιαθεσιμότητα του  $\beta$ -καροτενίου από τα ωμά λαχανικά είναι μικρότερη από 10%, λόγω της αδιαλυτότητας που αυτό εμφανίζει στο νερό και ως αποτέλεσμα είναι μειωμένη η απορρόφησή του από τον ανθρώπινο οργανισμό (Ribeiro et al, 2008).

Εξαιτίας λοιπόν της υδροφοβικότητας του  $\beta$ -καροτενίου, για να επιτευχθεί η αποτελεσματική απορρόφησή του από τα κύτταρα του εντέρου είναι απαραίτητη η ενσωμάτωσή του σε λιπόφιλα μικκύλια. Χρησιμοποιώντας μόρια αμύλου ως φορέα ενθυλάκωσης, δίνεται η δυνατότητα επιτυχούς ενσωμάτωσης του  $\beta$ -καροτενίου. Καθώς η εξωτερική επιφάνεια της μονής αριστερόστροφης έλικας είναι υδρόφιλη, η εσωτερική επιφάνεια του ελικοειδούς καναλιού είναι υδρόφοβη με αποτέλεσμα να είναι κατάλληλη να φιλοξενήσει λιπόφιλα μόρια κατάλληλων διαστάσεων. (Conde-Petit et al,2006). Έτσι επιτυγχάνεται η δημιουργία συμπλόκων αμύλου- $\beta$ -καροτενίου. Με το σχηματισμό λοιπόν του συγκεκριμένου συμπλόκου επιτυγχάνεται η βελτίωση των ιδιοτήτων του  $\beta$ -καροτενίου λόγω των ωφέλιμων ιδιοτήτων του αμύλου και της προστασίας που αυτό προσφέρει στο ενθυλακωμένο μόριο.

### 1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής ήταν η επεξεργασία ανθεκτικού αμύλου και πιο συγκεκριμένα ο σχηματισμός νανοσωματιδίων αμύλου, μέσω της μεθόδου της καταβύθισης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως φορέας ενθυλάκωσης. Στα νανοσωματίδια αυτά πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση ποσότητας  $\beta$ -καροτενίου. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες τροποποιήσεις της αρχικής μεθόδου όσο αφορά τον τρόπο και το χρόνο ξήρασης ο οποίος ακολουθούσε το στάδιο της ενσωμάτωσης. Τέλος μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης, δηλαδή υπολογίστηκε το ποσοστό του  $\beta$ -καροτενίου το οποίο έχει ενσωματωθεί στα νανοσωματίδια.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι άλευρο αραβοσίτου (maize) και παραχωρήθηκε από τον Καθηγητή Dongwei Guo. Το μέγεθός του είναι περίπου 2 $\mu$ m. Χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα αμυλόζης (high amylose), ενώ πρόκειται για μη χημικά τροποποιημένο άλευρο. Για την ονομασία του δείγματος χρησιμοποιείται η κωδικοποίηση HM.

### 2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ

Για την απομόνωση του ανθεκτικού αμύλου (native starch, HMNS), 200 g από άλευρο αραβοσίτου (ακατέργαστο δείγμα), τα οποία μετρήθηκαν σε ζυγαριά ακριβείας της εταιρείας KERN “770” με ακρίβεια  $\pm 0,001$ , αναμείχθηκαν σε 1000 mL απεσταγμένου νερού και αναδεύτηκαν ομοιόμορφα με τη χρήση του ομογενοποιητή Ultra Turax T25 digital (IKA– WERKE, Germany) (Εικόνα 7). Η χρήση του απεσταγμένου νερού πραγματοποιήθηκε για την αποφυγή ξένων υλών που τυχόν να εμφανίζονταν στο νερό βρύσης.



**Εικόνα 7.** Ομογενοποιητής Ultra Turax T25 digital (IKA– WERKE, Germany) (<https://www.ika.com/en/Products-Lab-Eq/Dispersers-Homogenizer-csp-177>).

Το ομογενοποιημένο μείγμα περάστηκε από κόσκινο ανοξείδωτου χάλυβα 150  $\mu$ m. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Στη συνέχεια το κοσκινισμένο μείγμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης 50 mL και φυγοκεντρήθηκε τρεις φορές στις 2000 rpm για 20 min σε φυγόκεντρο Hettich Centifuge Universal 320R, Germany (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Φυγόκεντρος (Hettich Centrifuge, Universal 320R, Germany).

Το προκύπτον υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε ενώ στο ίζημα το οποίο αποτέθηκε στους σωλήνες φυγοκέντρωσης, προστέθηκαν 40 mL υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,5% w/v για τουλάχιστον 4 h. Ακολούθησε η απόρριψη του υπερκείμενου και η προσθήκη 40 mL NaOH για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών. Το διάλυμα αναμίχθηκε ομοιόμορφα και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 min. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκαν 30 mL απόλυτης αιθανόλης (Sigma-Aldrich) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 3 φορές.

Τέλος οι σωλήνες φυγοκέντρωσης ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε φούρνο Memmert (Εικόνα 9α) όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση στους 60°C. Η διαδικασία της ξήρανσης διήρκεσε 12 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινο ξηραντήριο (desiccator) (Εικόνα 9β), ώστε να αποφευχθεί η απορρόφηση υγρασίας από το περιβάλλον. Τα δείγματα παρέμειναν στο ξηραντήριο για περίπου 20 λεπτά μέχρις ότου αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**α.**

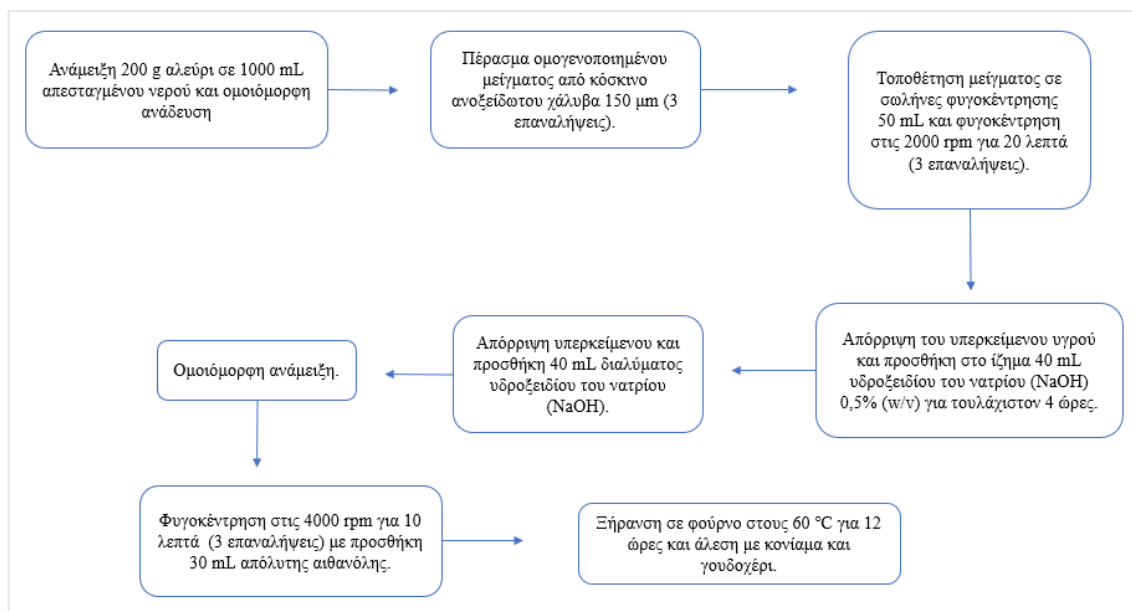


**β.**

**Εικόνα 9.** (α) Φούρνος (Mettmert), (β) Ξηραντήρας.

Τα δείγματα ζυγίστηκαν άμεσα με τον περιέκτη και ακολούθησε άλεση με κονίαμα και γουδοχέρι. Το συνολικό παραχθέν ανθεκτικό άμυλο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο πλαστικό περιέκτη και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν κατά την απομόνωση του ανθεκτικού αμύλου, παρουσιάζονται παρακάτω (Σχήμα 1).



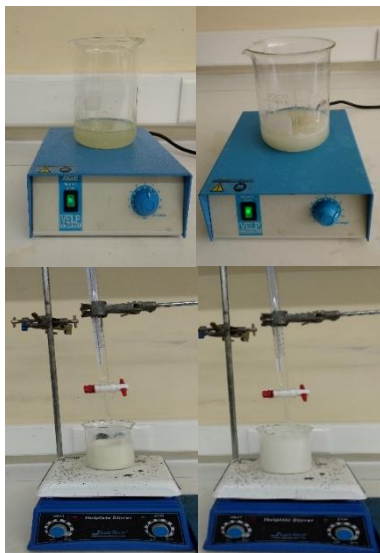
Σχήμα 1. Διαδικασία απομόνωσης ανθεκτικού αμύλου.

### 2.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ

Για την ανάπτυξη των νανοςωματιδίων αμύλου (nanoprecipitated starch) (HMNP) εφαρμόζεται η μέθοδος της καταβύθισης (precipitation) που χρησιμοποίησαν οι Hebeish et al (2014). Σε 100 mL απεσταγμένου νερού, διαλύθηκε 1,5 g υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα διαλύτη. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 g ανθεκτικού αμύλου. Το μείγμα αναδεύονταν συνεχώς μηχανικά για χρονικό διάστημα 2 ωρών σε θερμοκρασία 25 °C, μέχρι το σχηματισμό ομογενούς ζελατινοποιημένου αμύλου. Ακολούθησε η στάγδην προσθήκη 100 mL αιθανόλης στο διάλυμα του ζελατινοποιημένου αμύλου υπό έντονη μηχανική ανάδευση. Τα στάδια σχηματισμού νανοςωματιδίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.

Το παραγόμενο εναιώρημα των νανοςωματιδίων αμύλου φυγοκεντρήθηκε στις 4500 rpm για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ τα νανοςωματίδια αμύλου που παραλήφθηκαν από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης, καθαρίστηκαν περαιτέρω μέσω διπλής φυγοκέντρησης όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αιθανόλης - απεσταγμένου νερού

σε αναλογία 80:20. Για την απομάκρυνση του νερού και τυχόν ουσιών οι οποίες δεν αντέδρασαν πραγματοποιήθηκε μια τελική έκπλυση με αιθανόλη.

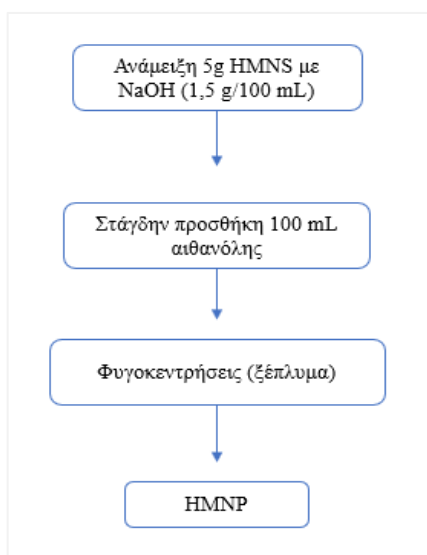


**Εικόνα 10.** Στάδια σχηματισμού νανοσωματιδίων αμύλου.

Τέλος οι σωλήνες φυγοκέντρησης ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε φούρνο όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση στους 40°C. Η διαδικασία της ξήρανσης διήρκεσε 6 ώρες. Η διάρκεια της ξήρανσης επιλέχθηκε σύμφωνα με τους χρόνους που αναφέρονται στην μελέτη των Yan et al (2017). Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινο ξηραντήριο (desiccator), ώστε να αποφευχθεί η απορρόφηση υγρασίας από το περιβάλλον. Τα δείγματα παρέμειναν στο ξηραντήριο για περίπου 20 λεπτά μέχρις ότου αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα δείγματα ζυγίστηκαν άμεσα με τον περιέκτη και ακολούθησε άλεση με κονίαμα και γουδοχέρι. Το συνολικό παραχθέν ανθεκτικό άμυλο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο πλαστικό περιέκτη και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

Ο τρόπος σχηματισμού των νανοσωματιδίων αμύλου παρουσιάζεται στην Σχήμα 2.



**Σχήμα 2.** Διαδικασία σχηματισμού νανοσωματιδίων αμύλου (HMNP).

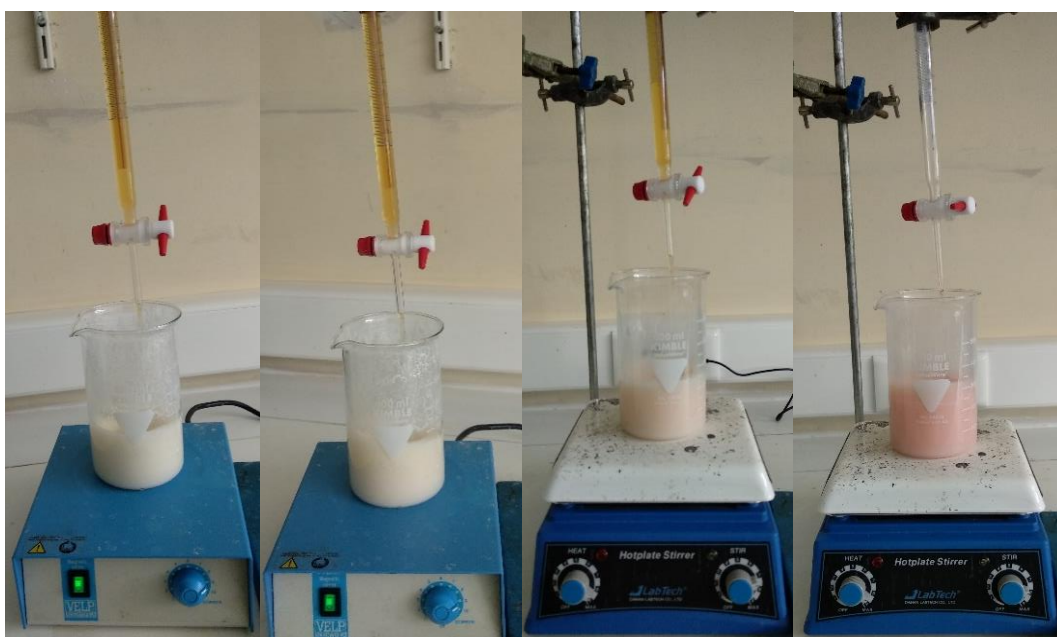
Επίσης πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση της ποσότητας του καυστικού νατρίου (NaOH) που διαλύονταν στα 100 mL απεσταγμένου νερού. Οι ποσότητες που επιλέχθηκαν ήταν 1,25 g και 2,5 g NaOH αντίστοιχα. Ωστόσο, η εμφάνιση των παραγόμενων δειγμάτων δεν ήταν ικανοποιητική όσον αφορά την κοκκομετρία τους, γι' αυτό και προτιμήθηκε το 1,5 g καυστικού νατρίου.

Η συγκεκριμένη μέθοδος καταβύθισης επιλέχθηκε μετά από προπειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τη δημιουργία νανοσωματιδίων και στα οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των υπερήχων σύμφωνα με τους Bel Haaj et al (2013). Η ισχύς των υπερήχων ορίστηκε στα 170W. Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάστηκαν 100 mL εναιωρήματος αμύλου με περιεκτικότητα 1,5% το οποίο βυθίστηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία η οποία διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα με τη συνεχή προσθήκη πάγου. Το δείγμα επεξεργάστηκε με τη τεχνική των υπερήχων στο 80% της ισχύος για συνολικό χρονικό διάστημα 35 λεπτών. Η μέθοδος αυτή απορρίφθηκε εξαιτίας πιθανής καταστροφής του δείγματος.

## **2.4 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ**

Για την επίτευξη της ενθυλάκωσης του β-καροτενίου χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός μεθόδων. Αρχικά ακολουθήθηκε η μέθοδος των Hebeish et al (2014) η οποία περιγράφηκε προηγουμένως. Τα παραγόμενα ξηρά νανοσωματίδια αμύλου διαλύθηκαν σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 40% το οποίο θερμάνθηκε στους 70°C για 10 λεπτά

(annealing). Το διάλυμα αφέθηκε να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συνεχή έντονη ανάδευση πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα σχεδόν μιας ώρας, η στάγδην προσθήκη 5mg β-καροτενίου τα οποία είχαν διαλυθεί σε 100 mL αιθανόλης. Τα διάφορα στάδια κατά την προσθήκη του β-καροτενίου παρουσιάζονται στην Εικόνα 11. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 9000 rpm για 10 λεπτά ώστε να ανακτηθούν τα παραγόμενα σύμπλοκα αμύλου-β-καροτενίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας του β-καροτενίου. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλήφθηκε 4 φορές (Kim and Huber, 2016). Οι σωλίνες φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν σε φούρνο όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση στους 40°C για 6 ώρες. Ακολούθησε άλεση με κονίαμα και γουδοχέρι και το συνολικό παραχθέν δείγμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο πλαστικό περιέκτη και αποθηκεύτηκε στους 4°C.



**Εικόνα 11.** Προσθήκη β-καροτενίου.

Για την ονομασία των δειγμάτων εφαρμόστηκε συγκεκριμένη κωδικοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, το πρόθεμα HM αντιστοιχούσε στο High amylose Maize, το πρόθεμα A στη διαδικασία Annealing, το NP στο καταβυθισμένο άμυλο (NanoPrecipitated starch) και το C στην προσθήκη β-καροτενίου (β-Carotene). Έτσι λοιπόν, το δείγμα που παρασκευάστηκε με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω ονομάστηκε δείγμα HMANPC2.

Για την παρασκευή του δείγματος HMANPC1 εφαρμόστηκε αρχικά η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αμύλου. Μετά την

τέταρτη φυγοκέντρωση η οποία ακολουθεί την στάγδην προσθήκη της αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του δείγματος σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 40% που θερμάνθηκε για 10 λεπτά στους 70°C (annealing). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που εφαρμόστηκε για τον σχηματισμό του δείγματος HMANPC2.

Όσον αφορά το σχηματισμό του δείγματος HMANPC3 ακολουθούνται τα ίδια βήματα με εκείνα του σχηματισμού του δείγματος HMANPC1 μέχρι το στάδιο της θέρμανσης στους 70°C για 10 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 4000 rpm και ξηράνθηκε στο φούρνο σε θερμοκρασία 40°C για 6 ώρες. Μετά την ξήρανση, το επεξεργασμένο άμυλο διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης στο οποίο προστέθηκαν στάγδην 5mg β-καροτενίου τα οποία ήταν διαλυμένα σε 100 mL αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες της φυγοκέντρωσης και της ξήρανσης όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

Από τα παραχθέντα δείγματα HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3, επιλέχθηκε το δείγμα HMANPC1 και επαναλήφθηκε η διαδικασία ανάπτυξης συμπλόκων αμύλου-β-καροτενίου με μερικές τροποποιήσεις στα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τον τρόπο ξήρανσης καθώς αντί για 6 ώρες, η ξήρανση στο φούρνο (Oven) διαρκεί 12 ώρες (Δείγμα HMANPCO<sub>12</sub>) και επιπλέον αντί της χρήσης φούρνου πραγματοποιείται ξήρανση μέσω λυοφιλίωσης (freeze drying) (Δείγμα HMANPCFR). Μία ακόμα τροποποίηση της πειραματικής διαδικασίας είναι η παράλειψη του σταδίου της θέρμανσης στους 70°C για 10 λεπτά και η απευθείας προσθήκη του β-καροτενίου αμέσως μετά το τέλος των φυγοκεντρήσεων (Δείγμα HMANPC). Επίσης πραγματοποιήθηκε επανάληψη της αρχικής πειραματικής διαδικασίας (Δείγμα HMANPCR).

Στον Πίνακα 2 απεικονίζονται τα διαφορετικά δείγματα που παρασκευάστηκαν και τα επιμέρους στάδια που ακολουθήθηκαν κατά την παρασκευή τους.

**Πίνακας 2.** Στάδια της πειραματικής διαδικασίας στα διαφορετικά δείγματα.

Δείγματα	Θέρμανση 70°C 10min	Προσθήκη 5mg β- καροτενίου	Ξήρανση 40°C 6h	Ξήρανση 40°C 12h	Ξήρανση Freeze drying
HMANPC1	✓	✓	✓		
HMANPC2	✓	✓	✓		
HMANPC3	✓	✓	✓		
HMANPCFR	✓	✓			✓
HMNPC		✓	✓		
HMANPCO <sub>12</sub>	✓	✓		✓	
HMANPCR	✓	✓	✓		

HM: High Amylose Maize Starch

A: Annealing

NP: Nano-Precipitated Starch

C: β-Carotene

FR: Freeze Drying

O<sub>12</sub>: Ξήρανση στους 40 °C για 12 ώρες

R: Επαναληπτικό Δείγμα

Ακολούθως παρατίθεται ο Πίνακας 3 στον οποίο περιγράφεται η παραγωγή των δειγμάτων HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3 αλλά και η διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων σχηματισμού των συγκεκριμένων δειγμάτων (Σχήμα 3α), αλλά και των τροποποιήσεων του δείγματος HMANPC1 (Σχήμα 3β).

Κατά το στάδιο των προπειραμάτων πραγματοποιήθηκε και η προσθήκη ποσότητας βιταμίνης C η οποία είναι υδατοδιαλυτή. Λόγω της δομής του αμύλου αναμένονται διαφορές μεταξύ της προσθήκης βιταμίνης C και β-καροτενίου καθώς όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η εσωτερική υδρόφοβη επιφάνεια του αμύλου ευνοεί την ενθυλάκωση λιπόφιλων μορίων. Η ενθυλάκωση της βιταμίνης C δεν μελετήθηκε περαιτέρω εξαιτίας των μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν μετά την πραγματοποίηση ορισμένων μετρήσεων.



**Πίνακας 3.** Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας για την παραγωγή των δειγμάτων HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3.

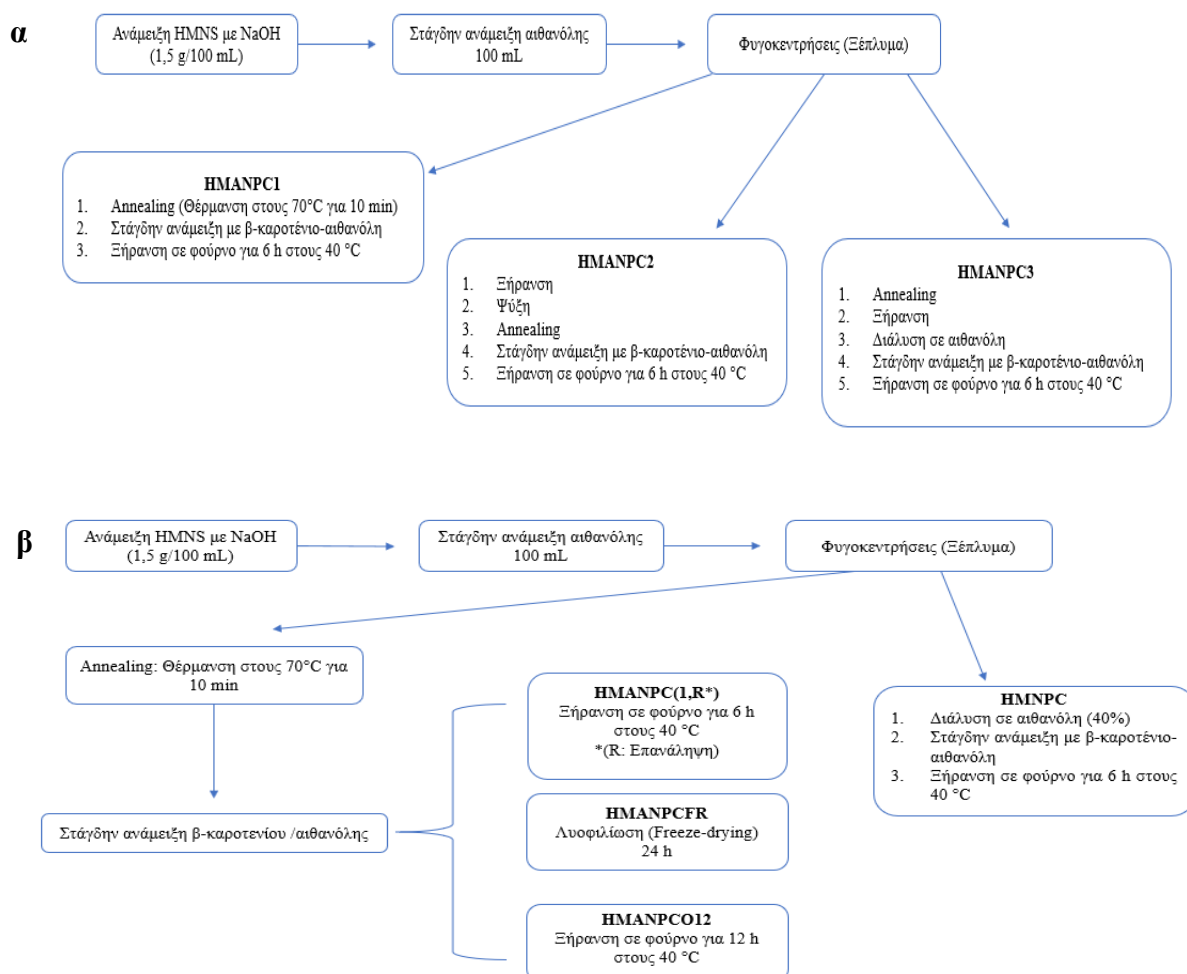
Δείγματα	Περιγραφή
HMANPC1	Θέρμανση στους 70°C και απευθείας στάγδην ανάμειξη αιθανόλης/β-καροτενίου
HMANPC2	Ξήρανση-Ψύξη-Θέρμανση στους 70°C και απευθείας στάγδην ανάμειξη αιθανόλης/β-καροτενίου
HMANPC3	Θέρμανση στους 70°C και στάγδην ανάμειξη αιθανόλης-Στάγδην ανάμειξη αιθανόλης/β-καροτενίου

HM: High Amylose Maize Starch

A: Annealing

NP: Nano-Precipitated Starch

C: β-Carotene



**Σχήμα 3.** Στάδια σχηματισμού των δειγμάτων (α) HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3 και (β) HMANPC1, HMANPCR, HMANPCFR, HMANPCO<sub>12</sub>, HMNPC.

## **2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΟΚΚΩΝ ΑΜΥΛΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS)**

Για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων του επεξεργασμένου αμύλου εφαρμόστηκε η μέθοδος της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd, UK) (Εικόνα 12). Μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού σωματιδίων των οποίων το μέγεθος (διάμετρος) κυμαίνεται μεταξύ 0,3 nm έως 10 μm. Για τον υπολογισμό του μεγέθους χρησιμοποιείται ένας δειγματοφορέας- κυβέτα με ελάχιστο όγκο δείγματος τα 12 mL.



**Εικόνα 12.** Συσκευή υπολογισμού μεγέθους σωματιδίων. Zetasizer Nano ZS- Malvern (<https://www.malvernpanalytical.com/en/products>).

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων, 10 mg επεξεργασμένου αμύλου διαλύθηκαν σε 100 ml απεσταγμένου νερού και αναδεύθηκαν για χρονικό διάστημα περίπου μιας ώρας. Στη συνέχεια, 5 mL από το διάλυμα προστέθηκαν σε 200 mL απεσταγμένου νερού οπότε παρασκευάστηκε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 0,0025 mg/mL. Ακολούθησε η τοποθέτηση του διαλύματος σε ειδικό δειγματοφορέα (κυβέτα). Η ελάχιστη ποσότητα που μπορεί να προστεθεί στην κυβέτα είναι 12 mL. Η καταγραφή των τελικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του ειδικού λογισμικού προγράμματος του μηχανήματος (Zetasizer Software).

## **2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΕΡΙΘΛΑΣΕΩΣ ΑΚΤΙΝΩΝ X (XRD)**

Η κρυσταλλικότητα του αμύλου αλλά και των συμπλόκων αμύλου-β-καροτενίου που αναπτύχθηκαν μελετήθηκε μέσω της συσκευής D8 Venture (Bruker, USA) (Εικόνα 13). Επιπλέον εξετάστηκε η πιθανότητα ενθυλάκωσης. Οι Kong and Ziegler (2018) αλλά και οι

Kim and Huber (2016) χρησιμοποίησαν τη συγκεκριμένη τεχνική για τη μελέτη του τύπου της κρυσταλλικότητας.

Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής ρυθμίστηκαν στα 50 kV και 50 mA, ακτινοβολίας Cu K $\alpha$  με μήκος κύματος 0,1542 nm ως πηγή ακτίνων X. Η σάρωση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε απόσταση 37 και 50 mm αντίστοιχα. Η γωνία περίθλασης ( $2\theta$ ) με την οποία να εκτελείται η σάρωση ορίστηκε από 1° έως 50° με ταχύτητα σάρωσης 1°/ sec.



**Εικόνα 13.** Συσκευή περίθλασης ακτίνων X (XRD) (D8 Venture, Bruker) (<https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis>).

Τα δείγματα αμύλου τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε τριχοειδείς σωλήνες οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως δειγματοφορείς. Στην συνέχεια, οι δειγματοφορείς τοποθετούνται στο μηχάνημα. Η κρυσταλλικότητα των διάφορων δειγμάτων υπολογίζεται με τη χρήση ειδικού λογισμικού.

## **2.7 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ Fourier (FTIR)**

Η τεχνική της υπέρυθρης φασματοσκοπίας βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, η οποία προκαλεί τη διέγερσή τους σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής είναι δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ομάδων οι οποίες απαρτίζουν το μόριο (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

Για τη λήψη των φασμάτων FT-IR χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο υπέρυθρου Nicolet 7600 Thermo Electron Corporation (Thermo Fisher Scientific, USA) (Εικόνα 14). Το όργανο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, στον οποίο είναι

εγκατεστημένο το ειδικό λογισμικό OMNIC 9.1.24 με το οποίο πραγματοποιείται η επεξεργασία των φασμάτων. Εφαρμόστηκε η τεχνική των δισκίων, όπου τα δείγματα, υπό μορφή σκόνης, αναμειγνύονται σε κατάλληλες αναλογίες ώστε να γίνουν δισκία. Συγκεκριμένα, 20mg του εκάστοτε δείγματος αναμείχθηκαν με 200mg βρωμιούχου καλίου (KBr). Ακολούθησε πολύ καλή ομογενοποίηση σε γουδί και συμπίεση σε πρέσα, για χρονικό διάστημα 2 έως 5 λεπτών, με αντλία για την αποτελεσματικότερη κατασκευή του δισκίου. Στη συνέχεια, τα δισκία μεταφέρθηκαν σε ειδικό υποδοχέα για τη λήψη του φάσματος, χωρίς να έχουν υποστεί την οποιαδήποτε χημική προεργασία. Αρχικά λήφθηκε ανά δείγμα το υπόβαθρο (background) με δισκία βρωμιούχου καλίου (KBr) (220mg) ως φάσμα αναφοράς (υποβάθρου). Για κάθε δείγμα λήφθηκε ένα φάσμα στο οποίο πραγματοποιούνται 100 σαρώσεις (scans). Όσον αφορά τις παραμέτρους της συσκευής, η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν  $0,3165 \text{ mm/s}$ .



**Εικόνα 14.** Συσκευή Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (Nicolet 7600 Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific, USA).

Στα αρχικά φάσματα FTIR εφαρμόστηκαν ορισμένες συνήθεις μέθοδοι επεξεργασίας όπως είναι η εξομάλυνση του σήματος με την οποία επιτυγχάνεται η αισθητή μείωση του θορύβου στην εικόνα του δείγματος. Επιπλέον πραγματοποιείται διόρθωση της βασικής γραμμής, καθώς συχνά αποτελείται από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδενική. Η διόρθωση αυτή θεωρείται απαραίτητη όταν τα φάσματα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση ή για τη σύγκριση δύο ή περισσότερων φασμάτων. Τέλος πραγματοποιείται η αναγωγή της κλίμακας της απορρόφησης στη μονάδα με σκοπό τη διευκόλυνση της σύγκρισης των φασμάτων.

## 2.8 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ - ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού αποτελεί μια οπτική μέθοδο ανάλυσης η οποία στηρίζεται στην ικανότητα κάποιων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Τα ηλεκτρόνια σθένους των εκάστοτε μορίων όταν δεχθούν υπεριώδη ακτινοβολία (200-400nm) και ορατή ακτινοβολία (400-800nm), απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα να διεγείρονται από τη βασική τους στάθμη σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την παρουσίαση των φασμάτων απορρόφησης είναι ο διαλύτης, το pH, οι χρωμοφόρες και οι αυξόχρωμες ομάδες, η συζυγία και η στεreoχημεία.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενθυλάκωσης του β-καροτενίου στα σύμπλοκα του αμύλου χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-1800, UV-Vis Spectrophotometer, (Shimadzu, Kyoto, Japan) (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Συσκευή Φασματοφωτομετρίας (UV-1800, UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu).

Ως φάσμα απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν τα 455 nm σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kim and Huber, 2016). Τα σύμπλοκα αμύλου-β-καροτενίου (10mg) προστέθηκαν σε 1 mL καυστικού νατρίου (NaOH) 1N και διαλύθηκαν υπό γρήγορη ανάδευση. Για την εξαγωγή του β-καροτενίου, στο διάλυμα προστέθηκαν 3 ml κυκλοεξανίου (cyclohexane), συνεχίζοντας την ανάδευση. Το κυκλοεξάνιο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης καθώς δεν απορροφά στην ίδια θέση με το β-καροτένιο αλλά απορροφά σε μήκος κύματος 195nm και επηρεάζει ελαφρώς τη θέση της μέγιστης απορρόφησης.

Αρχικά τοποθετήθηκαν στη συσκευή δύο κυψελίδες χαλαζία που περιέχουν περίπου 3ml κυκλοεξανίου (cyclohexane) (τυφλό δείγμα), το οποίο λειτούργησε ως μάρτυρας. Στη συνέχεια προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα β-καροτενίου σε ορισμένο όγκο

κυκλοεξανίου τα οποία μετρήθηκαν, για την εξαγωγή πρότυπης καμπύλης. Ακολούθησε η μέτρηση του β-καροτενίου που εξήχθη από τα σύμπλοκα αμύλου και το οποίο περιεχόταν στη φάση του κυκλοεξανίου.

Για την εξαγωγή του φάσματος καθορίζονται τα όρια του μήκους κύματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το εύρος του φάσματος ορίστηκε από τα 400 έως τα 800 nm. Ακολούθησε σύγκριση της τιμής της απορρόφησης που καταγράφηκε από το δείγμα με εκείνες που εμφάνιζε η πρότυπη καμπύλη του β-καροτενίου.

Για να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουσίας κατασκευάζεται μια καμπύλη η οποία προκύπτει από τη μέτρηση της απορρόφησης μιας σειράς διαλυμάτων διαφόρων γνωστών συγκεντρώσεων β-καροτενίου και σχεδιάζοντας ακολούθως το διάγραμμα απορρόφησης προς τη συγκέντρωση. Η καμπύλη αυτή ονομάζεται καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη) και δίνει τη δυνατότητα εύρεσης της συγκέντρωσης άγνωστου διαλύματος β-καροτενίου.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, 0,5mg β-καροτενίου διαλύονται σε 50mL κυκλοεξανίου (cyclohexane) και στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις σε αναλογία β-καροτενίου:κυκλοεξάνιο 1:1. Οι τιμές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων και η αντίστοιχη απορρόφηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Συγκέντρωση των διαλυμάτων β-καροτενίου συναρτήσει της απορρόφησης.

Περιεκτικότητα (μg/mL)	Απορρόφηση
10,0	1,9858
5,0	1,0046
2,5	0,5132
1,25	0,2695
0,625	0,1425
0,3125	0,0711
0,1563	0,0371
0,0781	0,018
0	0

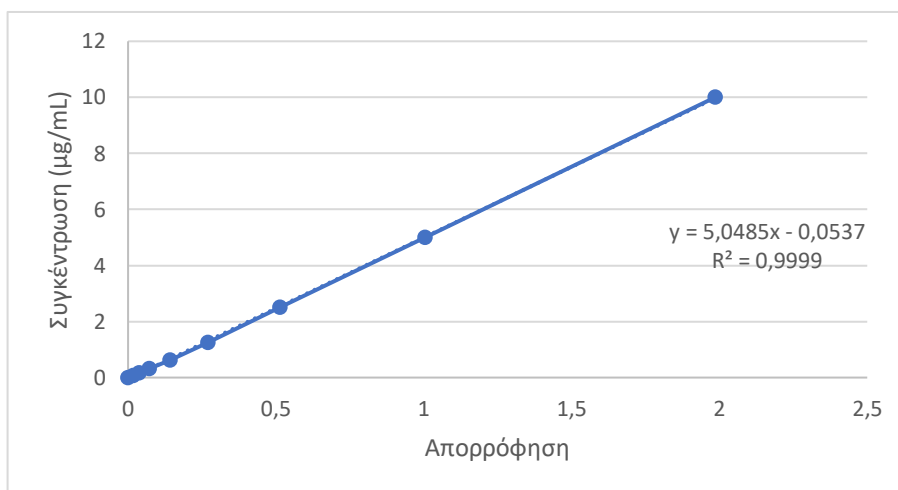
Η γραφική παράσταση στην οποία απεικονίζεται η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας συναρτήσει της απορρόφησης παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 4) και εκφράζεται από την Εξ. (2):

$$y = 5,0485x - 0,0537 \quad (2)$$

όπου:

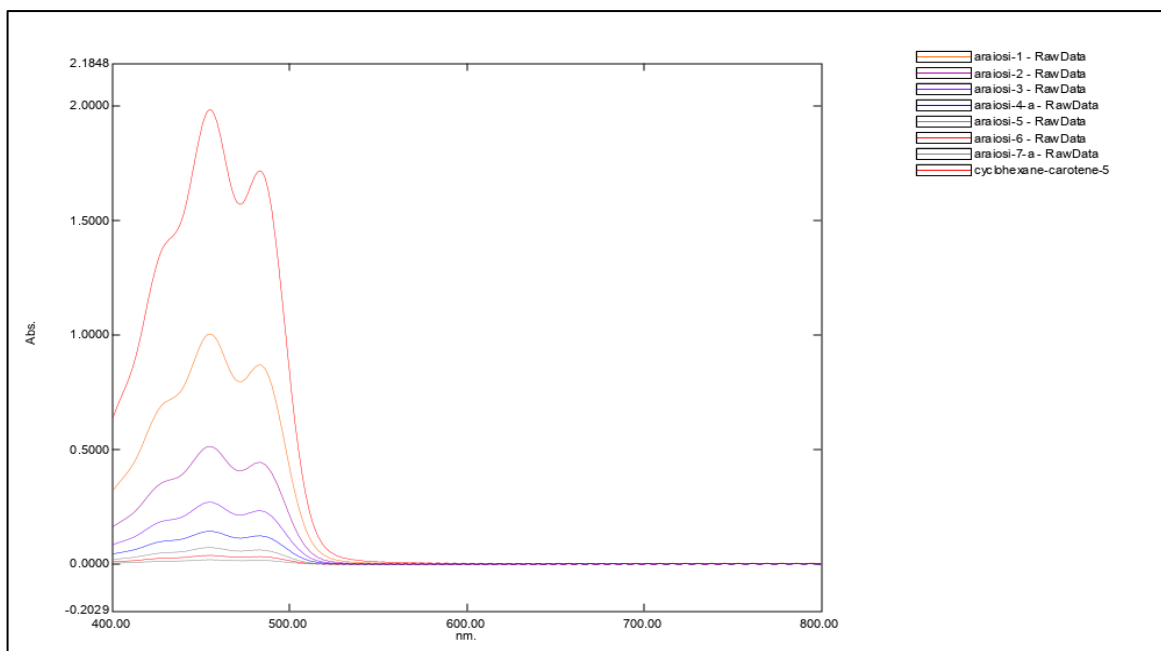
y: συγκέντρωση του διαλύματος που αναζητείται

x: απορρόφηση του διαλύματος



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης.

Επιπλέον παρατίθεται η απεικόνιση του φάσματος της καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Φάσμα απορρόφησης πρότυπης καμπύλης για μήκος κύματος 400-800nm.

## 2.9 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSC)

Για τη μελέτη των μεταβάσεων φάσης αλλά και της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης τόσο του ακατέργαστου δείγματος αμύλου όσο και των τροποποιημένων δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της συσκευής DSC Q100, TA Instruments (NewCastle, DE, USA) (Εικόνα 16). Τα δείγματα ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας, ώστε το βάρος τους να μην υπερβαίνει τα 2 mg. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά καψίδια, τα οποία κλείνουν ερμητικά. Με τη βοήθεια πιπέτας, προστέθηκαν 20  $\mu\text{L}$  απεσταγμένου νερού. Τα καψίδια σφραγίστηκαν με τη χρήση ειδικής πρέσας. Στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί η ενυδάτωση του αμύλου. Οι θερμοκρασίες στις οποίες μελετήθηκαν τα δείγματα, κυμάνθηκαν από 20  $^{\circ}\text{C}$  έως 180  $^{\circ}\text{C}$ , με σκοπό να προσδιοριστούν οι διάφοροι παράμετροι.

Για την καταγραφή των θερμικών ιδιοτήτων των δειγμάτων σε υψηλότερες θερμοκρασίες θα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν καψίδια υψηλής πίεσης καθώς τα άλλα καψίδια παρουσίαζαν διαρροή. Επιπλέον αν και η προτεινόμενη ποσότητα δείγματος είναι 3-5 mg, στη συγκεκριμένη περίπτωση ζυγίστηκε συνολική ποσότητα δείγματος περίπου 20mg ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία στα αποτελέσματα των μετρήσεων. (Yu and Christie, 2001).



**Εικόνα 16.** Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC Q100, TA Instruments, NewCastle, DE, USA) <https://www.bidspotter.com/en-us/auction-catalogues>.



## 2.10 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

Για τον υπολογισμό της υγρασίας των δειγμάτων αμύλου-β-καροτενίου χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός ζυγός Gibertini - Eurotherm (Milan, Italy). Αρχικά ζυγίστηκαν σε αλουμινόχαρτο περίπου 100 mg από κάθε δείγμα τα οποία ξηράνθηκαν. Ακολούθησε η ζύγιση του ξηρού δείγματος και στη συνέχεια προσδιορίστηκε κατά πόσο μειώνεται το βάρος του δείγματος. Το ποσοστό υγρασίας υπολογίστηκε μέσω της Εξ. (3):

$$\text{Υγρασία (\%)} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος} - \text{Τελικό Βάρος}}{\text{Αρχικό Βάρος}} * 100 \quad (3)$$

## 2.11 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΝΕΡΟΥ( $a_w$ )

Σκοπός της ξήρανσης των διαφόρων τροφίμων είναι η μείωση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ), η οποία ορίζεται ως η ποσότητα του διαθέσιμου νερού που υπάρχει στα τρόφιμα και χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξη και τη δράση τους. Η ενεργότητα νερού αποτελεί λοιπόν έναν παράγοντα που σχετίζεται με την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων.

Για τη μέτρηση της ενεργότητας νερού χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Hygrolab C1 (Rotronic AG, Bassersdorf, Schweiz) (Εικόνα 17). Αρχικά το δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδικούς δειγματοφορείς (τρουβλίο) τόση ποσότητα ώστε να καλυφθεί η επιφάνειά του και στη συνέχεια τοποθετήθηκε ανοιχτό στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου. Ο χρόνος παραμονής του δείγματος στη συσκευή εξαρτάται από το πότε θα παρατηρηθεί σταθεροποίηση της ένδειξης της ενεργότητας η οποία εμφανίζεται πάνω στο όργανο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ως χρόνος παραμονής επιλέχθηκαν τα 20 λεπτά καθώς η μεταβολή της ένδειξης από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και μετά ήταν μικρή.

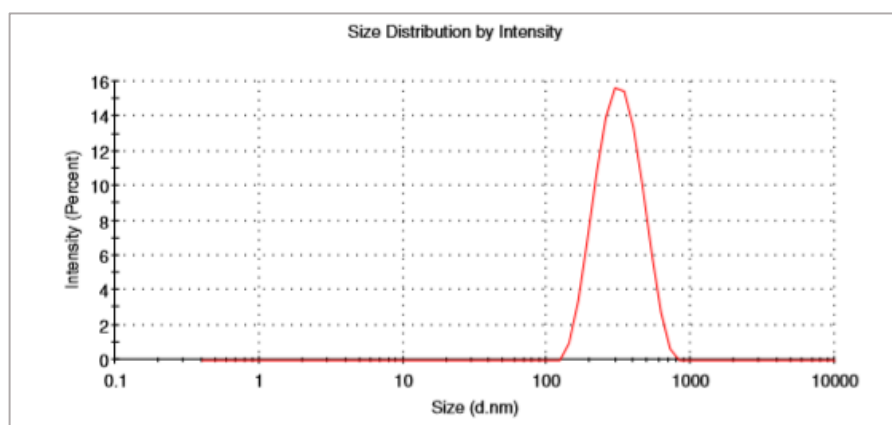


**Εικόνα 17.** Συσκευή μέτρησης  $a_w$  (Hygrolab C1 (Rotronic AG, Bassersdorf, Schweiz)).

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

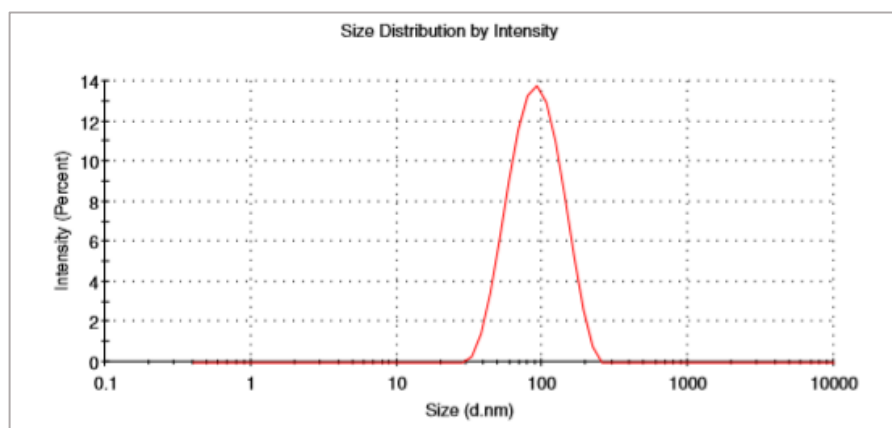
#### 3.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ DLS

Το μέγεθος των σωματιδίων των παραγόμενων δειγμάτων προσδιορίστηκε μέσω της τεχνικής της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Όσον αφορά τα σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαδικασία της καταβύθισης, το μέγεθός τους προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στα 298,93 nm κάτι που επιβεβαιώνει τον σχηματισμό σωματιδίων της κλίμακας νάνο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο Σχήμα 6 .



**Σχήμα 6.** Μέγεθος σωματιδίων αμύλου μετά τη διαδικασία της καταβύθισης.

Το μέγεθος των συμπλόκων αμύλου-β-καροτενίου (HMANPCR) προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στα 86,45 nm (Σχήμα 7). Παρατηρείται ότι το μέγεθος των συμπλόκων είναι αισθητά μικρότερο από τα νανοσωματίδια αμύλου, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στην περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, δηλαδή στην εφαρμογή θέρμανσης στους 70 °C για 10 λεπτά (annealing).



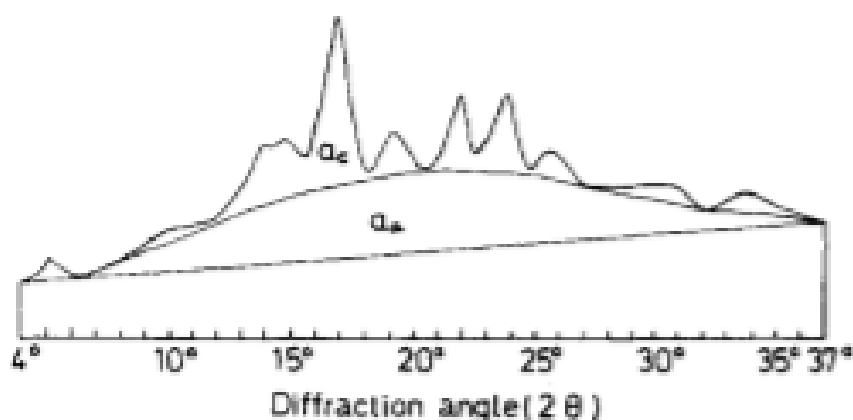
**Σχήμα 7.** Μέγεθος συμπλόκου αμύλου-β-καροτενίου (δείγμα HMANPCR).

Για την επιβεβαίωση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός του μεγέθους και της μορφολογίας των κόκκων αμύλου με τη χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM).

### 3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΜΥΛΟΥ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της κρυσταλλικότητας των διαφόρων δειγμάτων αμύλου και των συμπλόκων αμύλου-β-καροτενίου εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης του λογισμικού DIFFRAC. EVA και εκφράστηκε μέσω της σχετικής κρυσταλλικότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε από τους Nara and Komiya, 1983. Η μέτρηση της κρυσταλλικότητας των κόκκων του αμύλου βασίστηκε στο διαχωρισμό των τμημάτων του σε κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές, όπως αυτές αποτυπώνονται στα διαγράμματα περίθλασης ακτινών X.

Πιο συγκεκριμένα, τα κρυσταλλικά και άμορφα τμήματα του αμύλου παρουσιάζονται στο Σχήμα 8. Η ανώτερη περιοχή ( $a_c$ ) οριοθετήθηκε μέσω μιας ομαλής καμπύλης η οποία συνέδεε όλα τα σημεία με την ελάχιστη ένταση και αποτελούσε το κρυσταλλικό τμήμα. Η απόσταση μερικών σημείων από την καμπύλη ήταν αρκετά μεγάλη και για το λόγο αυτό δεν συνενώθηκαν μέσω αυτής. Αντίθετα, η κατώτερη περιοχή ( $a_a$ ) ορίστηκε ως η περιοχή που περιλαμβάνονταν μεταξύ της ομαλής καμπύλης και μιας ευθείας γραμμής (baseline) η οποία συνέδεε τα δύο σημεία έντασης στο εύρος γωνιών  $2\theta$  μεταξύ  $4^\circ$  έως  $37^\circ$  και αντιστοιχούσε στο άμορφο τμήμα.



Σχήμα 8. Περίθλαση ακτινών X για το άμυλο πατάτας (Nara and Komiya, 1983).

Η σχετική κρυσταλλικότητα (R.C.) υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού με τη χρήση της Εξ. (4):

$$R.C. \% = \frac{a_c}{a_t} \quad (4)$$

όπου

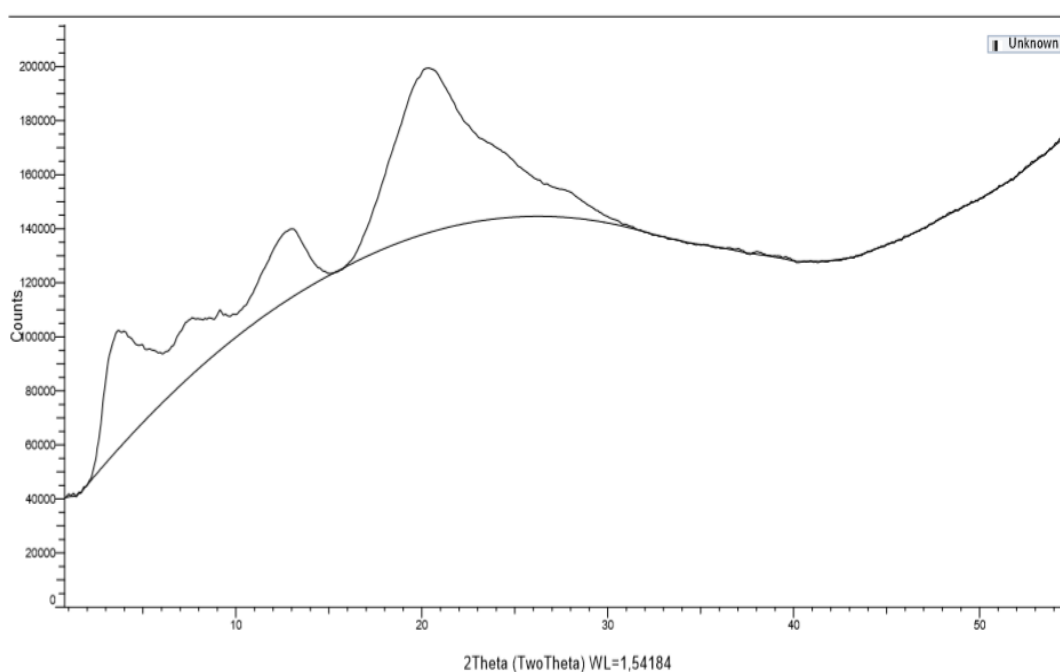
R.C%: Ποσοστό σχετικής κρυσταλλικότητας

$a_c$ : Κρυσταλλική περιοχή

$a_t: a_c + a_a$

$a_t$ : Συνολική περιοχή,  $a_a$ : Άμορφη περιοχή

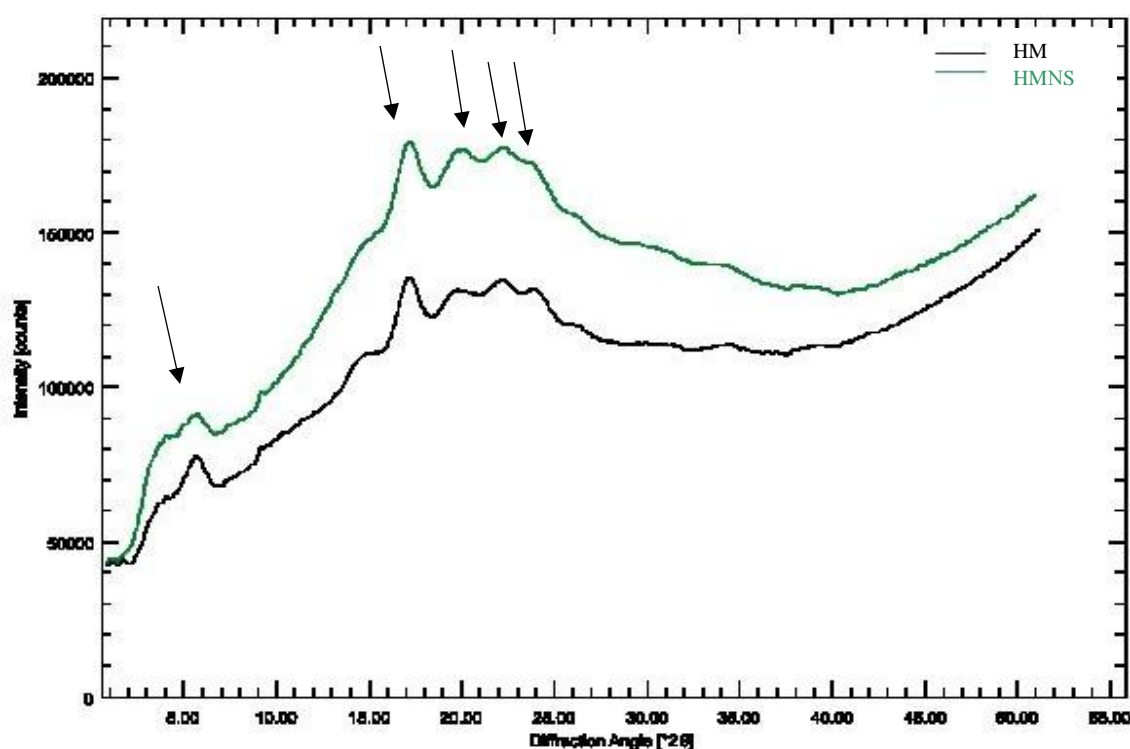
Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται ενδεικτικά ο τρόπος χάραξης της ομαλής σε ένα δείγμα αμύλου, ο οποίος ακολουθήθηκε και στα υπόλοιπα δείγματα.



**Σχήμα 9.** Διάγραμμα υπολογισμού κρυσταλλικότητας κόκκων αμύλου μέσω της μεθόδου περίθλασης ακτινών.

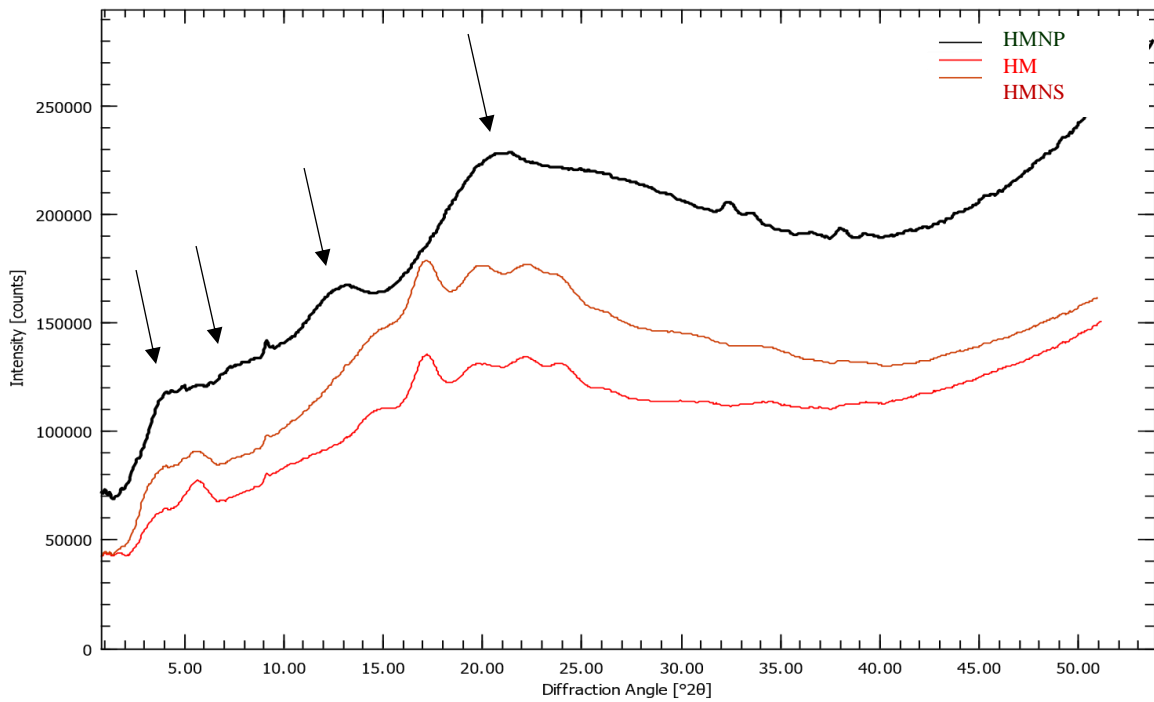
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το ακατέργαστο άλευρο (HM) που χρησιμοποιήθηκε έχει δομή τύπου B. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, στα άμυλα τύπου B εμφανίζεται έντονη χαρακτηριστική κορυφή περίθλασης 2θ στις 17° με μερικές ακόμα μικρότερες κορυφές στις 5,5°, 19° - 20°, 22° και 24° (Kong and Ziegler., 2014, Liu et al., 2009, Chung et al., 2003, Van Soest and Vliegthart., 1997). Τόσο στο αρχικό δείγμα (HM) όσο και στο απομονωμένο δείγμα ανθεκτικού αμύλου (HMNS) παρουσιάζονται χαρακτηριστικές κορυφές περίθλασης 2θ

στις 5,5°, 16° -17°, 20°, 22° και 24° (Σχήμα 10), οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές της δομής τύπου Β.



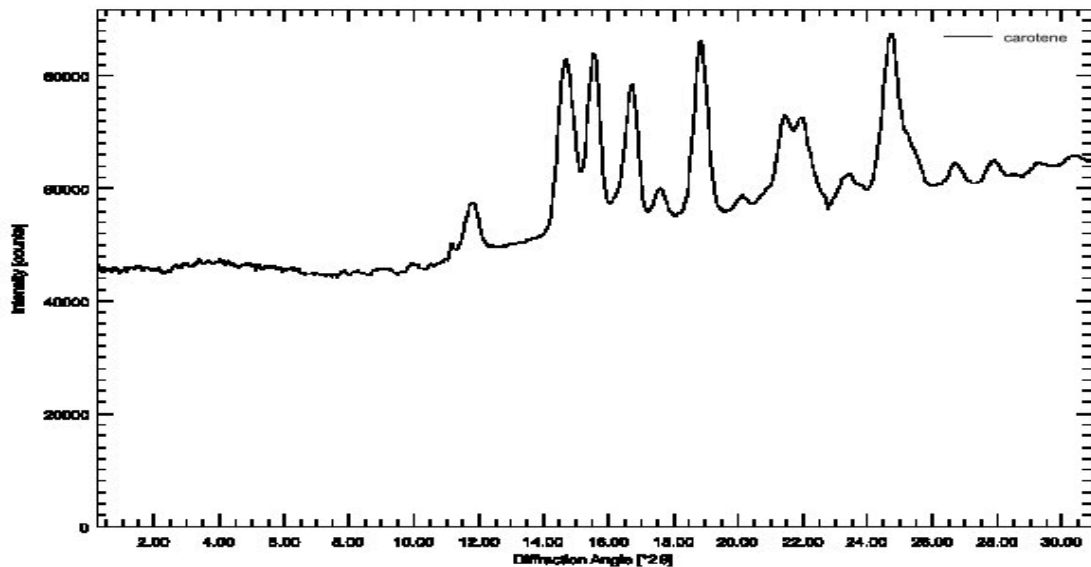
Σχήμα 10. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ για το ακατέργαστο άλευρο (HM) και για το απομονωμένο ανθεκτικό άμυλο (HMNS)

Στο Σχήμα 11 απεικονίζεται το δείγμα αμύλου το οποίο έχει επεξεργαστεί με καυστικό νάτριο (NaOH) (HMNP), συγκριτικά με το ακατέργαστο άλευρο (HM) και το απομονωμένο δείγμα ανθεκτικού αμύλου (HMNS). Στο συγκεκριμένο δείγμα παρατηρείται μετατόπιση κορυφών οι οποίες εμφανίζονται στις 5°, 13° και 20°-21°, με μια μικρότερη λιγότερη έντονη κορυφή να εμφανίζεται στις 7°. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παρουσία V αμυλόζης καθώς οι τιμές αυτές συμφωνούν με εκείνες που καταγράφονται σε άλλες μελέτες (Kong et al., 2018, Kim and Huber, 2016, Kong and Ziegler, 2014) αλλά και την παρουσία δομής τύπου Β. Όπως αναφέρεται και σε παρόμοιες έρευνες, μετά την κατεργασία με καυστικό νάτριο συνυπάρχουν στο άμυλο οι μορφές τύπου Β και V (Kong and Ziegler, 2014). Δηλαδή έχει γίνει μια μετατροπή της δομής τύπου Β σε τύπο V, κάτι το οποίο είναι επιθυμητό ώστε να επιτευχθεί η ενθυλάκωση του β-καροτενίου στο άμυλο.



**Σχήμα 11.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X για το επεξεργασμένο με καυστικό νάτριο άμυλο (HMNP), το ακατέργαστο άλευρο (HM) και το ανθεκτικό άμυλο (HMNS).

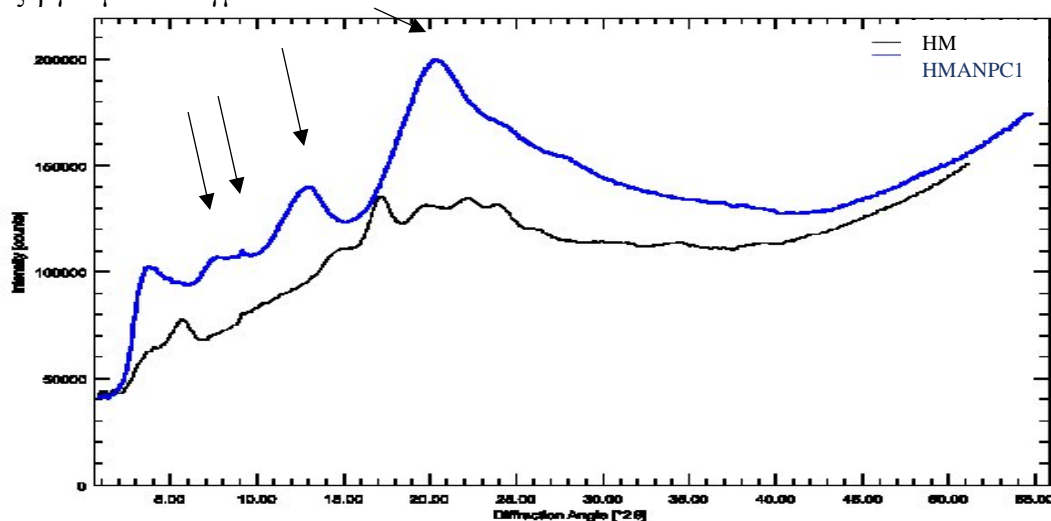
Στο Σχήμα 12 απεικονίζεται το μοτίβο περίθλασης ακτίνων X που υπολογίστηκε για το β-καροτένιο όπου παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές του κορυφές.



**Σχήμα 12.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X για το β-καροτένιο

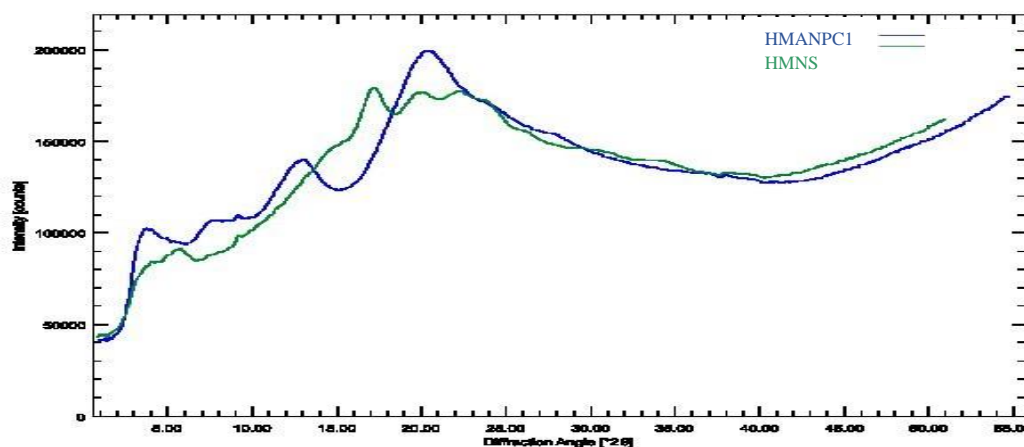
Ενδεικτικά παρατίθεται στο Σχήμα 13 η συγκριτική απεικόνιση μεταξύ του ακατέργαστου αλεύρου HM και του δείγματος HMANPC1, στο οποίο έχει

πραγματοποιηθεί προσθήκη β-καροτενίου και ζήρανση στους 40 °C για 6 ώρες. Όπως φαίνεται, οι χαρακτηριστικές κορυφές του ακατέργαστου δείγματος εμφανίζονται στις 5,5°, 17°, 21° και 24° και υποδεικνύουν την ύπαρξη μορφής τύπου Β. Αντίθετα στο δείγμα HMANPC1 οι χαρακτηριστικές έντονες κορυφές καταγράφονται στις 13°, 21° ενώ μικρότερες κορυφές εντοπίζονται περίπου στις 5° και 7°. Οι συγκεκριμένες κορυφές υποδεικνύουν την παρουσία της μορφής τύπου V και Β. Επιπλέον, οι χαρακτηριστικές κορυφές του δείγματος HMANPC1 εμφανίζονται πιο έντονες συγκριτικά με εκείνες του ακατέργαστου δείγματος, κάτι που υποδηλώνει την αύξηση της κρυσταλλικότητας στο επεξεργασμένο δείγμα.



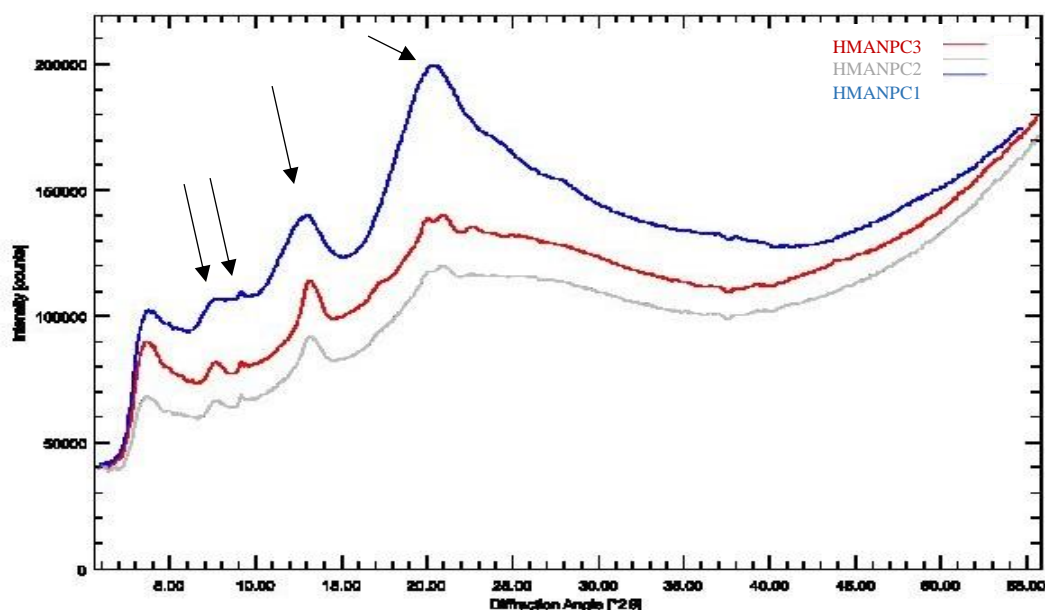
**Σχήμα 13.** Διάγραμμα περίθλασης ακτινών X για τα δείγματα ακατέργαστου αλεύρου HM και του επεξεργασμένου δείγματος HMANPC1.

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στο Σχήμα 14 όπου παρουσιάζονται τα περιθλασιγράμματα του ανθεκτικού αμύλου (HMNS) και του δείγματος HMANPC1.



**Σχήμα 14.** Διάγραμμα περίθλασης ακτινών X για τα δείγματα HMANPC1 και του απομονωμένου ανθεκτικού αμύλου HMNS.

Τα μοτίβα περίθλασης ακτινών X για τα σύμπλοκα αμύλου-β-καροτενίου, τα οποία προέκυψαν από τα δείγματα HMANPC1, HMANPC2 και HMANPC3, αντίστοιχα, απεικονίζονται στο Σχήμα 15. Σε όλα τα δείγματα παρατηρούνται έντονες κορυφές περίθλασης 2θ στις 12°-13° και 20°-21°, όπως και λιγότερο έντονες κορυφές στις 5° και 7°, οι οποίες υποδεικνύουν την ύπαρξη κρυσταλλικότητας που οφείλεται στην παρουσία αμυλόζης τύπου V αλλά και τύπου B. Μια ακόμα κορυφή εντοπίζεται στις 2°. Πιο έντονες κορυφές παρατηρούνται στο δείγμα HMANPC1, κάτι που αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη μεγαλύτερης κρυσταλλικότητας στο συγκεκριμένο δείγμα συγκριτικά με τα δείγματα HMANPC2, HMANPC3. Επιπλέον, συγκρίνοντας το Σχήμα 15 με το Σχήμα 12, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το β-καροτένιο δεν κρυσταλλοποιείται σε ξεχωριστή φάση η οποία να μπορεί να διακριθεί μέσω της εφαρμογής περίθλασης ακτινών αλλά συνδέεται με τις δομές του αμύλου, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με την μελέτη των Kong et al., (2018).



Σχήμα 15. Διάγραμμα περίθλασης ακτινών X για τα δείγματα HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της σχετικής κρυσταλλικότητας των δειγμάτων ύστερα από την επεξεργασία τους. Η τιμή της κρυσταλλικότητας του ακατέργαστου αλεύρου (HM) εμφανίζει ένα εύρος από 10,4% έως 17%, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τρόπο χάραξης της καμπύλης στο γράφημα. Ο μέσος όρος της σχετικής κρυσταλλικότητας του δείγματος υπολογίστηκε 13,7%. Η τιμή αυτή φαίνεται να πλησιάζει με εκείνη που αναφέρει ο Zobel (1988) η οποία για το άμυλο καλαμποκιού κυμαίνεται από 15% - 22% και εξαρτάται από το ποσοστό της αμυλόζης, με τις τιμές της να είναι μεταξύ 55% - 75%. Το απομονωμένο ανθεκτικό άμυλο (HMNS) εμφανίζει



ποσοστό 19,9% ενώ το επεξεργασμένο με καυστικό νάτριο δείγμα (HMNP) εμφανίζει 25%.

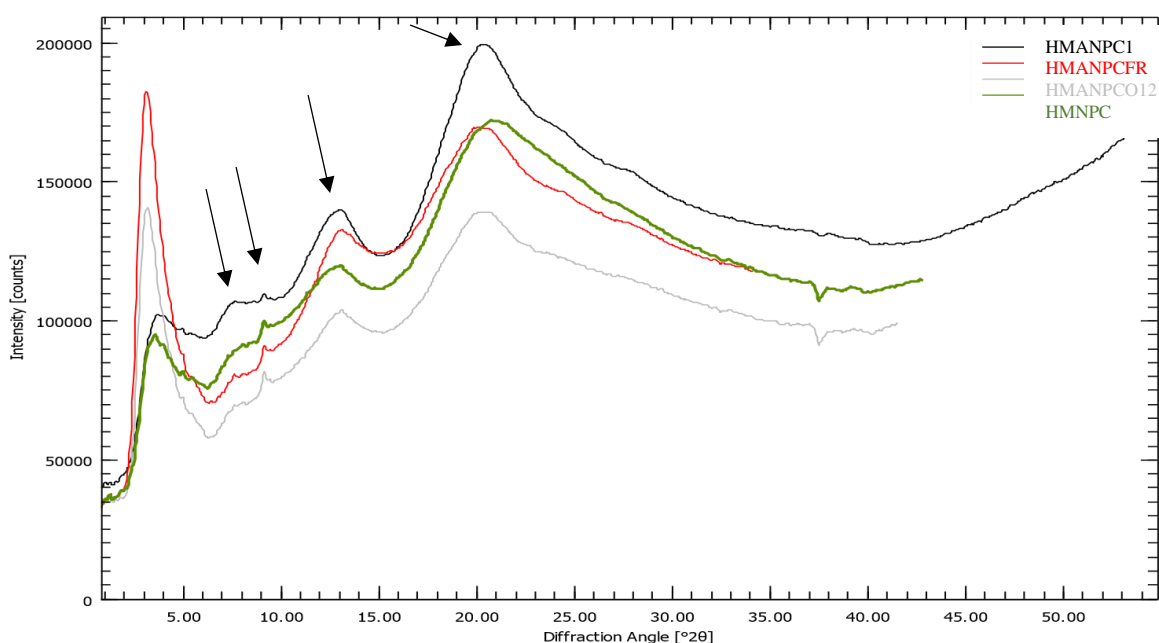
Όσον αφορά τα δείγματα HMANPC1, HMANPC2, HMANPC3 σύμφωνα με τους υπολογισμούς η μεγαλύτερη κρυσταλλικότητα παρατηρείται στο δείγμα HMANPC2 με το ποσοστό να φτάνει στο 32,5%. Σύμφωνα με το Σχήμα 15 η μεγαλύτερη κρυσταλλικότητα αναμενόταν να εμφανίζεται στο δείγμα HMANPC1 ωστόσο οι τιμές των δειγμάτων ενδέχεται να οφείλονται στον τρόπο χάραξης της καμπύλης μέσω του λογισμικού DIFFRAC. EVA. Τα τρία δείγματα, σύμφωνα με τον Πίνακα 5, εμφανίζουν παρόμοια κρυσταλλικότητα η οποία κυμαίνεται μεταξύ 27,4% - 32,5% με μικρές διαφοροποιήσεις στην τιμή. Η αύξηση που καταγράφεται στα επεξεργασμένα δείγματα, συγκριτικά με το ακατέργαστο δείγμα οφείλεται στη μετατροπή της δομής τύπου B σε δομή τύπου V. Επιπλέον η αύξηση της κρυσταλλικότητας των δειγμάτων ενδεχομένως να αποτελεί ένδειξη εγκλεισμού του β-καροτενίου, το οποίο είναι ένα κρυσταλλικό μόριο στην ελεύθερη μορφή του (Kong et al., McClements et al., 2007). Η επιτυχία του εγκλεισμού θα εξεταστεί στη συνέχεια μέσω της εφαρμογής άλλων τεχνικών.

**Πίνακας 5.** Μετρήσεις της κρυσταλλικότητας των δειγμάτων.

<b>Δείγματα</b>	<b>Εκτίμηση κρυσταλλικότητας (%)</b>
HM	13,7
HMNS	19,9
HMNP	25,0
HMANPC1	29,4
HMANPC2	32,5
HMANPC3	27,4

Ακολούθησε η διαγραμματική απεικόνιση του δείγματος HMANPC1 και των διαφόρων τροποποιήσεών του, δηλαδή των δειγμάτων HMANPCFR, HMANPCO<sub>12</sub> όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση με λυοφιλίωση και ξήρανση στους 40 °C για 6 ώρες, αντίστοιχα, και του δείγματος HMNPC, στο οποίο παραλήφθηκε η διαδικασία της ισχυροποίησης (annealing) (Σχήμα 16). Οι χαρακτηριστικές κορυφές είναι παρόμοιες και στα τέσσερα δείγματα και εντοπίζονται στις 12°-13°, 20°-21°. Κάποιες λιγότερο έντονες κορυφές παρατηρούνται στις 5° και 7°. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι σε όλα τα δείγματα συνυπάρχουν οι δομές B και V. Εντονότερη φαίνεται να είναι η κορυφή του δείγματος

HMANPC1, κάτι που υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο δείγμα πιθανώς να εμφανίζει την υψηλότερη κρυσταλλικότητα.



**Σχήμα 16.** Διάγραμμα περίθλασης ακτινών X για τα δείγματα HMANPC1, HMANPCFR, HMANPCO<sub>12</sub>, HMNPC.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής κρυσταλλικότητας για το δείγμα HMANPC1 και τις τροποποιήσεις του.

**Πίνακας 6.** Μετρήσεις της κρυσταλλικότητας ανά δείγμα.

Δείγματα	Εκτίμηση κρυσταλλικότητας (%)
HMANPC1	29,4%
HMANPCR	24,5%
HMANPCFR	28%
HMANPCO <sub>12</sub>	31%
HMNPC	30%

HM: High Amylose Maize Starch

A: Annealing

NP: Nano-Precipitated Starch

C: β-Carotene

FR: Freeze Drying

O<sub>12</sub>: Ξήρανση στους 40 °C για 12 ώρες

Η τιμή της κρυσταλλικότητας κυμαίνεται από 24,5%-31%, με τη μικρότερη τιμή να εμφανίζεται στο επαναληπτικό δείγμα HMANPCR η οποία είναι 24,5%. Στα υπόλοιπα

δείγματα παρατηρούνται μικρές διαφοροποιήσεις στις τιμές. Η μεγαλύτερη τιμή που εμφανίζεται στο δείγμα HMANPCO<sub>12</sub> ενδεχομένως να οφείλεται στην παραμονή του δείγματος στο φούρνο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (12 ώρες). Σύμφωνα με τους Yan et al (2017) όλοι οι τρόποι ξήρανσης είχαν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση V τύπου κρυσταλλικότητας, αλλά το ποσοστό της επηρεάστηκε από τις συνθήκες ξήρανσης. Επίσης αναφέρεται ότι η ξήρανση με λυοφιλίωση έδειξε να περιορίζει τον σχηματισμό μιας διατεταγμένης κρυσταλλικής δομής ενώ η ξήρανση στους 40°C για 6 ώρες παρουσίασε την υψηλότερη κρυσταλλικότητα με ποσοστό 32,64%.

Η κρυσταλλικότητα που εμφανίζεται είναι επιθυμητή καθώς η υψηλότερη κρυσταλλικότητα διευκολύνει τη συμπλοκοποίηση ενδεχομένως εξαιτίας των πιο τακτικά διατεταγμένων ελικοειδών κοιλοτήτων που βρίσκονται σε μεγαλύτερη κρυσταλλική περιοχή. Επιπλέον η εμφάνιση κρυσταλλικότητας επηρεάζει τον επιτυχή εγκλωβισμό του β-καροτενίου, καθώς περιορίζονται οι θέσεις που παραμένουν ελεύθερες στο μόριο μετά την διαδικασία της ενσωμάτωσης και αποφεύγεται η πιθανότητα σύνδεσης με άλλα μόρια και απώλειας του β-καροτενίου.

### 3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)

Μέσω της χρήσης του λογισμικού OMNIC 9.1.24 δημιουργήθηκε μια βιβλιοθήκη στην οποία εισήχθησαν τα FTIR φάσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

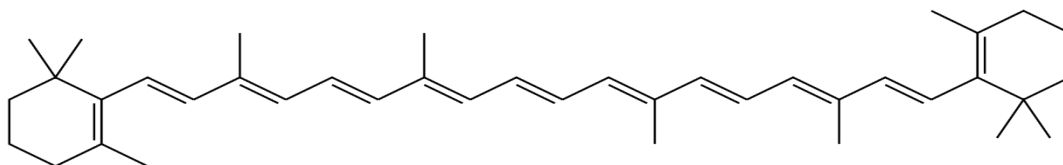
**Πίνακας 7.** FTIR φάσματα της βιβλιοθήκης.

Δείγμα	Περιγραφή δείγματος
1	Άμυλο (HMNS)
2	Δείγμα 1 επεξεργασμένο με NaOH, χωρίς θέρμανση (HMNP)
3	Μίγμα Δείγματος 2 με β-καροτένιο
4	Δείγμα 2, θέρμανση στους 70°C και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου
5	Μίγμα Δείγματος 4 με β-καροτένιο
6	Δείγμα 2, προσθήκη β-καροτενίου και ξήρανση στους 40°C για 6h (HMNPC)
7	Δείγμα 4, προσθήκη β-καροτενίου και ξήρανση στους 40°C για 6h (HMANPC1)
8	Δείγμα 4, προσθήκη β-καροτενίου και ξήρανση με λυοφιλίωση (HMANPCFR)
9	Δείγμα 4, προσθήκη β-καροτενίου και ξήρανση στους 40°C για 12h (HMANPCO <sub>12</sub> )
10	β-καροτένιο

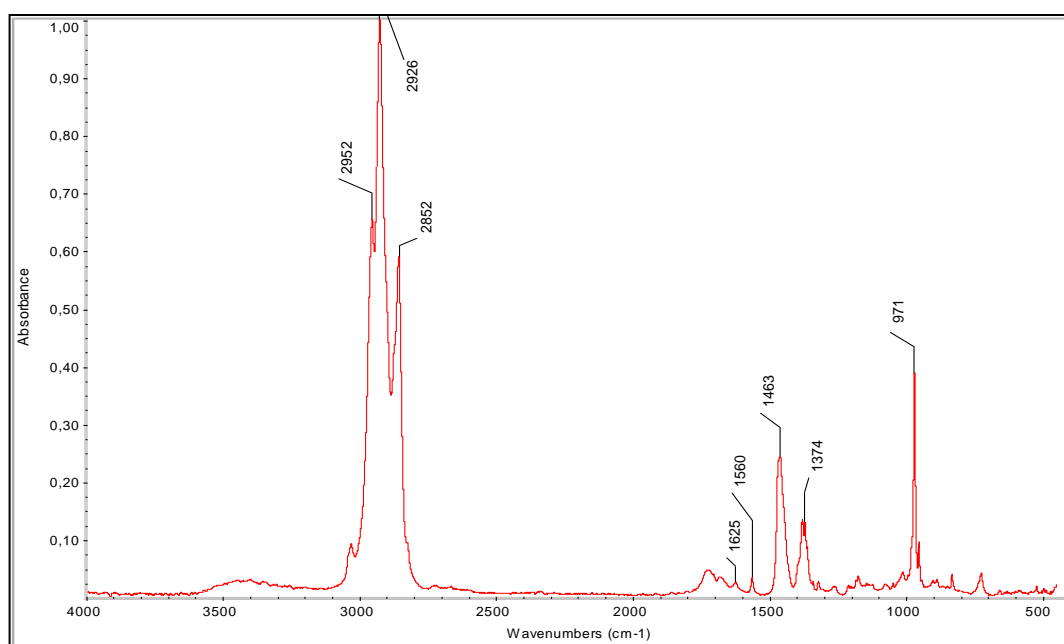
Ακολούθως, επιλέχθηκε η βιβλιοθήκη η οποία δημιουργήθηκε και προσδιορίστηκε ο βαθμός ομοιότητας κάθε φάσματος με τα φάσματα της βιβλιοθήκης. Σαν περιοχή

σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε η φασματική περιοχή  $1800-820\text{ cm}^{-1}$ , η οποία περιέχει την περιοχή των «δακτυλικών αποτυπωμάτων» των δειγμάτων, δηλαδή πρόκειται για μια περιοχή η οποία περιέχει τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις του εκάστοτε δείγματος. Κατά τον προσδιορισμό της ομοιότητας των φασμάτων, δε λήφθηκε υπόψη ο βαθμός ομοιότητας κάθε δείγματος με «τον εαυτό του».

Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται η χημική δομή του β-καροτενίου και στο Σχήμα 17 το FTIR φάσμα του.



**Εικόνα 18.** Χημική δομή β-καροτενίου



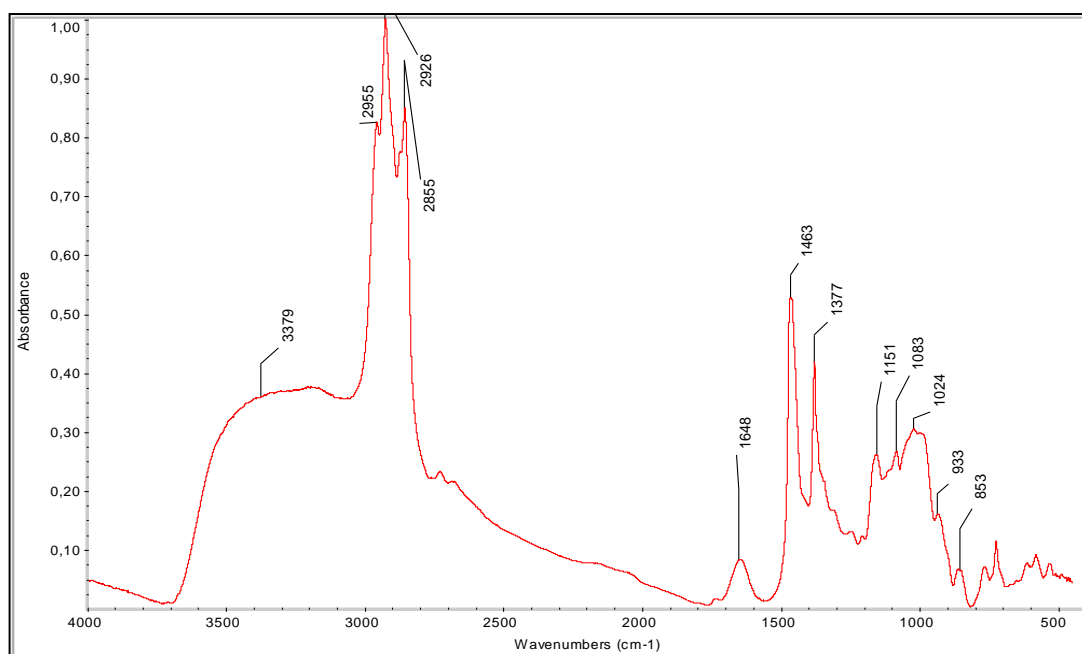
**Σχήμα 17.** FTIR φάσμα β-καροτενίου (Δείγμα 10).

Στο FTIR φάσμα του β-καροτενίου παρατηρούνται οκτώ κύριες κορυφές, η ερμηνεία των οποίων παρατίθεται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8.** Αποδόσεις κορυφών FTIR φάσματος του β-καροτενίου (Socrates G, 2001).

Κυματαριθμός (cm <sup>-1</sup> )	Λειτουργική Ομάδα	Απόδοση
2952, 2926, 2852	C-H	Δόνηση τάσης
1625, 1560, 1463	C=C	Δόνηση τάσης
1374	>C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Δόνηση κάμψης
971	Trans =C-H	Δόνηση τάσης

Στο Σχήμα 18 απεικονίζεται το φάσμα FTIR του ανθεκτικού αμύλου (HMNS), ενώ στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των κυριότερων κορυφών του.



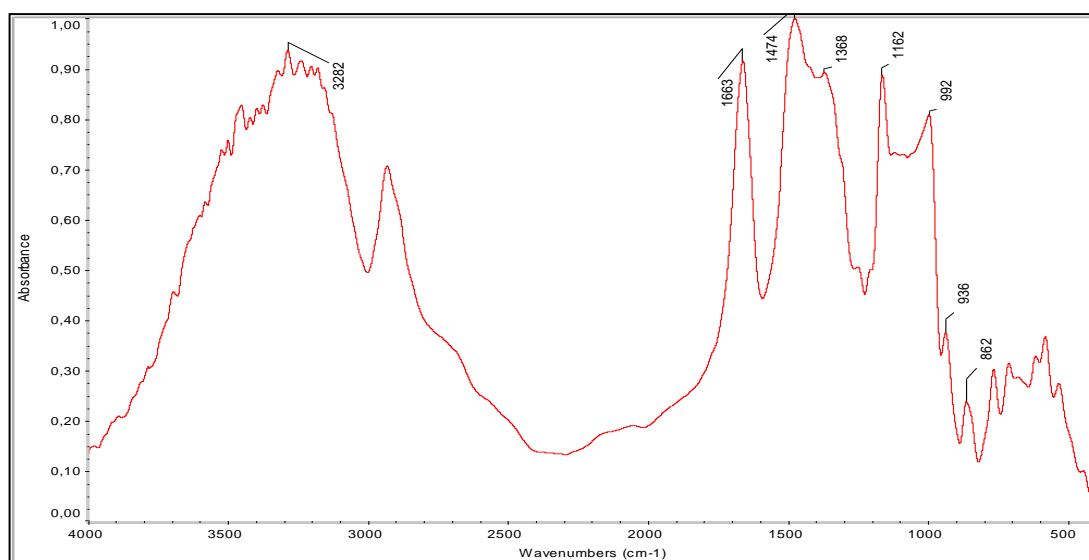
**Σχήμα 18.** FTIR φάσμα του ανθεκτικού αμύλου (Δείγμα 1)

**Πίνακας 9.** Αποδόσεις κορυφών FTIR φάσματος του αμύλου (Ma et al., 2018, Socrates G, 2001, Kacurakova and Mathlouthi, 1996).

Κυμαριθμός (cm <sup>-1</sup> )	Λειτουργική ομάδα	Απόδοση
3379	O-H	Δόνηση τάσης
2955, 2926, 2855	C-H	Δόνηση τάσης
1648	H-O-H	Δόνηση κάμψης του υπάρχοντος H <sub>2</sub> O.
1463	-CH <sub>2</sub> -	Δόνηση κάμψης
1377	-OH, >CH- 1.C-O-C	Δόνηση κάμψης 1. Δόνηση τάσης
1151	2.C-C	(γλυκοζιδικός δεσμός) 2. Δόνηση κάμψης
1083	1. C-O 2. C-C 3. COH	1. Δόνηση τάσης 2. Δόνηση κάμψης 3. Δόνηση κάμψης
1024	C-O	Δόνηση κάμψης του α-γλυκοζιδικού δεσμού
933	C-O και C-C	Δόνηση τάσης
853	C-H	Δόνηση τάσης

Γίνεται αντιληπτό ότι οι κορυφές του β-καροτενίου επικαλύπτονται από τις πλέον ευρείες κορυφές του αμύλου.

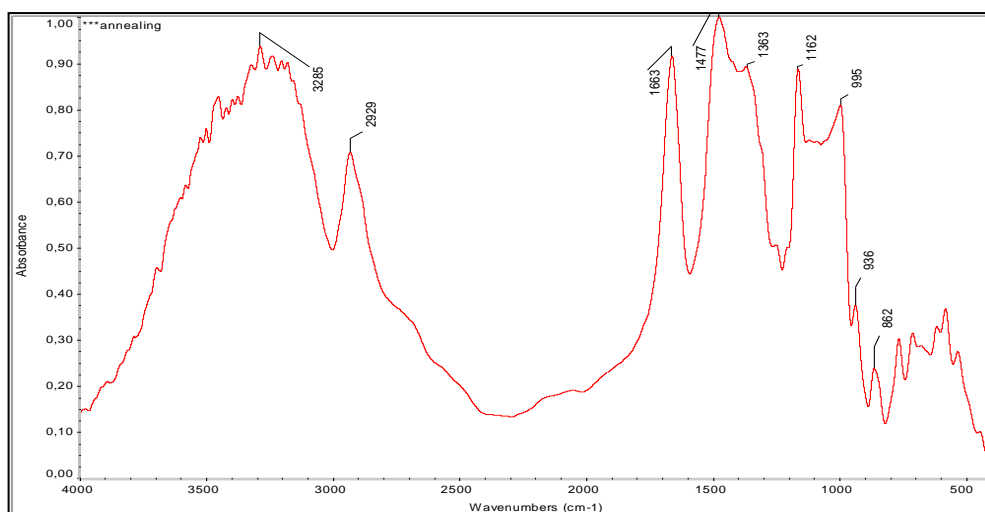
Το FTIR φάσμα του ανθεκτικού αμύλου μετά την επεξεργασία του με καυστικό νάτριο (NaOH) και πριν την εφαρμογή θέρμανσης, παρουσιάζεται στο Σχήμα 19.



**Σχήμα 19.** FTIR φάσμα του αμύλου μετά από κατεργασία με NaOH (Δείγμα 2).

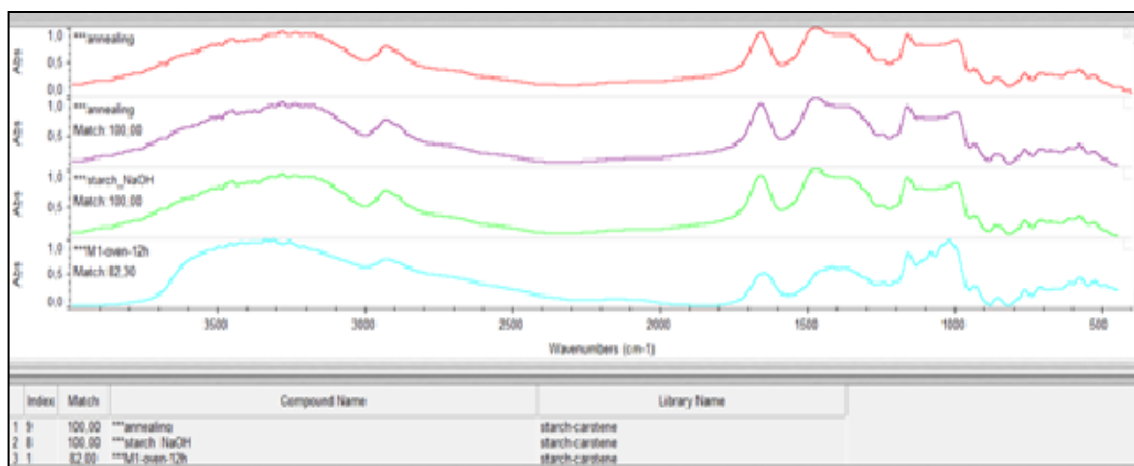
Οι κυριότερες κορυφές του συγκεκριμένου δείγματος εμφανίζονται στα 3382, 2850, 1663, 1474, 1368, 1162, 992, 936 και 862  $\text{cm}^{-1}$  και αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές του αμύλου, οι οποίες παρουσιάζουν μια μετατόπιση συγκριτικά με τις τιμές που καταγράφονται στον Πίνακα 9. Η υφή του φάσματος είναι αρκετά διαφορετική από αυτή του ανθεκτικού αμύλου. Κάτι τέτοιο ενδεχομένως να οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα του δείγματος σε νερό (περιοχή γύρω στα 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) γεγονός που αλλοιώνει σημαντικά την υφή του φάσματος, καθώς το νερό απορροφά επιπλέον και στις περιοχές 3800 – 3000, 1400-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Στο Σχήμα 20 παρουσιάζεται το FTIR φάσμα του αμύλου μετά από θέρμανση στους 70  $^{\circ}\text{C}$ .



**Σχήμα 20.** FTIR φάσμα του κατεργασμένου με NaOH αμύλου και θέρμανση στους 70  $^{\circ}\text{C}$  (Δείγμα 4).

Οι πλέον χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3285, 2929, 1663, 1477, 1363, 1162, 995, 936 και 862  $\text{cm}^{-1}$ . Οι ίδιες κορυφές παρατηρούνται και στο Δείγμα 2, ιδιαίτερα στην περιοχή 1800-820  $\text{cm}^{-1}$ . Πραγματοποιείται σύγκριση του φάσματος του Δείγματος 4, με τα φάσματα της βιβλιοθήκης (Σχήμα 21).



**Σχήμα 21.** Σύγκριση του φάσματος FTIR του Δείγματος 4 με τα φάσματα της βιβλιοθήκης.

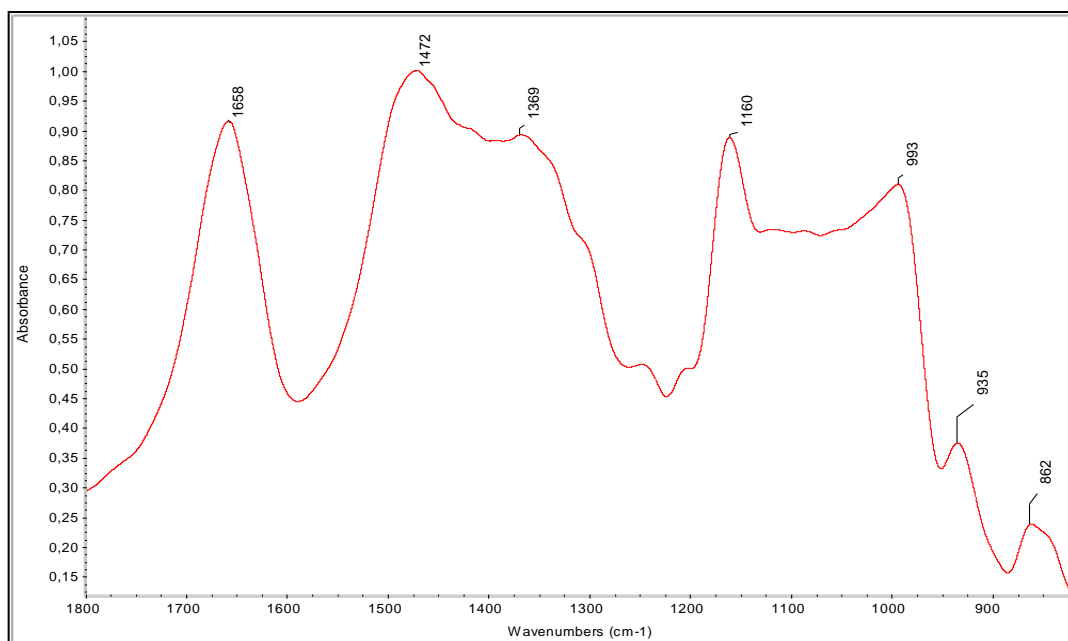
Πράγματι η ομοιότητα του Δείγματος 4 με το Δείγμα 2 είναι 100%, επομένως διαπιστώνεται ότι η δομή του αμύλου δεν αλλοιώθηκε μετά τη θέρμανση του στους 70°C.

Με σκοπό τη διερεύνηση της ενθυλάκωσης ή μη του β-καροτενίου στο άμυλο μελετήθηκαν φασματοσκοπικά και συγκρίθηκαν τα φάσματα των Δειγμάτων 6,7,8 και 9 με τα εκείνα της βιβλιοθήκης.

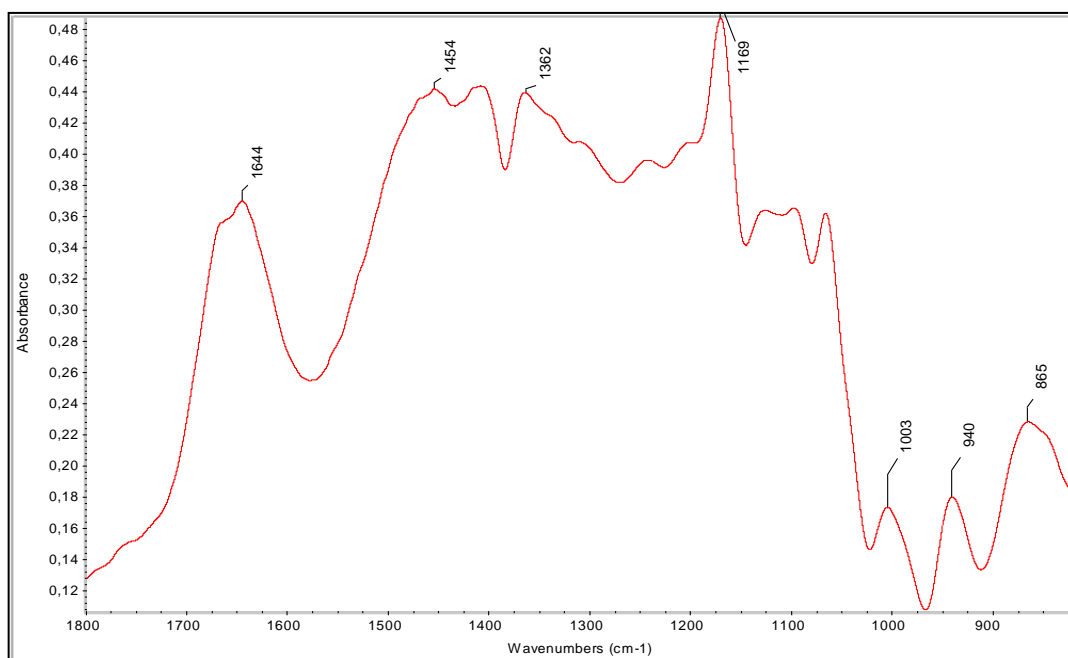
Η πλέον ενδιαφέρουσα φασματική περιοχή εντοπίζεται στα 1800-820 cm<sup>-1</sup>, διότι περιέχει λειτουργικές ομάδες (1800-1500 cm<sup>-1</sup>) και την περιοχή των «δακτυλικών αποτυπωμάτων» (1500-820 cm<sup>-1</sup>). Η περιοχή (4000-1800 cm<sup>-1</sup>) περιέχει μεν την ομάδα του υδροξυλίου (-OH) αλλά η κορυφή είναι ευρεία και συνεπώς θα έδινε «ψευδώς» υψηλό συντελεστή ομοιότητας.

Στα Σχήματα 22-25 παρουσιάζονται τα FTIR φάσματα των Δειγμάτων 6-9 για την φασματική περιοχή 1800-820 cm<sup>-1</sup> ενώ στον Πίνακα 10 αναγράφονται οι κυριότερες κορυφές των φασμάτων.

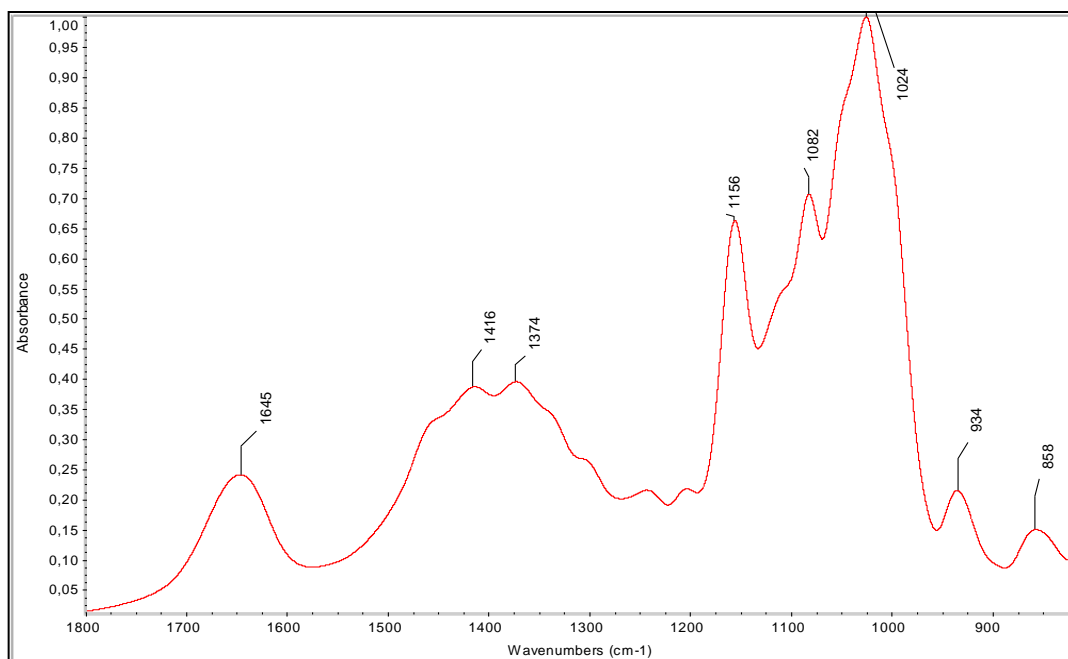




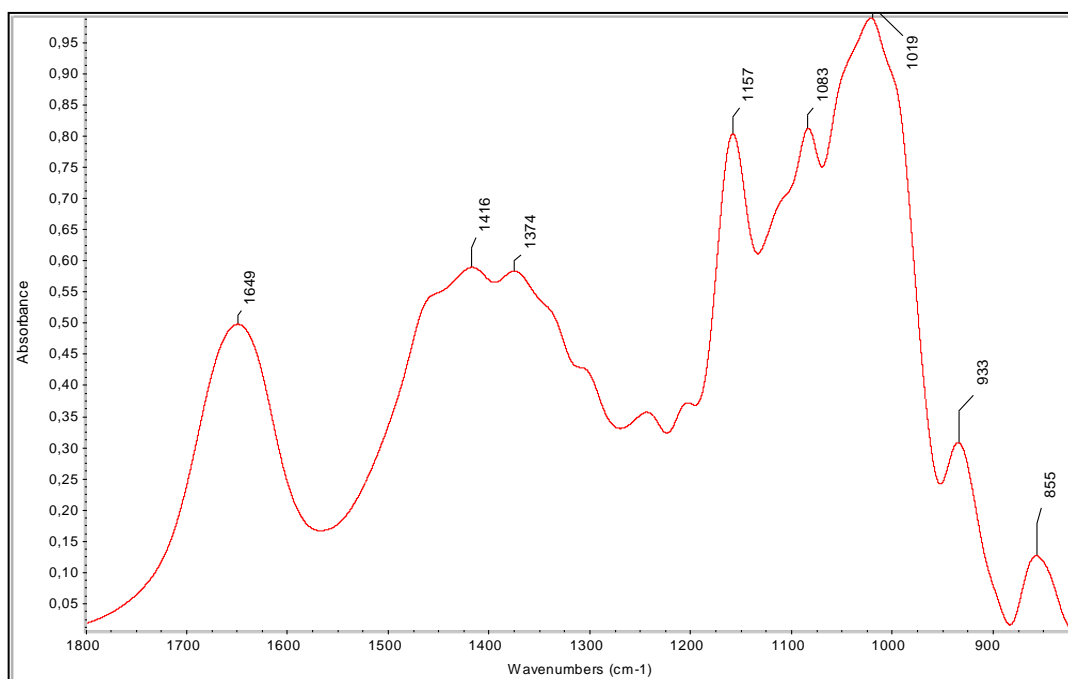
**Σχήμα 22.** FTIR φάσμα του Δείγματος 6 (1800 – 820 cm<sup>-1</sup>).



**Σχήμα 23.** FTIR φάσμα του Δείγματος 7 (1800 – 820 cm<sup>-1</sup>).



**Σχήμα 24.** FTIR φάσμα του Δείγματος 8 (1800 – 820  $\text{cm}^{-1}$ ).



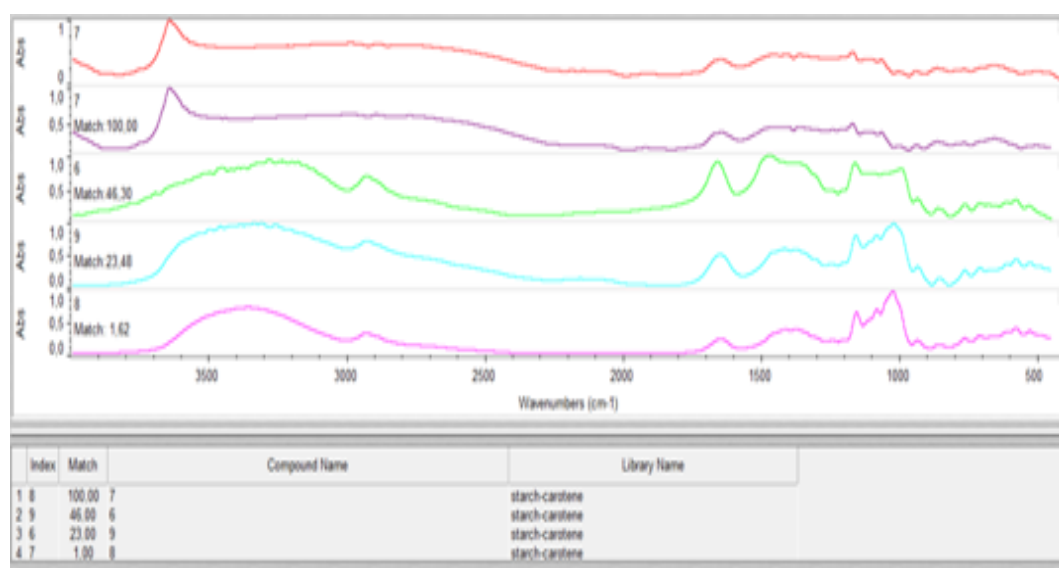
**Σχήμα 25.** FTIR φάσμα του Δείγματος 9 (1800 – 820  $\text{cm}^{-1}$ ).

**Πίνακας 10.** Χαρακτηριστικές κορυφές των Δειγμάτων 6-9.

Αριθμός δείγματος	Κυματριθμοί κυριότερων κορυφών ( $\text{cm}^{-1}$ )
6	1658, 1472, 1369, 1160, 993, 935, 802
7	1644, 1454, 1362, 1169, 1003, 940, 865
8	1645, 1416, 1374, 1156, 1082, 1024, 934, 858
9	1649, 1416, 1374, 1157, 1083, 1019, 933, 855

Παρατηρούμε ότι η υφή των φασμάτων διαφοροποιείται αισθητά τόσο μεταξύ τους όσο και με την υφή του αμύλου. Οι καταγραφόμενες κορυφές αντιστοιχούν στις κορυφές του αμύλου με μετατοπίσεις. Η διαφοροποίηση των φασμάτων των δειγμάτων σε σχέση με το φάσμα του αμύλου είναι ένδειξη ενθυλάκωσης του β-καροτενίου στο άμυλο.

Ακολούθως, πραγματοποιείται σύγκριση του Δείγματος 7 με τα Δείγματα 6, 8 και 9 και καταγράφεται συντελεστής ομοιότητας 46, 1 και 23%, αντίστοιχα (Σχήμα 25). Οι συντελεστές ομοιότητας κρίνονται πολύ μικροί και επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι διαφορετικές διεργασίες που εφαρμόστηκαν δεν οδηγούν στα ίδια αποτελέσματα.



**Σχήμα 25.** Σύγκριση του FTIR φάσματος του Δείγματος 7 με τα φάσματα των Δειγμάτων 6,8 και 9.

Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η διάρκεια ξήρανσης η οποία είναι 6 ή 12h, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς το ποσοστό ομοιότητας των δειγμάτων είναι μόνο 23%. Ακόμη μεγαλύτερη επίδραση φαίνεται να έχει ο τρόπος ξήρανσης καθώς το ξηραμένο στο φούρνο για 6 ώρες δείγμα (Δείγμα 7), εμφανίζει ποσοστό ομοιότητας μόνο 1% με το λυοφιλωμένο δείγμα. Το δείγμα στο οποίο δεν εφαρμόστηκε η διαδικασία annealing εμφάνισε 46% ομοιότητα με το δείγμα που θερμάνθηκε στους 70 °C για 10 λεπτά και ακολούθως ξηράθηκε στους 40 °C για 6 ώρες.

Από τη φασματοσκοπική ανάλυση συμπεραίνεται λοιπόν, ότι είναι πολύ πιθανή η ενθυλάκωση του β-καροτενίου στο άμυλο, σε κάθε περίπτωση, αλλά με διαφορετικό τρόπο κάθε φορά. Επιπλέον, η θέρμανση καθώς και το χρονικό διάστημα για το οποίο διαρκεί η ξήρανση επηρεάζουν σημαντικά την όλη διαδικασία, καθώς τα δείγματα εμφάνισαν διαφορετικά ποσοστά ομοιότητας.

### 3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ

Για την επίτευξη του ποσοτικού προσδιορισμού του β-καροτενίου στα διάφορα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η γραμμική εξίσωση (Εξ.2) που εμφανίζεται στο διάγραμμα της καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 4) απ' όπου προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Ποσοστό ενθυλάκωσης β-καροτενίου ανά δείγμα.

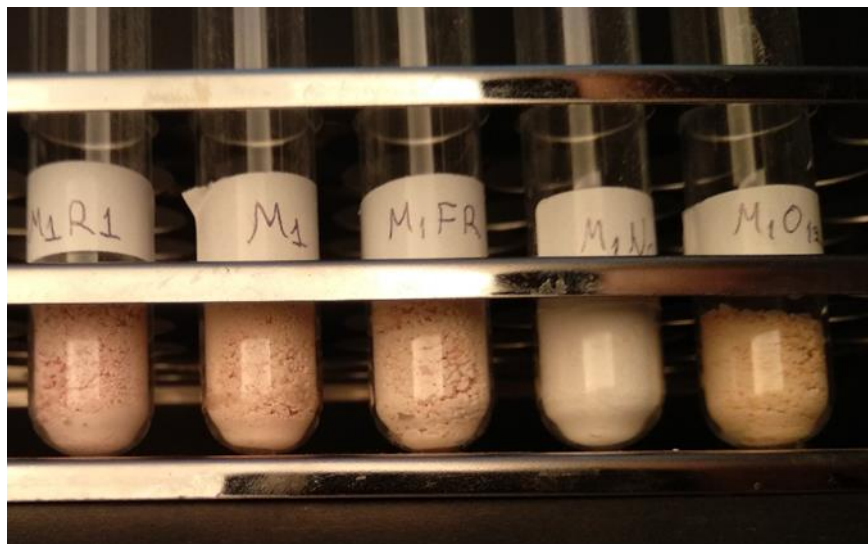
Δείγματα	Χρόνος αποθήκευσης (εβδομάδες)	Απορρόφηση	Ποσοστό ανάκτησης β-καροτενίου (%)
HMANPC1	16	0,0467	21,85
HMANPCR	2-7	0,0668	42,53
HMANPCFR	8	0,0509	24,39
HMANPCO <sub>12</sub>	8	0,0603	30,09
HMNPC	10	0,0480	22,64

Σύμφωνα με τον Πίνακα 11, το ποσοστό ενθυλάκωσης β-καροτενίου στα διάφορα δείγματα αμύλου κυμαίνεται από 21,85 έως 42,53%. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν με εκείνα παρόμοιων μελετών, όπως η έρευνα που πραγματοποίησαν οι Kim and Huber (2016) όπου το ποσοστό ανάκτησης του β-καροτενίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αμύλου και την ποσότητα του β-καροτενίου που προστίθεται και κυμαίνεται περίπου από 25%-60%. Το β-καροτένιο που ανακτάται υπολογίζεται με σχέση με την αρχική ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Στην έρευνα που διεξήγαγαν οι Kong et al., (2018) το ποσοστό ανάκτησης του β-καροτενίου από σύμπλοκα αμυλόζης-παλμιτικού ασκορβυλίου (AscP) μετά από διάστημα 6 εβδομάδων ήταν 26,49% και 10,09% για θερμοκρασία αποθήκευσης 20°C και 30°C αντίστοιχα. Οι Lalush et al. (2005) κατά την μελέτη που πραγματοποίησαν κατέγραψαν ποσοστά λινολεϊκού οξέος περίπου 2%-4%.

Συμπεραίνεται λοιπόν η επιτυχής ενσωμάτωση του β-καροτενίου στα διάφορα δείγματα με αρκετά ικανοποιητικά ποσοστά. Το ποσοστό του β-καροτενίου που δεν ενθυλακώνεται, ενδεχομένως να απομακρύνεται μέσω των συνεχών φυγοκεντρήσεων. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ενθυλάκωσης εμφανίζονται στο επαναληπτικό δείγμα HMANPCR το οποίο είχε το μικρότερο χρόνο αποθήκευσης μέχρι την πραγματοποίηση της μέτρησης, ενώ τα μικρότερα εμφανίζονται στο δείγμα HMANPC1 όπου μετά τη θέρμανση στους 70 °C για 10 λεπτά ακολουθεί στάγδην προσθήκη β-καροτενίου και ξήρανση στους 40 °C για

6 ώρες αλλά και στο δείγμα HMNPC όπου παραλείπεται το στάδιο της θέρμανσης (annealing) (Πίνακας 11). Η διαφορά που καταγράφεται μεταξύ του δείγματος HMANPC1 και του επαναληπτικού δείγματος ενδεχομένως να οφείλεται στο χρονικό διάστημα το οποίο μεσολάβησε από την παρασκευή έως τη μέτρηση του δείγματος, καθώς το HMANPC1 ήταν το πρώτο δείγμα που παρασκευάστηκε. Το μικρό ποσοστό το οποίο εμφανίζεται στο δείγμα HMNPC είναι πιθανό να οφείλεται στην παράλειψη του σταδίου της θέρμανσης στους 70°C, πριν από την προσθήκη του β-καροτενίου. Επιπλέον, οι διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των δειγμάτων ενδεχομένως να οφείλονται στην ανομοιογένεια των δειγμάτων καθώς παρατηρήθηκε ότι οι μεγαλύτεροι κόκκοι αμύλου (συσσωματώματα) εμφάνιζαν μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης β-καροτενίου.

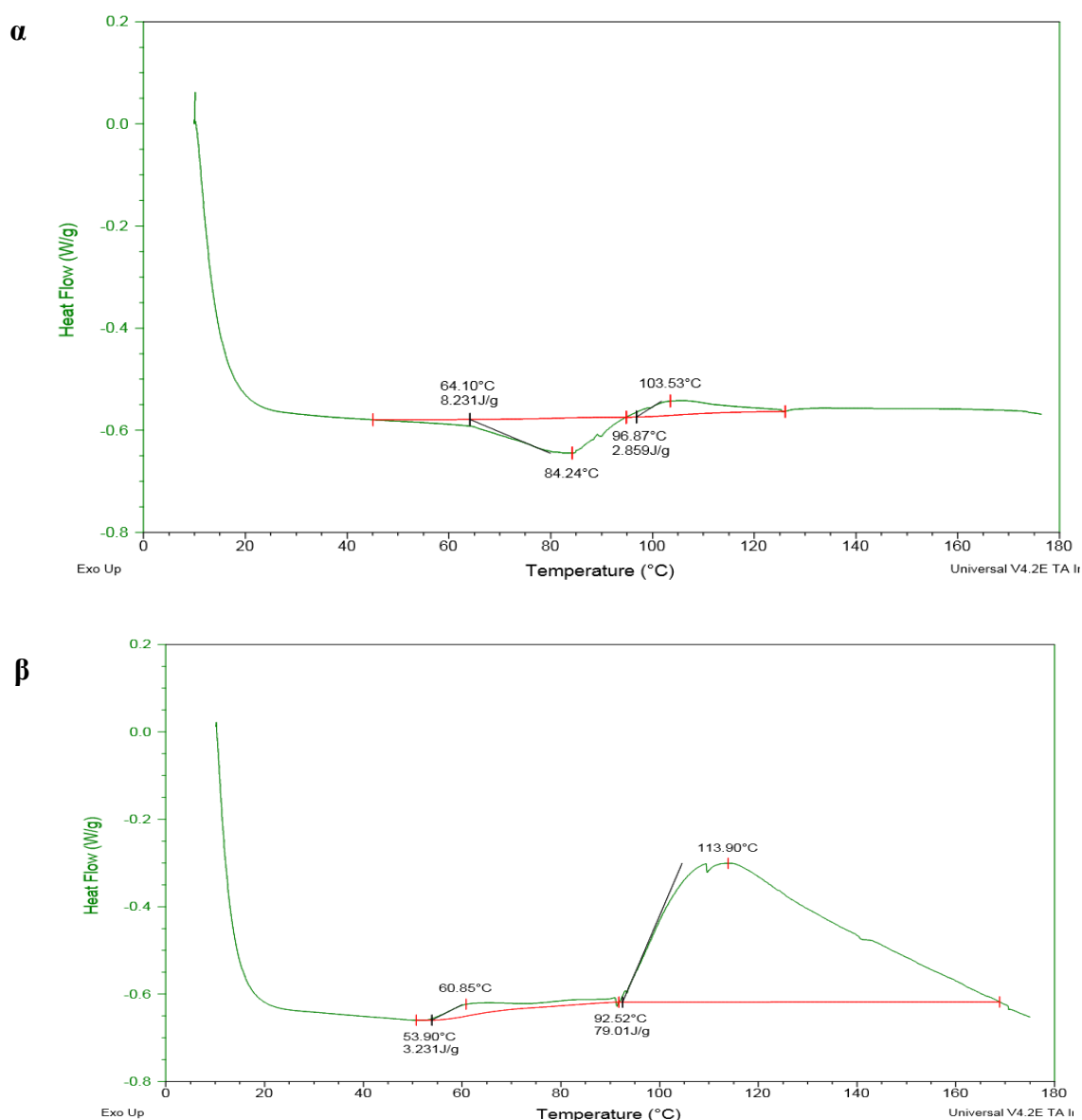
Στη συνέχεια παρουσιάζεται η χρωματική διαφορά που εμφανίζεται μεταξύ των δειγμάτων (Εικόνα 19). Παρατηρείται ότι στο δείγμα που παραλείπεται το στάδιο της θέρμανσης στους 70 °C για 10 λεπτά (annealing), το χρώμα δεν είναι τόσο έντονο όσο στα υπόλοιπα δείγματα. Στο Παράρτημα παρατίθενται ορισμένες εικόνες στις οποίες παρουσιάζεται η διαφορά τόσο του χρώματος όσο και της κοκκομετρίας, η οποία εμφανίζεται μεταξύ των δειγμάτων.



**Εικόνα 19.** Συγκριτική απεικόνιση των δειγμάτων HMANPCR, HMANPC1, HMANPCFR, HMNPC και HMANPCO<sub>12</sub>

### 3.5 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΑΜΥΛΟΥ

Τα θερμιδογράφημα του ακατέργαστου (HMNS) και του επεξεργασμένου με καυστικό νάτριο (NaOH) δείγματος ανθεκτικού αμύλου (HMNP) παρατίθενται στο Σχήμα 26. Επάνω στα διαγράμματα σημειώνονται οι διαφορετικές θερμοκρασίες ( $T_o$ : έναρξης,  $T_p$ : κορυφής και  $T_c$ : τελική) αλλά και η ενθαλπία ζελατινοποίησης ( $\Delta H$ ) που παρατηρούνται κατά την αλλαγή φάσης. Οι θερμοκρασίες αυτές καταγράφονται και στον Πίνακα 12.



Σχήμα 26. (α) Θερμιδογράφημα ακατέργαστου δείγματος ανθεκτικού αμύλου (HMNS) και (β) επεξεργασμένου με καυστικό νάτριο δείγματος ανθεκτικού αμύλου (HMNP).

**Πίνακας 12.** Ιδιότητες θερμικής μετάβασης ακατέργαστου και επεξεργασμένου δείγματος ανθεκτικού αμύλου.

Δείγματα	1 <sup>η</sup> κορυφή			ΔH(J/g)	2 <sup>η</sup> κορυφή			ΔH(J/g)
	Θερμοκρασία θερμικής μετάβασης (°C)				Θερμοκρασία θερμικής μετάβασης(°C)			
	T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>c</sub>		T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>c</sub>	
Ακατέργαστο (HMNS)	64,10	84,24	94,86	8,23	96,87	103,53	126,07	2,86
Επεξεργασμένο (HMNP)	53,90	60,85	91,77	3,23	92,52	113,90	168,88	79,01

Οι αναφορές που υπάρχουν σχετικά με τη θερμοκρασία ζελατινοποίησης δειγμάτων αμύλου τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, είναι περιορισμένες. Σύμφωνα με τους Liu et al., (2006) τα δείγματα τα οποία περιείχαν 50% και 80% αμυλόζη δεν παρουσίαζαν απότομες θερμικές μεταβολές αλλά χαρακτηρίζονταν από μια επιμήκη μορφή η οποία αντιστοιχούσε σε εύρος 65°C έως 115°C. Αυτή η επιμήκης μορφή ανάλογα με το περιεχόμενο νερό, μπορεί να διαχωριστεί σε δύο φάσεις. Πιο συγκεκριμένα όσο μικρότερη είναι η ποσότητα του περιεχόμενου νερού, τόσο πιο διακριτές μεταξύ τους γίνονται οι δύο φάσεις. Η μία από αυτές αντιστοιχεί στη θερμοκρασία ζελατινοποίησης ενώ η άλλη αντιστοιχεί σε μια μεταβατική βάση η οποία προκύπτει από τη δημιουργία ορισμένων συμπλόκων αμυλόζης-λιπιδίων. Η συγκεκριμένη φάση φαίνεται να εξαφανίζεται όταν απομακρύνονται τα λιπίδια από την αμυλόζη. Η θερμοκρασία ζελατινοποίησης εντοπίζεται μεταξύ περίπου 70°C-90°C ενώ η θερμοκρασία της μεταβατικής φάσης βρίσκεται μεταξύ 100°C-110°C. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται από τους Chung and Liu (2009), οι οποίοι στη μελέτη τους αναφέρουν το θερμιδογράφημα του αμύλου αραβοσίτου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη εμφάνισε διπλές κορυφές. Η χαμηλή θερμοκρασία (60-80 °C) αντιστοιχούσε στη θερμοκρασία ζελατινοποίησης ενώ η υψηλή (90-110 °C) αντιστοιχούσε στην τήξη του συμπλόκου αμυλόζης-λιπιδίων.

Η παρουσία δύο κορυφών καταγράφεται και στις μελέτες των Kim and Huber (2016), Jovanovich and Añón (1999), Raphaelides and Karkalas (1988), Biliaderis et al., (1985). Σύμφωνα με τους Jovanovich and Añón (1999) η ύπαρξη του συμπλόκου αμυλόζης-λιπιδίου επιβεβαιώνεται με την παρουσία ενδόθερμης μεταβολής σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία ζελατινοποίησης (95°C-135°C). Ο σχηματισμός του συγκεκριμένου συμπλόκου θεωρείται θερμοαναστρέψιμος, κάτι που αποδεικνύεται από την εμφάνιση εξόθερμων κορυφών στις καμπύλες ψύξης της DSC. Τα σύμπλοκα

αμυλόζης-λιπιδίων καθιζάνουν ως πολυκρυσταλλικές σκόνες και διασκορπίζονται μεταξύ των άμορφων περιοχών.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τόσο στο Σχήμα 26 όσο και στον Πίνακα 12 παρατηρείται η ύπαρξη δύο κορυφών. Επιπλέον οι τιμές αυτές περιέχονται εντός των ορίων που αναφέρονται στην μελέτη των Liu et al., (2006) αλλά και των Chung and Liu (2009), καθώς στο ακατέργαστο δείγμα (HMNS) η τιμή ζελατινοποίησης είναι 84,24°C και η τιμή της μεταβατικής φάσης είναι 103,53°C. Η θερμοκρασία ζελατινοποίησης η οποία αναφέρεται στη μελέτη των Qin et al (2016) είναι περίπου 74 °C για άμυλο καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη.

Στο επεξεργασμένο με καυστικό νάτριο (HMNP) δείγμα η 1<sup>η</sup> κορυφή καταγράφεται στους 60,85°C και η τιμή της δεύτερης κορυφής είναι 113,90°C. Όσον αφορά τη σύγκριση των τιμών μεταξύ των δύο δειγμάτων το επεξεργασμένο δείγμα (HMNP) εμφανίζει χαμηλότερες τιμές στη θερμοκρασία ζελατινοποίησης (Πίνακας 12), υποδεικνύοντας ότι τα νανοσωματίδια ζελατινοποιούνται πιο εύκολα από το ακατέργαστο άμυλο (HMNS). Επιπλέον, η ενθαλπία ζελατινοποίησης των νανοσωματιδίων (3,23 J/g) ήταν αρκετά χαμηλότερη από εκείνη του ανθεκτικού αμύλου (8,23 J/g). Σύμφωνα με τους Qin et al (2016) κάτι τέτοιο συμβαίνει καθώς η δομή της μονής έλικας που εμφανίζεται στα νανοσωματίδια καταστρέφεται ευκολότερα από τη δομή διπλής έλικας του ανθεκτικού αμύλου, οδηγώντας έτσι σε χαμηλότερη ενθαλπία ζελατινοποίησης. Η μείωση στη θερμοκρασία ζελατινοποίησης που παρατηρείται στο δείγμα HMNP ενδεχομένως να οφείλεται στην εφαρμογή της μεθόδου της καταβύθισης (precipitation).

Η μεγάλη τιμή της ενθαλπίας (79,01 J/g) που καταγράφεται στο επεξεργασμένο δείγμα (HMNP) όσο και η παρουσία εξώθερμης καμπύλης (2<sup>η</sup> κορυφή), ενδεχομένως να οφείλεται στην εξάτμιση του νερού καθώς το νερό που περιέχεται στο δείγμα είναι αρκετά υψηλό (90%). Στο συγκεκριμένο δείγμα που αποτελείται από νανοσωματίδια, το νερό κινείται ελεύθερα μεταξύ των σωματιδίων με αποτέλεσμα την ευκολότερη εξάτμισή του. Η προσθήκη μεγάλης μάζας δείγματος έγινε για την αύξηση της ευαισθησίας της μέτρησης και τον διαχωρισμό των διάφορων φάσεων.



### 3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

Τα ποσοστά υγρασίας τα οποία προσδιορίστηκαν για τα δείγματα αμύλου-β-καροτενίου με τη χρήση της Εξ. 3 και οι τιμές ενεργότητας παρατίθενται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 13.** Μετρήσεις υγρασίας και ενεργότητας νερού ανά δείγμα.

<b>Δείγματα</b>	<b>Βάρος δείγματος</b>	<b>Ξηρό Βάρος</b>	<b>Ποσοστό Υγρασίας(%)</b>	<b>Ενεργότητα νερού (a<sub>w</sub>)</b>
HMANPC1	99	92	7,07	0,344
HMANPCR	100	92	8,00	0,464
HMANPCFR	100	93	7,00	0,328
HMANPCO12	95	92	3,16	0,265
HMNPC	99	67	32,32	0,506

Παρατηρήθηκε ότι η υγρασία εμφανίζει ποσοστά μεταξύ 3,16-8% για τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε θέρμανση στους 70 °C για 10 λεπτά (annealing). Αντιθέτως, στο δείγμα που παραλήφθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία καταγράφηκε ποσοστό 32,32%.

Η ενεργότητα νερού εμφανίζει ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,265 – 0,506 κάτι που σημαίνει ότι δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στα δείγματα λόγω της μικρής τιμής της ενεργότητας. Η μικρότερη τιμή καταγράφεται στο δείγμα HMANPCO<sub>12</sub>, δηλαδή σε εκείνο στο οποίο η ξήρανση διήρκησε το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (12 ώρες). Οι υψηλότερες τιμές διαθέσιμου νερού παρατηρούνται στα δείγματα HMANPCR και HMNPC όπου η διάρκεια της ξήρανσης ήταν 6 ώρες. Επίσης διαπιστώνεται ότι το δείγμα με τη μεγαλύτερη ενεργότητα νερού (HMNPC) είναι αυτό που εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά υγρασίας.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επεξεργασία ανθεκτικού αμύλου με στόχο τη χρησιμοποίησή του ως φορέα ενθυλάκωσης μορίων β-καροτενίου.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, για να επιτευχθεί η ενθυλάκωση κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία νανοσωματιδίων αμύλου. Από τα αποτελέσματα της έρευνας επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός νανοσωματιδίων ανθεκτικού αμύλου μέσω της εφαρμογής της μεθόδου καταβύθισης (precipitation) με τη χρήση του καυστικού νατρίου (NaOH). Επιπλέον επιβεβαιώνεται και η ενθυλάκωση του β-καροτενίου από μόρια αμύλου με αρκετά υψηλές αποδόσεις.

Τόσο στα νανοσωματίδια όσο και στα παραγόμενα σύμπλοκα αμύλου-β-καροτενίου παρατηρείται η μετατροπή της κρυσταλλικότητας Β-τύπου σε V-τύπου. Γενικότερα καταγράφεται μια αύξηση της κρυσταλλικότητας στα ενθυλακωμένα σωματίδια, συγκριτικά με την τιμή που εμφανίζεται στο ακατέργαστο άλευρο (HM). Η αύξηση της κρυσταλλικότητας είναι επιθυμητή καθώς μειώνονται οι θέσεις που παραμένουν ελεύθερες στο μόριο της αμυλόζης και συγχρόνως αποφεύγεται η απώλεια της ενθυλακωμένης ουσίας.

Η διαδικασία της νανοκαταβύθισης (nanoprecipitation) φαίνεται να επηρεάζει τις θερμικές ιδιότητες των δειγμάτων καθώς στα παραγόμενα νανοσωματίδια παρουσίασαν αισθητή μείωση της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης. Επιπλέον στη 2<sup>η</sup> θερμική μεταβολή εμφάνισαν πολύ υψηλή τιμή ενθαλπίας ( $\Delta H$ ).

Όσον αφορά τον τρόπο ξήρανσης (μέσω φούρνου ή λυοφιλίωσης) που εφαρμόζεται ως τελικό στάδιο κατά την παραγωγική διαδικασία φαίνεται να επηρεάζει τα παραγόμενα δείγματα καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων τόσο στα ποσοστά ανάκτησης της ενθυλακωμένης ουσίας όσο και στην οπτική εικόνα που αυτά παρουσιάζουν. Διαφορές καταγράφονται και μεταξύ των δειγμάτων των οποίων η ξήρανση διήρκησε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6 ή 12 ώρες). Κάτι τέτοιο φαίνεται να υποστηρίζεται από τη διαφορά στο χρώμα των δειγμάτων. Χαμηλό ποσοστό ανάκτησης β-καροτενίου καταγράφεται στο δείγμα στο οποίο παραλείπεται το στάδιο της θέρμανσης στους 70 °C για 10 (ισχυροποίηση) λεπτά και κατά συνέπεια συμπεραίνεται η σημαντικότητα του συγκεκριμένου βήματος. Επιπλέον το ποσοστό ανάκτησης φαίνεται να επηρεάζεται από την ανομοιογένειά του αλλά και από τη διάρκεια της αποθήκευσης του δείγματος καθώς για μεγάλα χρονικά διαστήματα αποθήκευσης το ποσοστό ανάκτησης β-καροτενίου εμφάνιζε μείωση.

## 5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα επιτυγχάνεται η δημιουργία νανοσωματιδίων και η ανάπτυξη ενθυλακωμένων ουσιών μέσω της εφαρμογής μιας απλής μεθόδου και της χρήσης ενός διαλύτη σε μικρές ποσότητες (καυστικό νάτριο) ο οποίος απομακρύνεται με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις, θεωρείται ασφαλής για την ανθρώπινο οργανισμό οπότε τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα. Επιπλέον σε αντίθεση με άλλες βιβλιογραφικές μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω αποφεύγεται η εφαρμογή πιο περίπλοκων τεχνικών (spray drying, electrospinning), η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών για μεγάλα χρονικά διαστήματα αλλά και η χρήση ισχυρών χημικών ουσιών (DMSO), που ενδεχομένως να ενέχουν κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μια συγκριτική μελέτη μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ενθυλάκωσης.

Αν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κρίνονται ενθαρρυντικά, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κόκκων αμύλου με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) ώστε να προσδιοριστεί το ακριβές μέγεθος και η μορφή. Επιπλέον, θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω οι θερμικές ιδιότητες των ενθυλακωμένων δειγμάτων για την καλύτερη κατανόηση της σημασίας του κάθε σταδίου κατά την πειραματική διαδικασία.

Θα ήταν απαραίτητο να εξεταστεί η δυνατότητα μείωσης της αιθανόλης που χρησιμοποιείται κατά το στάδιο των φυγοκεντρήσεων, καθώς κατά την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα η χρήση της θα ήταν οικονομικά ασύμφορη.

Επίσης θα ήταν χρήσιμη η μελέτη του ποσοστού ανάκτησης β-καροτενίου ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης και να εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζεται από ένα εύρος θερμοκρασιών ή από διαφορετικά pH. Επίσης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η διερεύνηση της συμπεριφοράς της ενθυλακωμένης ουσίας στο περιβάλλον του στομάχου (in-vitro).

Τέλος θα μπορούσε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του αμύλου ως φορέας ενθυλάκωσης με τη χρήση άλλων ουσιών (λιπαρά οξέα, βιταμίνες) και να πραγματοποιηθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Ξένη Βιβλιογραφία**

- Ahmad, M., Mudgil, P., Gani A., Hamed, F., Masoodi, F. A., & Maqsood, S. 2019. Nano-encapsulation of catechin in starch nanoparticles: Characterization, release behavior and bioactivity retention during simulated in-vitro digestion. *Food Chemistry*, 270, 95-104.
- Angellier, H., Choisnard, L., Molina-Boisseau, S., Ozil, P., & Dufresne, A. 2004. Optimization of the Preparation of Aqueous Suspensions of Waxy Maize Starch Nanocrystals Using a Response Surface Methodology. *Biomacromolecules*, 5(4), 1545-1551.
- Bamidele, O. P., Duodu, K. G., & Emmambux, M. N. 2019. Encapsulation and antioxidant activity of ascorbyl palmitate with normal and high amylose maize starch by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 86, 124–133.
- Bel Haaj, S., Magnin, A., Pétrier, C., & Boufi, S. 2013. Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1625– 1632.
- Biliaderis, C. G., Page, C. M., Slade, L., & Sirett, R. R. 1985. Thermal behavior of amylose-lipid complexes. *Carbohydrate Polymers*, 5, 367–389.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85–112.
- Chung, H-J., & Liu, Q. 2009. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers*, 77, 807-815.
- Chung, H-J., Liu, Q., & Hoover, R. 2009. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 436-447.
- Chung, H-J., Jeong, H-Y., Lim, S-T. 2003. Effects of acid hydrolysis and defatting on crystallinity and pasting properties of freeze-thawed high amylose corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 54, 449–455.
- Chin, S. F., Pang, S. C., & Tay, S. H. 2011. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1817-1819.
- Conde-Petit, B., Escher, F., & Nuessli, J. 2006. Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 227-235.

- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. 2009. Form and functionality of starch. *Food hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534.
- Dries, D. M., Gomand, S. V., Pycarelle, S. C., Smet, M., Goderis, B., & Delcour, J. A. 2017. Development of an infusion method for encapsulating ascorbyl palmitate in V-type granular cold-water swelling starch. *Carbohydrate Polymers*, 165, 229-237.
- Eerlingen, R. C., & Delcour, J. A. 1995. Formation, Analysis, Structure and Properties of Type III Enzyme Resistant Starch. *Journal of Cereal Science*, 22, 129-138.
- Ellis, R. P., Cochrane, M. P., Dale, M. F. B., Duffus, C. M., Lynn, A., Morrison, I. M., Prentice, R. D. M., Swanston, J. S., & Tiller, S. A. 1998. Starch production and industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(3), 289-311.
- Englyst, H. N., & Cummings J. H. 1985. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *The American journal of clinical nutrition*, 42(5), 778-787.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. 1992. Classification and Measurement of Nutritionally Important Starch Fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(2), 33-50.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. 2013. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J., Ammoury, N., Benita, S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1–R4.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., & Baldwin, P. M. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate polymers*, 32(3-4), 177-191.
- Giuberti, G., Gallo, A., Fortunati, P., & Rossi, F. 2015. Influence of high-amylose maize starch addition on in vitro starch digestibility and sensory characteristics of cookies. *Starch-Stärke*, 68, 469-475.
- Gökmen, V., Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z., & Shimoni, E. 2011. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105(4), 585-591.
- Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., & Davis, S. S. 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57, 171–185.

- Haralampu, S. G. 2000. Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*, 41, 285-292.
- Hasanvand, E., Fathi, M., Bassiri, A., Javanmard, M., & Abbaszadeh, R. 2015. Novel starch based nanocarrier for Vitamin D fortification of milk: Production and characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 264-277.
- Hasjim, J., Ai, Y. & Jane, J. 2013. Novel Applications of Amylose-Lipid Complex as Resistant Starch Type 5. In *Resistant Starch* (eds Y. Shi and C. C. Maningat).
- Hasjim, J., & Jane, J. L. 2009. Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch. *Journal of Food Science*, 74(7), 556-562.
- Hebeish, A., El-Rafie, M. H., & EL-Sheikh, M. A. 2014. Ultra-Fine Characteristics of Starch Nanoparticles Prepared Using Native Starch With and Without Surfactant. *J Inorg Organomet Polym*, 24, 515-524.
- Higgins, J. A., Dana, H. R., Donahoo, W. T., Brown, I. L., Bell, M. L., Bessesen, D. H. 2004. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutrition & Metabolism*, 1:8.
- Hsien-Chih, H. W., & Sarko, A. 1978. The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. *Carbohydrate Research*, 61, 27-40.
- Hu, Y., Jiang, X., Ding, Y., Ge, H., Yuan, Y., & Yang, C. 2002. Synthesis and characterization of chitosan–poly (acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 23, 3193-3201.
- Jane, J-L. 2009. Chapter 6 - Structural Features of Starch Granules II, Editors: James BeMiller and Roy Whistler, In *Food Science and Technology, Starch: Third Edition*, Academic Press, 193-236.
- Jayakody, L., & Hoover, R. 2008. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins—A review. *Carbohydrate Polymers*, 74, 691-703.
- Jeon, Y-J., Vasanthan, T., Temelli, F., & Song, B-K. 2003. The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Research International*, 36, 349-355.
- Jia, Z., Dumont, M-J., & Orsat, V. 2016. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104.
- Jiang, H., Jane, J. L., Acevedo, D., Green, A., Shinn, G., Schrenker, D., Srichuwong, S., Campbell, M., & Wu, Y. 2010. Variations in Starch Physicochemical Properties

- from a Generation-Means Analysis Study Using Amylomaize V and VII Parents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5633-5639.
- Jovanovich, G., Añón, M. C. 1999. Amylose–lipid complex dissociation. A study of the kinetic parameters. *Biopolymers*, 49, 81–89.
- Joye, I. J., & McClements, D. J. 2014. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 417-427.
- Kacurakova, M., & Mathlouthi, M. 1996. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of glycosidic bond. *Carbohydrate Research*, 284, 145-157.
- Kearsly, M. W., & Dziejczak, S. Z. 1995. Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives. Dordrecht: Springer Science + Business Media.
- Kong, L., Bhosale, R., & Ziegler, G. R. 2018. Encapsulation and stabilization of  $\beta$ -carotene by amylose inclusion complexes. *Food Research International*, 105, 446-452.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. 2014. Molecular encapsulation of ascorbyl palmitate in preformed V -type starch and amylose. *Carbohydrate Polymers*, 111, 256-263.
- Kong, L., & Ziegler, G. R. 2014. Formation of starch-guest inclusion complexes in electrospun starch fibers. *Food Hydrocolloids*, 38, 211-219.
- Kim, J-Y., & Huber, K. C. 2016. Preparation and characterization of corn starch- $\beta$ -carotene composites. *Carbohydrate Polymers*, 136, 394-401.
- Kim, H. Y., Park, S. S., & Lim, S. T. 2015. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.
- Kristo, E., & Biliaderis, C. G. 2007. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, 68, 146–158
- Le Corre, D., Vahanian, E., Dufresne, A., & Bras, J. 2012. Enzymatic Pretreatment for Preparing Starch Nanocrystals. *Biomacromolecules*, 13(1), 132-137.
- Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. 2010. Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules*, 11, 1139-1153.
- Lesmes, U., Cohen, S.H., Shener, Y., & Shimoni, E. 2009. Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 667–675.
- Li, C., Sun, P., & Yang, C. 2012. Emulsion stabilized by starch nanocrystals. *Starch-Stärke*, 64, 497-502.

- Liu, D., Wu, Q., Chen, H., & Chang, P. R. 2009. Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro-to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 339(1), 117-124.
- Liu, H., Yu, L., Xie, F., Chen, L. 2006. Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 357-363.
- Ma, Y., He, H., Wu, J., Wang, C., Chao, K., & Huang, Q. 2018. Assessment of Polysaccharides from Mycelia of genus *Ganoderma* by Mid-Infrared and Near-Infrared Spectroscopy. *Scientific Reports*, 8, 1-10.
- Ma, X., Jian, R., Chang, P. R., & Yu, J. 2008. Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles/Plasticized-Starch Composites. *Biomacromolecules*, 9, 3314–3320.
- Manners, D. J. 1989. Recent Developments in Our Understanding of Amylopectin Structure. *Carbohydrate Polymers*, 11, 87-112.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. 2007. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124.
- Morrison, W. R., Law, R. V., & Snape, C. E. 1993. Evidence for Inclusion Complexes of Lipids with V-amylose in Maize, Rice and Oat Starches. *Journal of Cereal Science*, 18, 107–109.
- Nara, S., & Komiya, T. 1983. Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. *Starch- Stärke*, 35(12), 407-410.
- Nugent, A. P. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1), 27-54.
- Obiro, W. C., Sinha Ray, S., & Emmambux, M. N. 2012. V-amylose Structural Characteristics, Methods of Preparation, Significance, and Potential Applications. *Food Reviews International*, 28, 412-438.
- Ordonio, R. L., & Matsuoka, M. 2016 Increasing resistant starch content in rice for better consumer health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (45), 12616-12618.
- Palozza, P., Muzzalupo, R., Trombino, S., Valdannini, & A., Picci, N. 2006. Solubilization and stabilization of  $\beta$ -carotene in niosomes: delivery to cultured cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 139, 32-42.
- Paredes, A. J., Asencio, C. M., Manuel, L. J., Allemandi, D. A., & Palma, S. D. 2016. Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization. *Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing*, 1(1), 56-79.



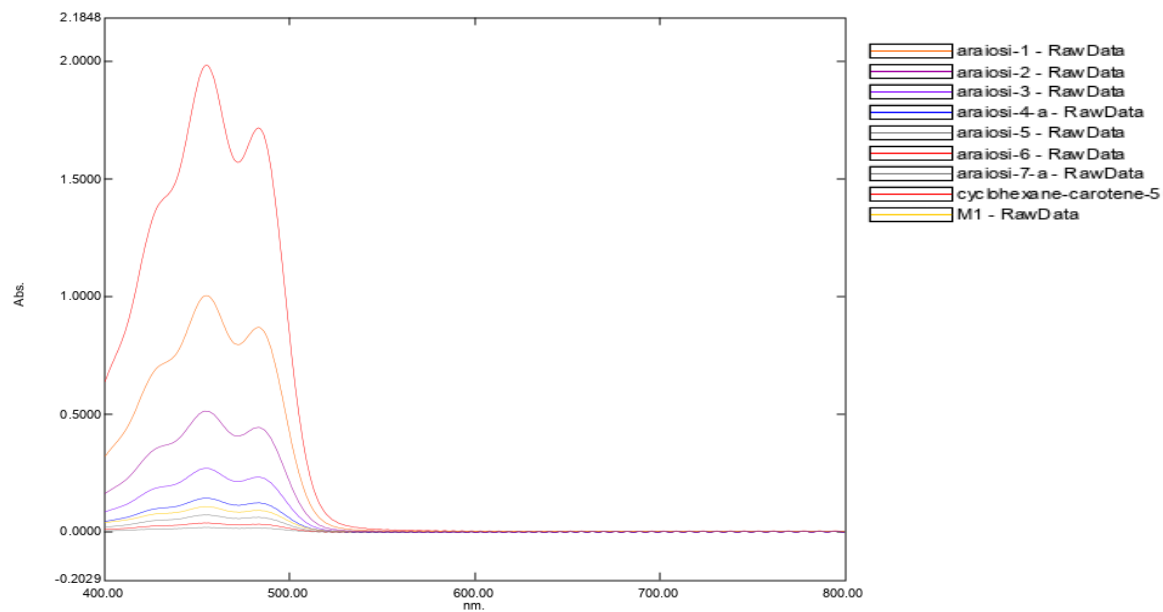
- Putaux, J. L., Molina-Boisseau, S., Momaur, T., & Dufresne, A. 2003. Platelet Nanocrystals Resulting from the Disruption of Waxy Maize Starch Granules by Acid Hydrolysis. *Biomacromolecules*, 4(5), 1198-1202.
- Qin, Y., Liu, C., Jiang, S., Xiong, L., & Sun, Q. 2016. Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. *Industrial Crops and Products*, 87, 182-190.
- Raben, A., Tagliabue, A., Christensen, N. J., Madsen, J., Holst, J. J., & Astrup, A. 1994. Resistant Starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response and satiety. *American Society for Clinixal Nutrition*, 60, 544–551.
- Raphaelides, S., & Karkalas, J. 1988. Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes. *Carbohydrate Research*, 172(1), 65-82.
- Ribeiro, H. S., Chu, B-H., Ichikawa, S., & Nakajima, M. 2008. Preparation of nanodispersions containing b-carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22, 12-17.
- Robert, P., Garcia, P., Reyes, N., Chavez, J., & Santos J. 2012. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*, 134, 1-8.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. 2006. Resistant starch – A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 1-17.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.
- Socrates, G. 2001. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts. 3<sup>rd</sup> edition. Chichester: Wiley.
- Suyao, X., Chunyi, T., Xuanming, L., Danmi, Y., Qiaoling, L., Changgang, X., Dongyin, T., & Lijian, Z. 2006. Preparation of folate-conjugated starch nanoparticles and its application to tumor-targeted drug delivery vector. *Chinese Science Bulletin*, 51(14), 1693-1697.
- Tang, H., Mitsunaga, T., & Kawamura, Y. 2006. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*, 63(4), 555-560.
- Tester, R. F., & Karkalas, J. 2001. The effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. *Starch-Stärke*, 53(10), 513-519.

- Tester, R. F., & Debon, S. J. J. 2000. Annealing of starch — a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27 (1), 1-12.
- Tyssandier, V., Lyan, B., & Borel, P. 2001. Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533, 285-292.
- Van Poppel, G., Goldbohm, A. R. 1995. Epidemiologic evidence for  $\beta$ -carotene and cancer prevention. *American Society for Clinical Nutrition*, 62, 1393-1402.
- Van Soest, J. J. G., & Vliegenthart, J. F. G. 1997. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. *Trends in biotechnology*, 15(6), 208-213.
- Yan, X., Chang, Y., Wang, Q., Fu, Y., Zhou, J. 2017. Effect of drying condition on crystallinity of amylose nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 481-488.
- Yao, N., Paez, A. V., White, P. J. 2009. Structure and Function of Starch and Resistant Starch from Corn with Different Doses of Mutant Amylose-Extender and Flourey-1 Alleles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2040-2048.
- Yu, L., Christie, G. 2001. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 46, 179-184.
- Zavareze, E. D. R., & Dias, A. R. G. 2011. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 317-328.
- Zhong, Y., Zhu, H., Liang, W., Li, X., Liu, L., Zhang, X., Yue, H., Xue, J., Liu, X., & Guo, D. 2018. High-amylose starch as a new ingredient to balance nutrition and texture of food. *Journal of Cereal Science*, 81, 8-14.
- Zobel, H. F. 1988. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch- Stärke* 40(2), 44-50.

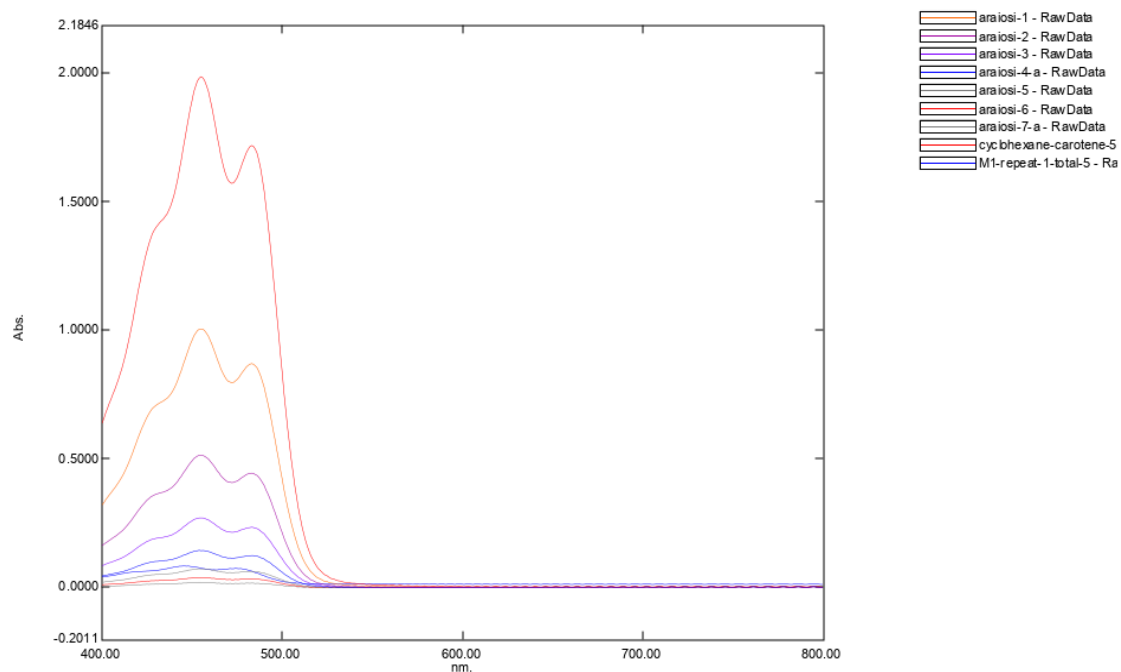
### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- Ταραντίλης, Π. Α., & Παππάς Χ. Σ. 2015. Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις
- Μαντάλα, Ι. Γ. 2002. Βελτιστοποίηση της ποιότητας αμυλούχων προϊόντων με μελέτη των ρεολογικών τους ιδιοτήτων και της μικροδομής τους, Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

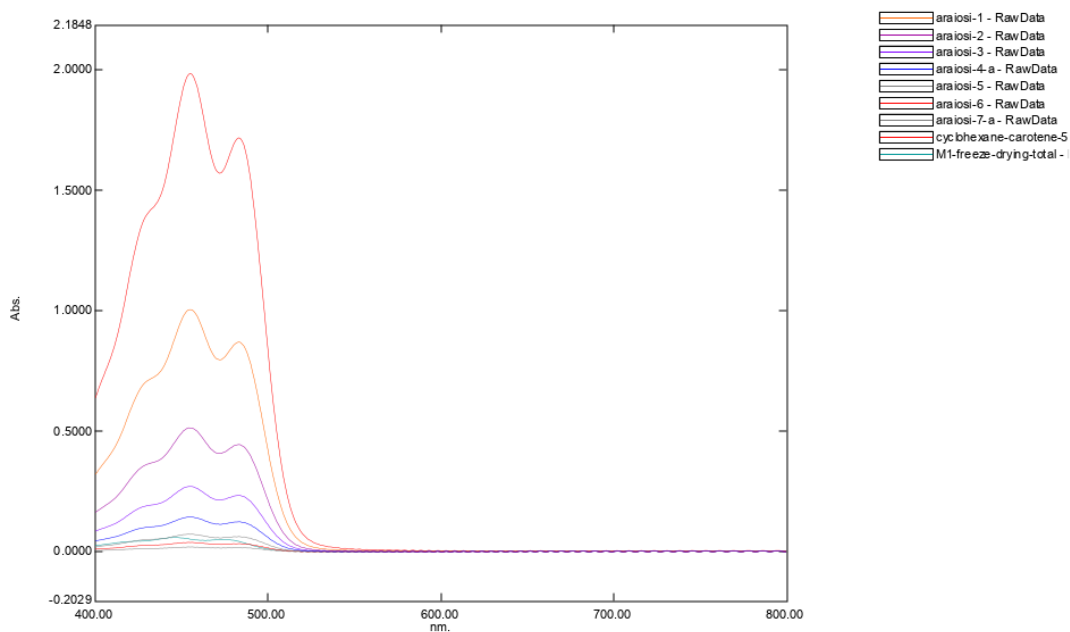
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



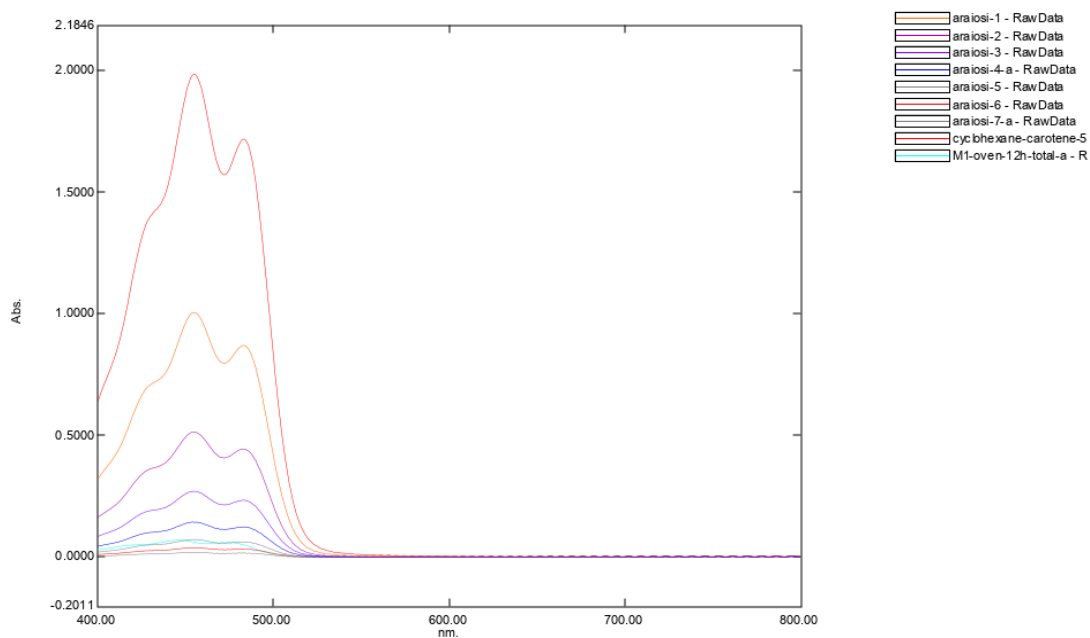
Σχήμα 27. Φάσμα απορρόφησης δείγματος HMANPC1 για μήκος κύματος 400-800nm.



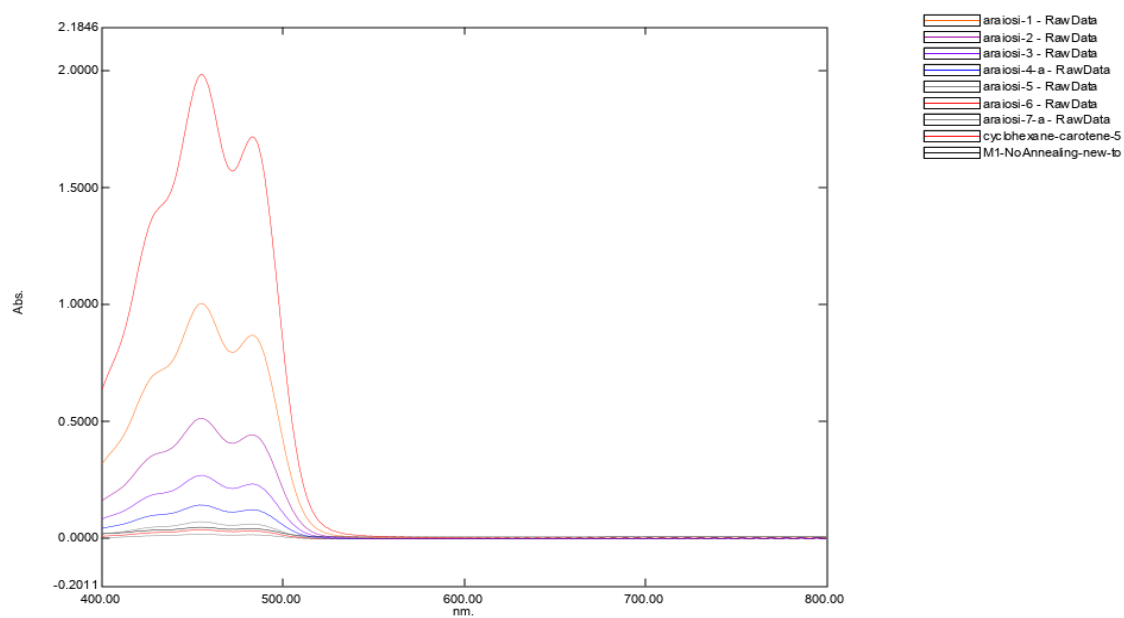
Σχήμα 28. Φάσμα απορρόφησης δείγματος HMANPCR για μήκος κύματος 400-800nm.



**Σχήμα 29.** Φάσμα απορρόφησης δείγματος HMANPCFR για μήκος κύματος 400-800nm.



**Σχήμα 30.** Φάσμα απορρόφησης δείγματος HMANPCO<sub>12</sub> για μήκος κύματος 400-800nm.



**Σχήμα 31.** Φάσμα απορρόφησης δείγματος ΗΜΝΡC για μήκος κύματος 400-800nm.



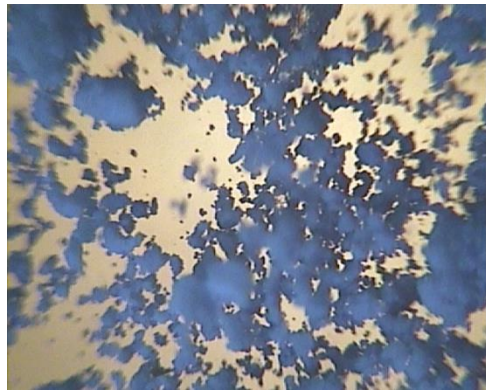
**Εικόνα 20.** Δείγμα ΗΜΑΝΡC1



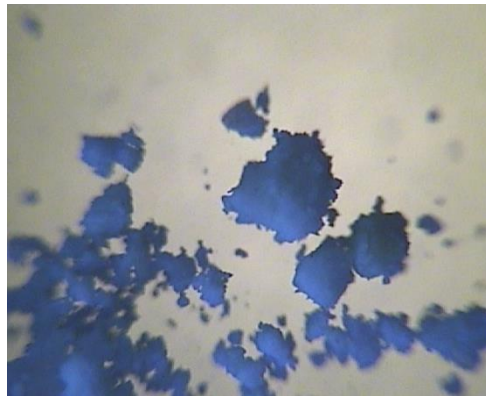
**Εικόνα 21.** Δείγμα ΗΜΑΝΡCΡ



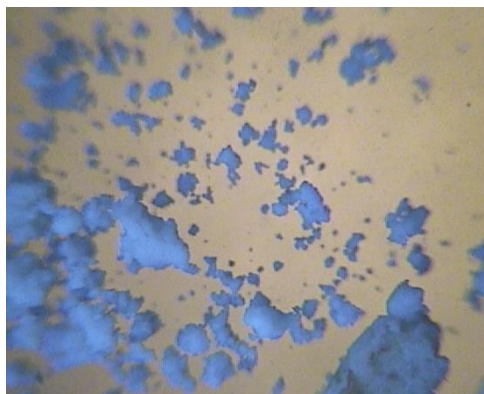
**Εικόνα 22.** Δείγμα HMNPC



**Εικόνα 23.** Κόκκοι δείγματος HMANPCR (Μεγέθυνση x40)



**Εικόνα 24.** Κόκκοι δείγματος HMANPCO<sub>12</sub> (Μεγέθυνση x40)



**Εικόνα 25.** Κόκκοι δείγματος HMANPCFR (Μεγέθυνση x40)

**Πίνακας 14.** Τιμή απορρόφησης ανά δείγμα.

Δείγματα	Απορρόφηση					Συνολική Εκχύλιση
	1 <sup>η</sup> εκχύλιση	2 <sup>η</sup> εκχύλιση	3 <sup>η</sup> εκχύλιση	4 <sup>η</sup> εκχύλιση	5 <sup>η</sup> εκχύλιση	
<b>HMANPC1</b>	0,1063	0,0562	0,0357	0,0278	-	0,0467
<b>HMANPCR</b>	0,2632	0,0738	0,0910	0,0499	0,0402	0,0668
<b>HMANPCFR</b>	0,1637	0,0359	0,0504	0,0828	0,0533	0,0509
<b>HMANPCO12</b>	0,1618	0,0617	0,0504	0,0271	-	0,0603
<b>HMNPC</b>	0,1735	0,0877	0,0828	0,0533	-	0,0480