

تغییرات خواص فیزیکوشیمیایی و ساختار مولکولی نشاسته گندم تحت تأثیر دما و فشار تنشی بالا

مهسا مجذوبی* و عسگر فرحناکی^۱

(تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۸)

چکیده

در این تحقیق تأثیر دو فرایند حرارتی متداول در پخت مواد غذایی شامل اتوکلاو و اکستروژن بر خواص فیزیکوشیمیایی و ساختار مولکولی نشاسته گندم بررسی شده است. نتایج نشان داد که فرایند پخت با اتوکلاو باعث افزایش حلالیت و کاهش ویسکوزیته نسبی نمونه‌ها می‌شود که خود دلیلی بر احتمال شکستگی مولکول‌های نشاسته می‌باشد. به علاوه ثابت ماندن ضریب ته‌نشین شدن (*s-value*) آمیلوز و کاهش *s-value* آمیلوپکتین نمونه‌ها با افزایش دما تأکیدی بر تجزیه مولکولی نشاسته خصوصاً آمیلوپکتین بود، درحالی‌که ساختار آمیلوز بدون تغییر باقی ماند. نتایج نشان داد که کاهش آب مصرفی در تهیه نمونه‌ها جهت فرایند اکستروژن باعث افزایش نیروی برش و فشار لازم جهت این فرایند گردید که خود باعث تغییراتی در ساختار نشاسته شد که شامل تخریب گرانول‌های نشاسته، ایجاد اتصال آمیلوز با چربی و نیز تجزیه آمیلوپکتین بود که با مشاهده کاهش در *s-value* آمیلوپکتین مشخص گردید. هم‌چنین با کاهش آب مصرفی پف‌کردگی محصول نهایی افزایش ولی ویسکوزیته آب سرد و نهایی آنها کاهش یافت. این مشاهدات می‌تواند دلیلی بر تأثیر خواص مولکولی نشاسته بر بعضی خواص فیزیکی محصول نهایی باشد که خود اهمیت مطالعات مولکولی را برای توجیه خواص فیزیکی محصولات آشکار می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: نشاسته گندم، اکستروژن، اتوکلاو، ساختار مولکولی، ضریب ته‌نشینی

مقدمه

دارویی، شیمیایی و صنایع تولید کاغذ، رنگ و پارچه می‌باشد (۲، ۶ و ۹).

نشاسته عمدتاً^۱ از دو کربوهیدرات به نام‌های آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل شده است (۶ و ۲۳). آمیلوز یک پلیمر خطی از واحدهای گلوکز است که با اتصالات (۴-۱) α به یکدیگر متصل شده‌اند. در حدود ۱/۶ درصد از واحدهای گلوکز توسط اتصالات (۶-۱) α بر این ساختار اصلی وصل می‌شوند که این امر ساختار آمیلوز را کمی شاخه‌ای می‌کند. آمیلوز که در حدود

نشاسته مهم‌ترین منبع انرژی ذخیره‌ای در گیاهان به‌شمار می‌رود که به وفور در دانه غلات (مانند گندم، ذرت و برنج) و در گیاهان غده‌ای (مانند انواع سیب زمینی) یافت می‌شود. از نظر تغذیه‌ای نشاسته تأمین‌کننده ۷۰-۸۰٪ از انرژی مورد نیاز روزانه انسان می‌باشد و به ویژه از لحاظ تأمین کالری مورد نیاز در کشورهای جهان سوم حائز اهمیت فراوان می‌باشد. نشاسته هم‌چنین دارای مصارف و کاربردهای بسیار در صنایع غذایی،

۱. استادیاران علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: majzoobi@shirazu.ac.ir

(High Performance Liquid Chromatography; HPLC) نشان دادند که نشاسته محلول شده با روش قبل دچار تجزیه می‌گردد (۱۹). وسترنین و همکارانش نشاسته ذرت با آمیلوز بالا را در دمای 140°C و 160°C در اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه حرارت دادند و ساختار مولکولی آن را با استفاده از تکنیک جداسازی بر اساس اندازه مولکول‌ها (Size Exclusion Chromatography; SEC) مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که آمیلوز تجزیه می‌گردد (۳۱).

در مورد تأثیر اکستروژن بر مولکول‌های نشاسته کلونا و همکارانش نشاسته گندم را با استفاده از یک اکسترودر در رطوبت ۴۴-۱۹٪ در دمای $180-90^{\circ}\text{C}$ اکستروژن نمودند و ساختار مولکولی نشاسته را با استفاده از روش ویسکوزیته ذاتی (Intrinsic viscosity) و ژل کروماتوگرافی (GC) مطالعه نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو مولکول آمیلوز و آمیلوپکتین در طی این فرایند تجزیه می‌شوند (۸). در تحقیق دیگری توسط کای و همکارانش نشاسته گندم با اکسترودر دارای دو پیچ در رطوبت ۳۰ تا ۲۵ درصد در دمای 160°C -۱۰۰ اکستروژن شد. آنها مطالعات مولکولی خود را توسط روش جداسازی HPSEC انجام دادند و نشان دادند تنها آمیلوپکتین در طی این فرایند تجزیه می‌گردد (۷). برامر و همکارانش با استفاده از تکنیک جداسازی بر اساس اندازه مولکول‌ها مجهز به سیستم افتراق چند زاویه‌ای نور لیزر (Size Exclusion Chromatography Multi Angle Laser Light Scattering; SEC-MALLS) تجزیه شدن تنها آمیلوپکتین ذرت در طی فرایند اکستروژن را نشان دادند (۴).

تعیین این که کدام یک از مولکول‌های سازنده نشاسته (آمیلوز و آمیلوپکتین) در طی این فرایندها دچار تغییر می‌شوند در تجزیه و تحلیل بهتر خواص فیزیکی و عملکردی محصولات فرایند شده کاربرد دارد (۸، ۱۱ و ۲۸). اگرچه بررسی خواص مولکولی نشاسته فرایند شده از اهمیت بسیاری برخوردار است، انجام آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل‌های مربوطه پیچیدگی خاصی دارد. از دلایل این امر می‌توان به ساختار پیچیده مولکول‌های

۳۰-۲۰٪ نشاسته را تشکیل می‌دهد دارای وزن مولکولی ۱۰۵-۱۰۶ دالتون است (۱۳ و ۲۳).

آمیلوپکتین دیگر پلی ساکارید سازنده نشاسته، دارای ساختاری بسیار بزرگ و شاخه‌ای است. ساختار اصلی این مولکول شبیه به آمیلوز است که در آن واحدهای گلوکز با اتصالات (۴-۱) α به هم متصل شده‌اند. علاوه بر آن در حدود ۴-۶٪ از گلوکزها با اتصالات (۶-۱) α به ساختار اصلی وصل می‌شوند که این امر ساختار بسیار شاخه‌ای را ایجاد می‌کند. وزن مولکولی آمیلوپکتین حدود ۱۰۹-۱۰۷ دالتون است و در حدود ۷۰-۸۰ درصد از وزن نشاسته را شامل می‌شود (۱۱) و تحقیقات مولکولی نشان داده است که ارتباط تنگاتنگی بین ساختار شیمیایی آمیلوز و آمیلوپکتین و خواص عملکردی نشاسته وجود دارد. به همین دلیل مطالعات بسیاری در زمینه کشف چنین ارتباطی در حال انجام شدن است (۱۶، ۱۷ و ۱۸).

بسیاری از فرایندهای تهیه غذا باعث ایجاد تغییراتی در ساختار نشاسته و در نتیجه باعث بروز خواص عملکردی جدیدی در آن می‌شود (۵، ۷ و ۸). متداول‌ترین این فرایندها فرایند حرارتی در دمای بالا می‌باشد که از انواع آن می‌توان به فرایندهای اتوکلاو و اکستروژن اشاره کرد که در آنها از دما و فشار بالا و نیروی برشی استفاده می‌گردد. فرایند اتوکلاو علاوه بر پخت غذا در افزایش حلالیت نشاسته در آب، استریلیزاسیون مواد غذایی و ایجاد ترکیب نشاسته و چربی کاربرد دارد (۶ و ۱۰). از فرایند اکستروژن که امروزه کاربرد زیادی در صنایع غذایی دارد، در تولید غلات صبحانه‌ای، انواع اسنک‌ها، غذاهای آماده مصرف، غذاهای رژیمی و غذای دام استفاده می‌شود (۲۲ و ۲۵).

در زمینه کاربرد اتوکلاو جهت افزایش حلالیت نشاسته در آب، ابرل و همکارانش نشان دادند که استفاده از دمای ۱۸۰-۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱۵ بار به مدت ۲۰ دقیقه منجر به حلالیت کامل نشاسته در آب بدون هیچ‌گونه تأثیری بر مولکول‌های نشاسته می‌شود (۱). درحالی‌که هان و همکارانش با استفاده از تکنیک جدا سازی مولکولی با کارایی بالا بر اساس اندازه مولکول‌ها

اجزای نامحلول، نتایج قابل قبولی به دست نمی آید (۲۰، ۳۰ و ۳۲).

مواد و روش ها

الف) فرایند اتوکلاو

تهیه نمونه ها

برای تهیه هر نمونه، ۳/۵ گرم نشاسته گندم تهیه شده از شرکت سیگما (با ۱۱/۵٪ رطوبت) با ۲۵ گرم آب مقطر در درون یک ظرف فلزی (فولاد قلع اندود) مخصوص غذاهای کنسروی کاملاً مخلوط شد و پس از درب بندی به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۸۰°C قرار گرفت و هر پنج دقیقه یک بار با استفاده از یک همزن رومیزی (Vortex mixer) به مدت ۳۰ ثانیه هم زده شد تا از رسوب احتمالی نشاسته جلوگیری شود و سپس به حمام آب گرم بازگردانده شد. هم زدن نمونه ها و حرارت دادن آنها به منظور ایجاد یک ژل یک نواخت از نشاسته قبل از انتقال آنها به اتوکلاو به کار رفت. نمونه شاهد از نمونه تهیه شده در این مرحله قبل از انتقال آنها به اتوکلاو تهیه شد.

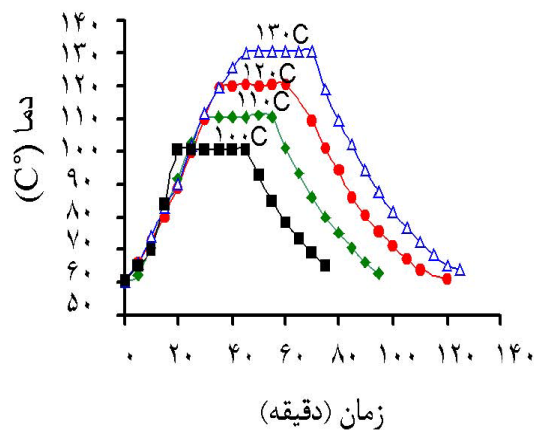
شرایط اتوکلاو

درجه حرارت های ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰ و ۱۳۰ درجه سانتی گراد هر یک به مدت ۳۰ دقیقه در فشار ۱۵ psi در یک اتوکلاو رومیزی مدل Genesis 60E ساخت شرکت Rodwell Scientific Instrument (انگلستان) جهت فرایند نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت و در پایان نمونه ها در دمای ۶۵°C خارج شدند. نمودار دما-زمان که در طی آن فرایند اتوکلاو کامل شد در شکل ۱ نشان داده شده است.

اندازه گیری میزان حلالیت نشاسته نمونه های اتوکلاو شده

پس از خروج نمونه ها از اتوکلاو دمای متوسط آنها ۷۰°C بود. در این شرایط محتویات هر ظرف به یک لوله سانتریفیوژ حاوی ۲۸/۵ گرم آب (معادل وزن نمونه ها) در دمای ۷۰°C اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با استفاده از یک همزن برقی کاملاً مخلوط شد و

نشاسته اشاره کرد: هر دو مولکول آمیلوز و آمیلوپکتین دارای یک طیف وسیع از نظر وزن مولکولی می باشند و لذا جدا سازی آنها بسیار مشکل است (۲۰، ۲۴ و ۲۶). مرحله جدا سازی آمیلوز و آمیلوپکتین یک مرحله اصلی و در عین حال دشوار و بحث برانگیز در بسیاری از تکنیک های مولکولی بررسی نشاسته می باشد (۲۴ و ۲۶). علاوه بر آن جهت دریافت نتایج دقیق لازم است نشاسته به طور کامل در حلال مناسبی حل شود (۱۱، ۱۷ و ۲۷). بهترین حلال شناخته شده محلول ۹۰٪ دی متیل سولفوکسید (DMSO) در آب مقطر می باشد که می تواند تحت شرایط خاصی (دمای ۱۰۰°C و هم زدن مداوم نمونه) نزدیک به ۱۰۰٪ نشاسته را بدون هیچ گونه تغییر مولکولی در خود حل کند (۲، ۱۷ و ۲۷). اما کاربرد این حلال در بسیاری از دستگاه های مطالعات مولکولی به دلیل اثر خوردگی آن امکان پذیر نیست و لذا نشاسته با استفاده از فشار و دمای بالا در آب حل می گردد که تحت این شرایط امکان تخریب ساختار نشاسته وجود دارد که این خود تفسیر نتایج را مشکل می سازد (۵، ۱۷، ۱۹ و ۲۸). در این تحقیق با استفاده از یک روش جدید در مطالعات مولکولی نشاسته به نام تکنیک اولترا سانتریفیوژ آنالیتیکی (AUC) ضریب ته نشین شدن (s-value) آمیلوز و آمیلوپکتین تعیین شده است. این ضریب شاخصی از وزن مولکولی، اندازه و شکل فضایی این مولکول هاست (۲۰، ۲۹ و ۳۰). به طور کلی با افزایش وزن و اندازه مولکول، مقدار s-value افزایش می یابد (۳۰ و ۳۲). با مقایسه s-value نشاسته فرایند شده با حالت فرایند نشده آن می توان به تغییرات مولکولی نشاسته در طی فرایند پی برد (۱۷ و ۲۷). یکی از مزایای این روش نسبت به سایر روش های مولکولی متداول، عدم نیاز آن به کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای خاص است (۳۰ و ۳۲). به علاوه نیازی به جداسازی مقدماتی آمیلوز و آمیلوپکتین نیز نمی باشد که این مرحله خود یک مرحله دشوار در سایر روش هاست (۲۰ و ۲۷). البته در این روش نیز نظیر سایر روش های مولکولی، نشاسته می بایست در حلال مناسبی کاملاً حل گردد، زیرا در غیر این صورت به دلیل وجود



شکل ۱. نمودار دما - زمان نمونه‌های نشاسته گندم اتوکلاو شده در دامنه دمای ۱۰۰-۱۳۰ °C و فشار ۱۵psi

توسط نمونه (t) و حلال DMSO ۹۰٪ (t₀) محاسبه گردید. نسبت این دو زمان ویسکوزیته نسبی نمونه‌ها (V_{rel}) را نشان می‌دهد (۲۱).

$$V_{rel} \approx \frac{t}{t_0} \quad [1]$$

اندازه‌گیری s-value

به این منظور از دستگاه AUC مدل XL-I ساخت شرکت Beckman Palo Alto (آمریکا) استفاده شد. این دستگاه دارای مخزن نمونه (Centrifuge cell) مخصوصی است که خود از دو محفظه (Chamber) تشکیل شده است. در یکی از محفظه‌ها ۳۸۰ میکرولیتر از محلول حاوی نمونه و در دیگری ۴۰۰ میکرولیتر حلال (DMSO ۹۰٪) تزریق گردید. پس از قرار دادن مخزن نمونه (به‌طور هم‌زمان سه مخزن قابل استفاده است) در داخل رتور دستگاه (An 60 Ti)، آزمایش در دمای ۲۰ °C در سرعت ۳۵۰۰۰ rpm انجام شد. حرکت مولکول‌ها به انتهای محفظه به صورت موجی متحرک توسط سیستم نوری UV ریلائی (Rayleigh) هر ۳۰ ثانیه یک‌بار عکس‌برداری شد و این کار تا زمانی که هردو مولکول آمیلوز و آمیلوپکتین کاملاً ته‌نشین شدند و دستگاه دیگر موج حرکتی را نشان نداد ادامه یافت که در مجموع حدود هفت ساعت به طول انجامید. سپس برنامه کامپیوتری DCDT⁺ تصاویر گرفته شده را به منحنی‌هایی

بعد به مدت پنج دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ × g سانتریفیوژ شد. سپس میزان کربوهیدرات مایع فوقانی هر لوله با استفاده از روش فنول-اسید سولفوریک تعیین گردید (۱۲). میزان قند موجود در مایع فوقانی نسبت به وزن کل نشاسته اولیه (۳/۵ گرم) با احتساب رقت نمونه‌ها با آب، درصد حلالیت نشاسته در آب را مشخص می‌کند. بقیه مایع فوقانی به عنوان نمونه محلول برای آزمایش‌های مولکولی با استفاده از خشک‌کن تصعیدی خشک گردید و در دمای ۲۰ °C در ظروف غیر قابل نفوذ به رطوبت نگه‌داری شد.

تهیه نمونه‌ها جهت انجام مطالعات مولکولی

از نمونه‌های خشک شده مرحله قبل محلول‌هایی با غلظت ۸ mg/ml در حلال DMSO ۹۰٪ در آب مقطر تهیه شد. این کار با حرارت دادن نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه و هم زدن مداوم آنها انجام گردید (۲۷) و جهت انجام مطالعات مولکولی روش‌های زیر به کار گرفته شد.

اندازه‌گیری ویسکوزیته نسبی

ویسکوزیته نسبی نمونه‌ها که شاخصی از وضعیت مولکولی از لحاظ اندازه و شکل در محلول است توسط روش ویسکومتری U-tube در دمای ۲۰ ± ۰/۱ °C اندازه‌گیری شد (۱۱ و ۱۸). به این منظور زمان‌های لازم جهت طی مسافت معینی در U-tube

تورک (torque) و سرعت پیچ توسط نرم افزار متصل به دستگاه محاسبه و ثبت گردید.

اندازه‌گیری شاخص انبساط حجمی (SEI) و دانسیته نمونه‌های اکستروژن شده

مقدار شاخص انبساط حجمی (SEI) و دانسیته نمونه‌ها (ρ_e) به ترتیب با استفاده از فرمول‌های ۳ و ۴ محاسبه شدند (۱۴ و ۱۸)

$$SEI = \left(\frac{D}{D_0} \right)^3 \quad [3]$$

در فرمول ۳، D_0 قطر داخلی لوله اکستروژن (۳ mm) و D میانگین قطر حداقل ۲۰ تکرار هر نمونه است.

$$\rho_e = \frac{4M}{\pi D^2 L} \quad [4]$$

D ، M و L به ترتیب قطر، جرم و طول میانگین هر نمونه است (میانگین حداقل ۲۰ بار اندازه‌گیری).

مطالعه شکل و ظاهر اجزای نمونه‌های اکستروژن شده توسط میکروسکپ نوری و بررسی امکان وجود گرانول‌های نشاسته در آنها

در این روش ابتدا نمونه‌های پودر شده در ایزوپروپیل الکل (IPA) معلق شدند و سپس توسط میکروسکپ نوری مجهز به نور پولاریزه (Polarized light) مورد مطالعه قرار گرفتند. گرانول‌های سالم نشاسته در زیر نور پولاریزه میکروسکپ به صورت رنگین کمانی قابل تشخیص می‌باشند، درحالی‌که گرانول‌های آسیب دیده در اثر فرایند چنین شکلی ندارند.

بررسی حالت کریستالی نشاسته نمونه‌های اکستروژن شده

در این آزمایش پودر نمونه‌های اکستروژن شده با استفاده از محلول نمک فوق اشباع NaCl در یک محفظه کاملاً بسته در دمای 23°C به رطوبت نسبی ۷۵٪ رسید و سپس با استفاده از دستگاه X-ray diffractometer (انگلستان) Bruker Analytical X-Ray System مورد مطالعه قرار گرفتند (۳۳).

از تغییرات لحظه‌ای غلظت ($\frac{dc}{dt} = g(s^*)$) در برابر s-value تبدیل کرد. نقطه اوج این منحنی‌ها مقدار متوسط s-value می‌باشد که با واحد سوئد برگ (Svedberge) که به اختصار S نشان داده می‌شود گزارش می‌گردد (۲۹، ۳۰ و ۳۲). مقدار s-value به خصوصیات حلال از لحاظ درجه حرارت، ویسکوزیته و دانسیته بستگی دارد (۳۰، ۳۲) که در این تحقیق s-value در شرایط آزمایش (دمای 20°C و حلال یکسان DMSO ۹۰٪) محاسبه شده است.

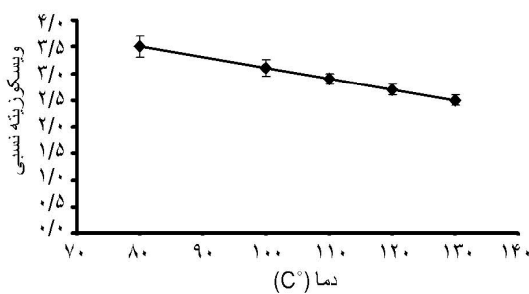
ب) فرایند اکستروژن

آرد گندم نرم که از شرکت Bakery Choice (انگلیس) تهیه شد برای انجام فرایند اکستروژن به کار رفت. در این نمونه درصد نشاسته با روش آنزیمی و با استفاده از کیت شرکت مگازایم (Megazyme) ۷۰/۴٪ تعیین شد (۱۵). فرایند اکستروژن با استفاده از یک اکستروژنر ساخت شرکت Cleextral BC-21- Firming (فرانسه) که به صورت دو ماریپیچ هم جهت با طول ۴۰۰ میلی‌متر بود انجام شد. میزان ورود مواد جامد 12 kg/h و میزان آب برای تهیه هر نمونه به ترتیب صفر و ۰/۳۵، ۰/۷۵، ۱/۲۵ و $1/78 \text{ kg/h}$ انتخاب شد. کلیه شرایط اکستروژن ثابت بوده و تنها تغییرات در میزان آب به عنوان عامل تغییر شرایط آزمایش به کار رفت. پس از ثابت شدن شرایط، نمونه‌ها به صورت نوارهای پف کرده از دستگاه خارج شدند. نمونه‌های تولید شده بر اساس کاهش مقدار آب مصرفی در تهیه آنها به ترتیب به صورت WE1 تا WE5 نام‌گذاری شدند.

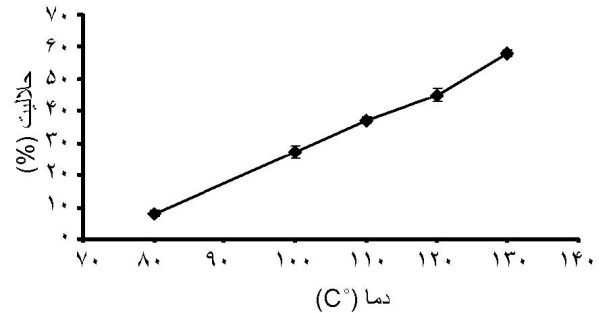
رطوبت نمونه‌ها پس از خروج از دستگاه بلافاصله به روش خشک کردن در آون 105°C اندازه‌گیری شد. هم‌چنین مقداری از هر نمونه در دمای 60°C به مدت ۳۰ دقیقه خشک شد و سپس آسیاب و با الک با اندازه مش ۲۱۲-۱۲۵ میکرومتر الک گردید.

مقدار انرژی مکانیکی ویژه (SME) که میزان انرژی لازم جهت انتقال مواد در حین اکستروژن را نشان می‌دهد با استفاده از فرمول ۲ محاسبه گردید (۱۸ و ۲۲):

$$SME = \frac{\text{rpm} \times \text{تعداد پیچها} \times 2 \times \pi \times \text{تورک (N.m)}}{\text{مقدار ورودی مواد جامد} \times 60} \quad [2]$$



شکل ۳. ویسکوزیته نسبی نمونه‌های نشاسته گندم اتوکلاو شده در دماهای مختلف



شکل ۲. میزان حلالیت در آب نمونه‌های نشاسته گندم اتوکلاو شده در دماهای مختلف

آنالیز آماری

وجود اختلاف معنی دار میان میانگین نمونه‌ها (حد اقل سه تکرار) به کمک روش آماری آنالیز مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ با استفاده از نرم افزار Design Expert 6 بررسی شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری حلالیت نمونه‌های اتوکلاو شده

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری حلالیت نمونه‌ها (شکل ۲) نشان می‌دهد که با افزایش دمای اتوکلاو حلالیت نشاسته به طور معنی داری افزایش یافت. این افزایش حلالیت می‌تواند به سه دلیل عمده باشد: اولاً حرارت دادن می‌تواند باعث شکسته شدن بعضی از اتصالات بین مولکولی مانند اتصالات هیدروژنی شده و در نتیجه باعث افزایش حلالیت شود. ثانیاً افزایش دما قدرت حلال را برای حل نمودن نمونه‌ها بالایی‌برد و در نتیجه مواد بیشتری به صورت محلول در آمده و حلالیت بالا می‌رود. ثالثاً افزایش دما می‌تواند باعث تجزیه مولکولی شود که مولکول‌های کوچک‌تر پدید آمده حلالیت بالاتری دارند (۸ و ۱۳).

مطالعات مولکولی نمونه‌های اتوکلاو شده

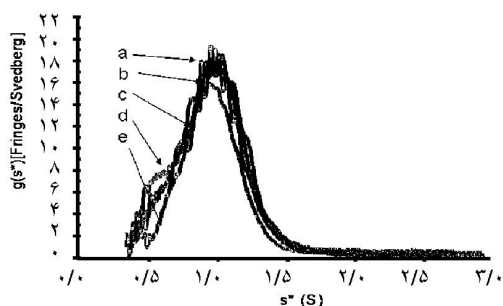
نتایج آزمایش اندازه‌گیری ویسکوزیته نسبی نمونه‌ها (شکل ۳) نشان می‌دهد که با افزایش درجه حرارت، ویسکوزیته نسبی نمونه‌ها به طور معنی داری کاهش می‌یابد.

اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌های اکستروود شده

جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌ها از دستگاه Rapid Visco Analyser (RVA) ساخت شرکت Newport Scientific Pty. Ltd (استرالیا) استفاده شد. دما، زمان و سرعت هم زدن به کمک نرم افزار طراحی شده در دستگاه قابل تنظیم می‌باشد. در این آزمایش ابتدا ۴ گرم از پودر نمونه‌های اکستروود شده و ۲۵ گرم آب مقطر در درون ظروف آلومینیومی مخصوص دستگاه وزن شدند و سپس با سرعت ۹۶۰ rpm به مدت شش دقیقه در دمای ۲۵°C مخلوط شدند. در صورتی که ویسکوزیته‌ای در این مرحله دیده شود به آن ویسکوزیته آب سرد گویند. سپس نمونه‌ها با افزایش دمای ثابت ۱۸°C/min تا دمای ۹۵°C حرارت داده شده و در این دما به مدت ۶/۵ دقیقه نگه‌داری شدند. در این حالت ویسکوزیته اوج (Peak viscosity) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها تا دمای ۲۵°C با سرعت ثابت ۱۸°C در دقیقه سرد شدند و ۹ دقیقه در این حالت نگه‌داشته شدند. در این مرحله ویسکوزیته نهایی (Final viscosity) اندازه‌گیری شد (۳ و ۲۷).

مطالعات مولکولی روی نشاسته نمونه‌های اکستروود شده

جهت انجام مطالعات مولکولی از روش AUC استفاده گردید و نمونه‌ها با غلظت ۸ mg/ml در ۹۰٪ DMSO تهیه شدند (۲۷) و با سرعت ۳۵۰۰۰ rpm در دمای ۲۰°C به مدت هفت ساعت در دستگاه AUC مورد آزمایش قرار گرفتند که در طی این زمان آمیلوز و آمیلوپکتین ته‌نشین شده و s-value آنها در شرایط آزمایش تعیین گردید.



شکل ۵. نمودار ته‌نشین شدن آمیلوز نمونه‌های اتوکلاو شده در دماهای مختلف به دست آمده با دستگاه AUC. نمونه a، نمونه شاهد (حرارت دیده تا دمای 80°C) و نمونه‌های b تا e به ترتیب مربوط به نمونه‌های اتوکلاو شده در دماهای 100°C – 130°C می‌باشند.

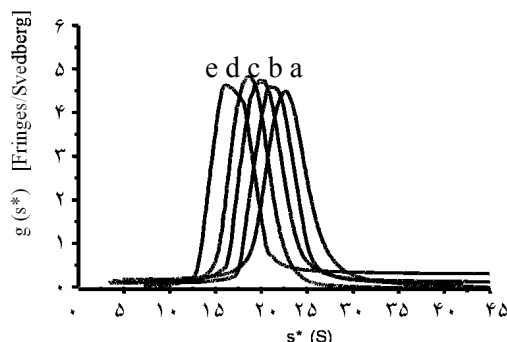
می‌باشد که خود اثباتی بر تجزیه این ماده با افزایش درجه حرارت است.

مقایسه ضریب ته‌نشین شدن آمیلوز اتوکلاو شده نسبت به آمیلوز شاهد (حرارت دیده در دمای 80°C) تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (شکل ۵). این امر می‌تواند دلیلی بر عدم تأثیر حرارت بر مولکول آمیلوز باشد که در اثر این فرایند ساختار آمیلوز دست نخورده باقی می‌ماند.

بررسی تأثیر فرایند اکستروژن بر نشاسته گندم

رطوبت نمونه‌ها قبل از خروج از دستگاه (رطوبت اولیه + میزان آب مصرفی جهت تهیه آنها) و نیز SME مورد نیاز برای هر نمونه محاسبه شدند. شکل ۶ تغییرات SME نسبت به رطوبت داخل دستگاه را نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش رطوبت، مقدار SME به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این امر به دلیل کاهش ویسکوزیته مواد داخل اکسترودر با افزایش مقدار آب می‌باشد که در اثر آن انرژی لازم جهت حرکت مواد به انتهای لوله اکسترودر کاهش می‌یابد (۱۴ و ۱۸).

اندازه‌گیری شاخص انبساط حجمی محصول و دانسیته نمونه‌ها
در هنگام خروج از اکسترودر نمونه‌ها به صورت پف کرده در آمدند. از لحاظ شکل ظاهری با کاهش مقدار آب مصرفی،



شکل ۴. نمودار ته‌نشین شدن آمیلوپکتین نمونه‌های اتوکلاو شده در دماهای مختلف به دست آمده با دستگاه AUC. نمونه a، نمونه شاهد (حرارت دیده تا دمای 80°C) و نمونه‌های b تا e به ترتیب مربوط به نمونه‌های اتوکلاو شده در دماهای 100°C – 130°C می‌باشند.

کاهش ویسکوزیته نسبی می‌تواند به دلیل تجزیه مولکول‌های نشاسته باشد (۲۱). اگرچه با انجام این آزمایش نمی‌توان مشخص کرد که کدام یک از مولکول‌های نشاسته دچار تجزیه شده‌اند. کاهش ویسکوزیته می‌تواند به دلیل متقارن شدن مولکول‌ها از لحاظ شکل فضایی نیز باشد. مثلاً تنها چند شکستگی در اتصالات مولکول آمیلوپکتین می‌تواند شکل آن را تا حدودی متقارن کرده و در نتیجه ویسکوزیته نسبی را کاهش دهد. در صورتی که همین تعداد شکستگی در مولکول متقارن آمیلوز ممکن است تأثیر چندانی در ویسکوزیته نسبی آن نگذارد (۲۱). بنابراین برای دریافت اطلاعات دقیق‌تر از روش مولکولی AUC استفاده شد.

تعیین s-value مولکول‌های نشاسته اتوکلاو شده با روش AUC

نمودارهای ته‌نشین شدن آمیلوپکتین و آمیلوز به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. در این اشکال مقدار میانگین s-value مربوط به نقطه اوج هر منحنی روی محور x محاسبه می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که ضریب ته‌نشین شدن آمیلوپکتین برای نمونه‌های اتوکلاو شده در دمای 100°C تا 130°C درجه سانتی‌گراد نسبت به نمونه شاهد (نمونه به دست آمده در دمای 80°C) به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۴). کاهش در این مقدار به معنای کاهش در وزن مولکولی و اندازه آمیلوپکتین

یافته خمیر در محل دیواره حباب‌های هوا جداسازی شده بودند. همان‌طور که در تصاویر مشخص است با افزایش SME تعداد اجزای دیسکی شکل افزایش می‌یابد، درحالی‌که تعداد اجزای کروی کاهش می‌یابد. این امر به دلیل افزایش تشکیل حباب‌های هوا در نمونه‌ها و کاهش فواصل بین مولکولی در اثر افزایش SME است. نظیر چنین نتایجی نیز توسط بکر برای نشاسته ذرت اکستروژن شده گزارش شده است (۳). عدم وجود گرانول‌های رنگین کمائی نشاسته در زیر میکروسکپ نشان می‌دهد که تمامی گرانول‌ها در اثر فشار و دمای بالا در طی فرایند اکستروژن کاملاً تخریب و ژلاتینه شده‌اند. نظیر چنین مشاهداتی توسط گای و هورن برای آرد گندم اکستروژن شده گزارش شده است (۱۸).

مطالعه خواص کریستالی مولکول‌ها

با استفاده از دستگاه X-ray انکساری، الگوی کریستالی نمونه‌ها به دست آمد (شکل ۱۰). نشاسته غلات در حالت طبیعی الگوی کریستالی به نام نوع A را از خود نشان می‌دهند (۳۳). این الگو در نمونه آرد معمولی گندم مشاهده می‌شود. با انجام فرایند اکستروژن و افزایش SME این الگو به طور کامل از بین رفته و الگوهای V و E دیده می‌شوند. الگوی V که برای نمونه‌های WE1 و WE2 دیده شد، نشان دهنده ایجاد ترکیب آمیلوز با لیپید آرد است (۳ و ۱۵). الگوی E یا الگوی اکستروژن برای نمونه‌های WE3 تا WE5 دیده شد و این شکل نیز نشان دهنده ایجاد کریستال آمیلوز-لیپید در طی فرایند است. این الگو شباهت بسیاری با الگوی V دارد، با این تفاوت که فاصله بین پیچ‌های کریستال‌ها کمی متفاوت است (۳۳).

اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌ها توسط دستگاه RVA

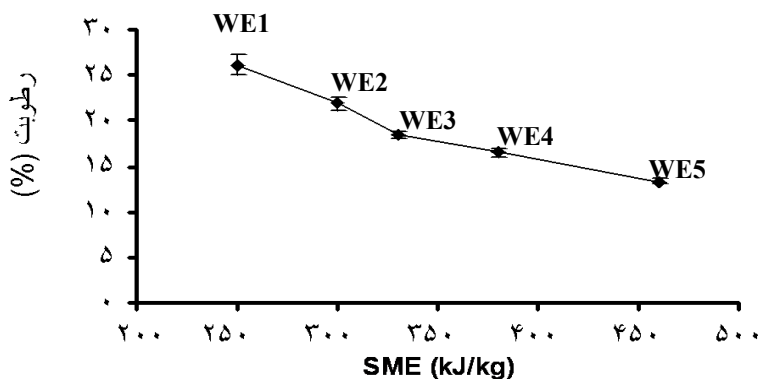
نتایج اندازه‌گیری ویسکوزیته توسط دستگاه RVA (شکل ۱۱) نشان داد که تمامی نمونه‌های اکستروژن شده دارای ویسکوزیته آب سرد (در دمای 25°C) می‌باشند، در حالی نمونه شاهد (آرد گندم) در دمای 25°C ویسکوزیته‌ای از خود نشان نمی‌دهد.

میزان پف‌کردگی آنها بیشتر گردید، به طوری که نمونه فاقد آب، بیشترین پف‌کردگی و تخلخل را داشت. با اندازه‌گیری انبساط حجمی و دانسیته نمونه‌ها در مقایسه با SME (شکل ۷ و ۸) معلوم گردید که افزایش SME با افزایش معنی‌دار انبساط عرضی و کاهش دانسیته نمونه‌ها همراه است. بر اساس نظریه‌ای که توسط فان و همکارانش ارائه شد (۱۴)، در حین اکستروژن فشار بالایی در دستگاه به وجود می‌آید که نتیجه حرکت ماریچ‌ها و حرارت بالای دستگاه است. در هنگام خروج نمونه‌ها از دستگاه، فشار به طور ناگهانی کاهش می‌یابد و در نتیجه آب موجود در آنها بلافاصله تبخیر می‌گردد و نمونه‌ها منبسط می‌گردند. در اثر خروج بخار آب از نمونه‌ها حباب‌های هوا در داخل محصول شکل می‌گیرد. در مورد نمونه‌های با رطوبت بالا این نمونه‌ها دارای بافت نرم‌تری هستند و لذا انبساط بیشتری می‌یابند. هرچند پس از انبساط و خروج بخار آب به علت ویسکوزیته پایین و نرمی بافت، این نمونه‌ها بلافاصله چروکیده می‌گردد و حجم نهایی کاهش می‌یابد. در نمونه‌های با رطوبت کم نیز افزایش حجم در اثر خروج آب دیده می‌شود. در این نمونه‌ها به علت ویسکوزیته بالاتر و بافت محکمتر محصول کمتر چروکیده شد. لذا حجم نهایی بیشتری نسبت به نمونه‌های با آب بالا پیدا می‌کند، ضمن آن‌که تخلخل بالای این نمونه‌ها باعث کاهش دانسیته آنها می‌گردد.

مطالعه شکل ظاهری اجزای نمونه‌ها و بررسی وجود

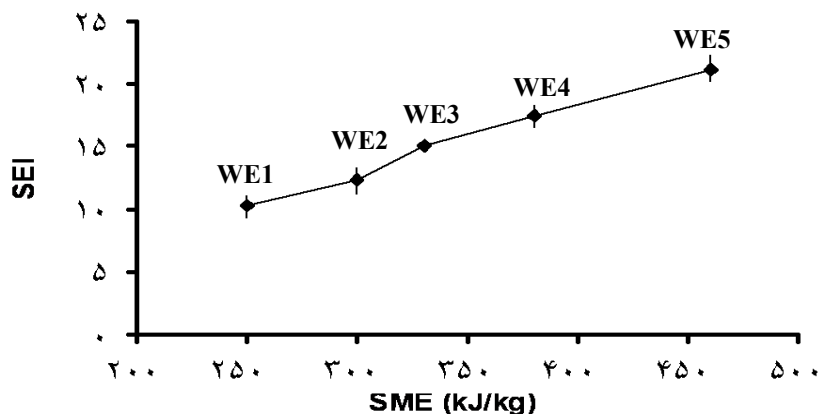
گرانول‌های نشاسته با استفاده از میکروسکپ نوری

با مشاهده ذرات اکستروژن شده پس از آسیاب شدن در زیر میکروسکپ نوری، تغییراتی در ظاهر و شکل این ذرات دیده شد (شکل ۹). ظاهر ذرات از لحاظ ضخامت و شکل به دو دسته عمده قابل تقسیم می‌باشد، یکی اجزای تقریباً کروی نامتقارن که از قسمت‌هایی به نام مناطقی اتصال (Junction zones) جداسازی شده بودند (اشکال WE1 تا WE3) و دیگری اجزای دیسک‌شکلی که ساختار ظریف و شیشه‌ای داشتند (اشکال WE4 و WE5). این اجزا از قسمت‌های انبساط



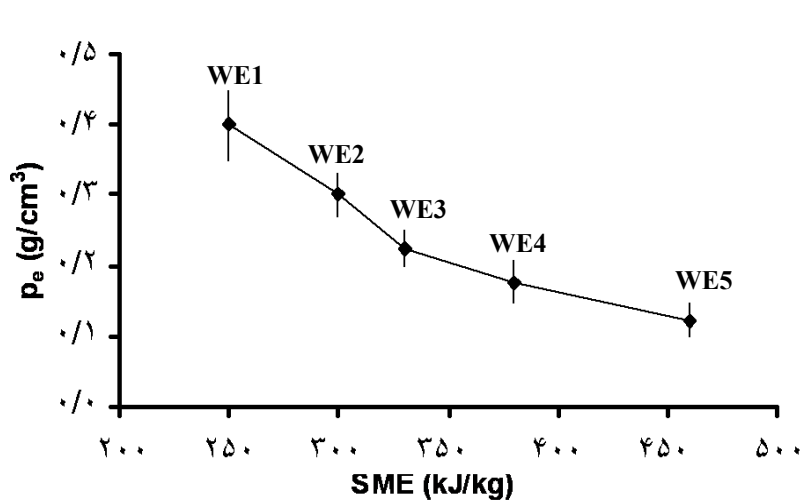
WE1 = نمونه تهیه شده با ۱/۷۸ (kg/h) آب
 WE2 = نمونه تهیه شده با ۱/۲۵ (kg/h) آب
 WE3 = نمونه تهیه شده با ۰/۷۵ (kg/h) آب
 WE4 = نمونه تهیه شده با ۰/۳۵ (kg/h) آب
 WE5 = نمونه تهیه شده بدون آب

شکل ۶. تغییرات SME با میزان آب مصرفی جهت تهیه نمونه‌های نشاسته گندم در اکسترودر



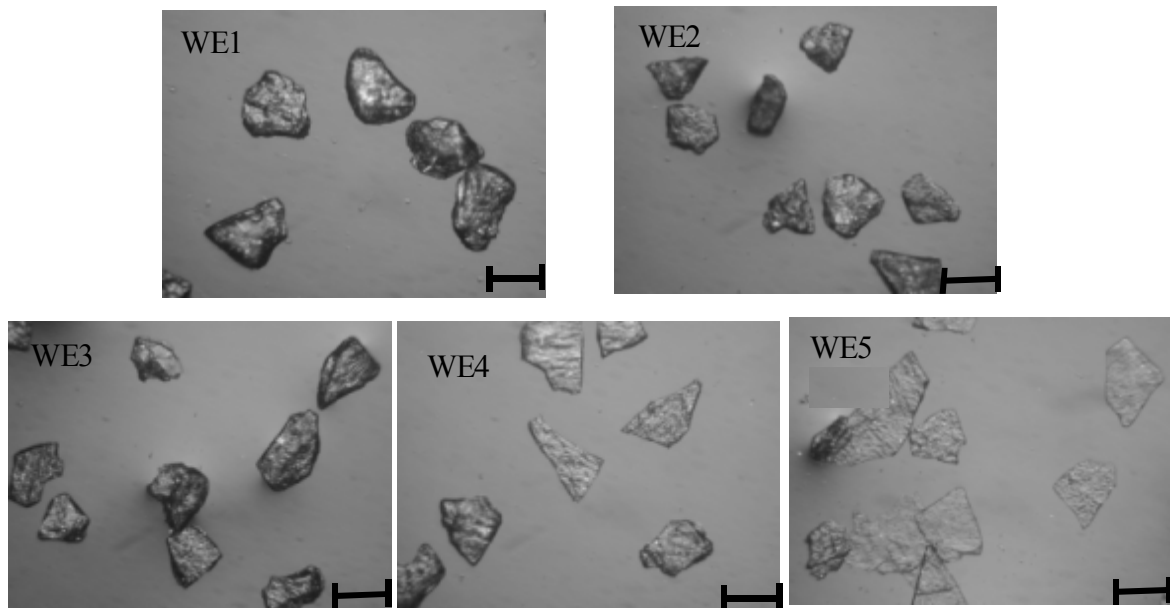
WE1 = نمونه تهیه شده با ۱/۷۸ (kg/h) آب
 WE2 = نمونه تهیه شده با ۱/۲۵ (kg/h) آب
 WE3 = نمونه تهیه شده با ۰/۷۵ (kg/h) آب
 WE4 = نمونه تهیه شده با ۰/۳۵ (kg/h) آب
 WE5 = نمونه تهیه شده بدون آب

شکل ۷. تغییرات انبساط حجمی نمونه‌های اکسترودر شده نشاسته گندم در SME‌های مختلف

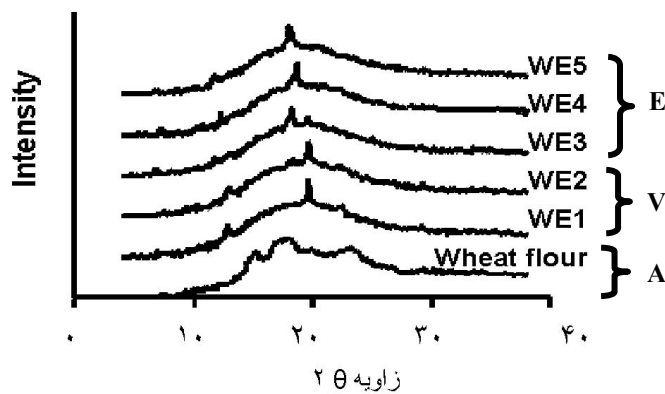


WE1 = نمونه تهیه شده با ۱/۷۸ (kg/h) آب
 WE2 = نمونه تهیه شده با ۱/۲۵ (kg/h) آب
 WE3 = نمونه تهیه شده با ۰/۷۵ (kg/h) آب
 WE4 = نمونه تهیه شده با ۰/۳۵ (kg/h) آب
 WE5 = نمونه تهیه شده بدون آب

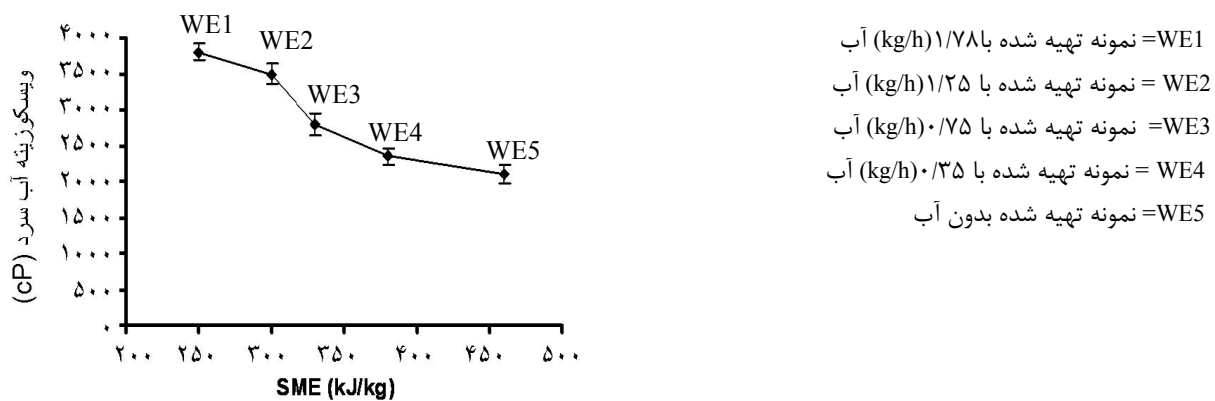
شکل ۸. تغییرات دانسیته نمونه‌های اکسترودر شده نشاسته گندم در SME‌های مختلف



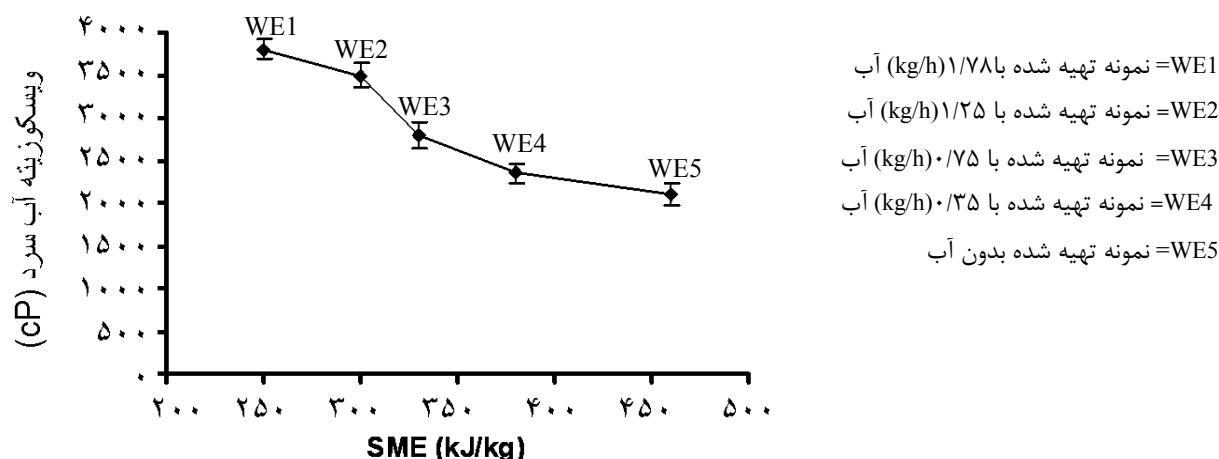
شکل ۹. میکروگراف نمونه‌های اکستروژن شده نشاسته گندم با SME های متفاوت (خط زیر هر شکل ۱۰۰ μm است). WE1 = نمونه تهیه شده با ۱/۷۸ (kg/h) آب، WE2 = نمونه تهیه شده با ۱/۲۵ (kg/h) آب، WE3 = نمونه تهیه شده با ۰/۷۵ (kg/h) آب، WE4 = نمونه تهیه شده با ۰/۳۵ (kg/h) آب و WE5 = نمونه تهیه شده بدون آب.



شکل ۱۰. الگوی X-ray انکساری نمونه‌های اکستروژن شده نشاسته گندم با SME های متفاوت WE1 (تا WE5) در مقایسه با آرد گندم



شکل ۱۱. نمودار ویسکوزیته آب سرد (در دمای ۲۵ °C) به دست آمده از دستگاه RVA نمونه‌های اکستروژن شده با SME های متفاوت



شکل ۱۲. نمودار ویسکوزیته نهایی نمونه‌های اکستروژ شده نشاسته گندم (پس از سرد شدن خمیر در دستگاه RVA تا دمای ۲۵°C با SMEهای متفاوت)

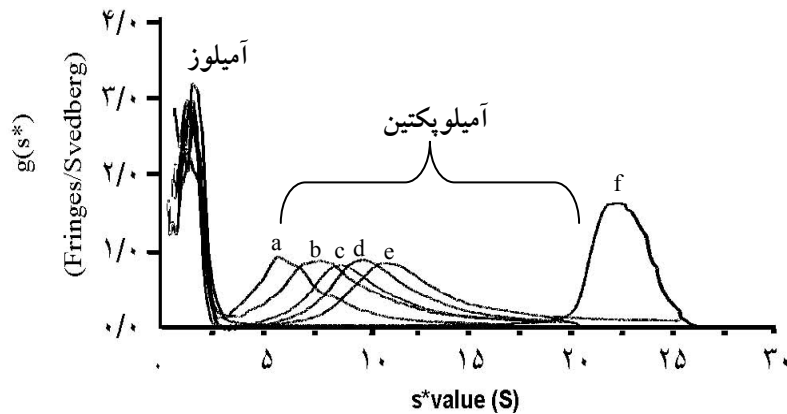
ویسکوزیته نمونه‌ها کاهش می‌یابد.

در انتهای کار دستگاه RVA وقتی که نمونه‌ها پس از طی مراحل حرارتی از دمای ۹۵°C تا رسیدن به دمای محیط (۲۵°C) سرد شدند، نمونه شاهد ویسکوزیته بالایی ایجاد کرد (حدود 6000 cP)، در حالی که نمونه‌های اکستروژ شده ویسکوزیته بسیار کمتری ایجاد کردند (شکل ۱۲). در مورد نمونه شاهد این امر کاملاً روشن شده است که نشاسته حرارت دیده در محیط آبی با کاهش دما ایجاد ژل می‌کند و لذا ویسکوزیته افزایش می‌یابد. در مورد نمونه‌های اکستروژ شده به دلیل امکان تجزیه مولکول‌های نشاسته بر اثر فرایند اکستروژن، با کاهش دما ویسکوزیته به میزان بسیار کمتری نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد با افزایش SME ویسکوزیته کاهش بیشتری می‌یابد که این امر تأییدی بر افزایش تجزیه مولکول‌های نشاسته با افزایش SME و در نتیجه کاهش قدرت نگهداری آب توسط آنها می‌باشد.

مطالعه خواص مولکولی نمونه‌ها

نمودار ته‌نشین شدن آمیلوز و آمیلوپکتین نمونه‌های اکستروژ شده در مقایسه با نمونه شاهد (آرد معمولی) در شکل ۱۳ داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقدار s-value آمیلو پکتین نمونه‌های

این امر به این دلیل است که نمونه‌های اکستروژ شده به دلیل آن‌که بخشی از آنها ژلاتینه شده‌اند، بنابراین حتی در آب سرد هم می‌توانند ویسکوزیته داشته باشند، حال آن‌که آرد شاهد قدرت جذب آب در دمای پایین را نداشته و با افزایش دما است که به تدریج آب جذب کرده به طوری که پس از رسیدن دمای دستگاه به ۹۵°C، بیشترین ویسکوزیته (ویسکوزیته اوج) را ایجاد می‌کند. افزایش ویسکوزیته در اثر افزایش حرارت عمدتاً مربوط به جذب آب توسط نشاسته و ژلاتینه شدن آن می‌باشد. نشاسته گندم به‌طور معمول در دمای حدود ۶۵-۷۰°C شروع به ژلاتینه شدن می‌کند. در حالی که در نشاسته فرایند شده دمای ژلاتینه شدن تغییر یافته و در نتیجه افزایش ویسکوزیته متفاوتی نسبت به حالت طبیعی آن دارد. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱۱) نمونه‌های اکستروژ شده می‌توانند در دمای پایین (۲۵°C) ایجاد ژل کنند و بیشترین ویسکوزیته آنها در این دما دیده می‌شود. این امر می‌تواند به دلیل تخریب ساختار گرانول‌های نشاسته در اثر فرایند اکستروژن باشد که به دنبال آن مولکول‌های نشاسته از گرانول‌های شکسته شده آزاد گشته و می‌توانند به راحتی و بدون هیچ نیازی به افزایش دما آب جذب کرده و ویسکوزیته را افزایش دهند. با افزایش SME احتمال تجزیه مولکول‌های نشاسته وجود دارد و چنین مولکول‌هایی قدرت جذب آب کمتری دارند و به همین دلیل با افزایش SME



شکل ۱۳. نمودار ته‌نشین شدن آمیروز و آمیلوپکتین اکستروید شده نشاسته گندم با SMEهای متفاوت. حروف e تا a به ترتیب مربوط به نمونه‌های اکستروید شده WE1 تا WE5 می‌باشد و نمونه f شاهد (آرد گندم) است

خواص فیزیکی نمونه‌ها نظیر کاهش بیشتر ویسکوزیته آب سرد نمونه‌ها و افزایش انبساط حجمی آنها با افزایش SME نقش دارد. این تحقیق هم‌چنین نشان داد که آمیلوپکتین به دلیل دارا بودن ساختار بزرگ و پرشاخه نسبت به فرایندهای حرارتی، فشار و تنش بالا حساسیت بیشتری نسبت به آمیروز دارد. تأثیر فرایند اکستروژن بر نشاسته شدیدتر از اتوکلاو می‌باشد. ساختار آمیلوپکتین و شکستگی آن در طی فرایند می‌تواند عامل کلیدی در توضیح بسیاری از خصوصیات فیزیکی محصولات نهایی باشد که این امر خود تأکیدی بر لزوم انجام تحقیقات مولکولی برای فهم بهتر خواص عملکردی محصولات است.

سپاسگزاری

از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق سهیم بوده‌اند خصوصاً "پروفسور Stephen E. Harding و دکتر Sandra E. Hill که اساتید راهنمای این تحقیق در دانشگاه ناتینگهام انگلستان بوده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

اکستروید شده نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری دارد و با افزایش SME این مقدار کاهش بیشتری می‌یابد. کاهش در s-value می‌تواند دلیلی بر تجزیه مولکول آمیلوپکتین باشد. تحت همین شرایط s-value آمیروز با نمونه شاهد یکی بوده و با افزایش SME تغییری در این مقدار مشاهده نمی‌شود. این امر نشان دهنده پایداری ساختار آمیروز در طی فرایند اکستروژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در طی فرایندهای اتوکلاو امکان تجزیه و شکستگی مولکول‌های نشاسته خصوصاً "آمیلوپکتین وجود دارد. خواصی نظیر افزایش حلالیت و کاهش ویسکوزیته نمونه‌ها می‌تواند به دلیل شکستگی این مولکول باشد.

در فرایند اکستروژن به دلیل وجود دما و فشار بالا مولکول‌های نشاسته دچار تغییراتی می‌گردند. این تغییرات شامل شکستگی مولکول آمیلوپکتین و ایجاد کمپلکس آمیروز-لیپید می‌باشد که از لحاظ مولکولی ساختار کریستالی دارد و لذا حلالیت کمتری نسبت به آمیروز معمولی دارد. شکستگی آمیلوپکتین در توجیه بسیاری از

منابع مورد استفاده

1. Aberle, T., W. Burchard, W. Vorwerg and S. Radosta. 1994. Conformational contributions of amylose and amylopectin to the structural-properties of starches from various sources. *Starch- Stärke* 46: 329-33.
2. Banks, W., R. Geddes, C.T. Greenwood and I.G. Jones. 1972. Physicochemical studies on starches. *Starch-Stärke* 8: 245-280.
3. Becker, A. 2001. Starch conversion and particle properties determining, the rapid visco analyser (RVA) profile. Ph.D. Thesis, The University of Nottingham, Nottingham, UK.

4. Brümmer, T., F. Meuser, B. van Lengerich and C. Niemann. 2002. Effect of extrusion cooking on molecular parameters of corn starch. *Starch-Stärke* 54: 1-8.
5. Bowen, S.E., D.A. Gray, C. Giraud, M. Majzoobi, C.E. Millan Testa, L.A. Bello Pérez and S.E. Hill. 2006. Lipid oxidation and amylopectin molecular weight changes occurring during storage of extruded starch samples. *J. Cereal Sci.* 43: 275-283.
6. Buléon, A., P. Colonna, V. Planchot and S. Ball. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromole.* 23: 85-112.
7. Cai, W., L.L. Diosady and L.J. Rubin. 1995. Degradation of wheat starch in a twin-screw extruder. *J. Food Eng.* 26: 289-300.
8. Colonna, P., J.L. Doublier, J.P. Melcion, F. Demonredon and C. Mercier. 1984. Extrusion cooking and drum drying of wheat starch .1. Physical and macromolecular modifications. *Cereal Chem.* 61: 538-543.
9. Davis, E.A. 1994. Wheat starch. *Cereal Food World* 39: 34-36.
10. Dintzis, F.R., M.A. Berhow, E. B. Bagley, Y.V. Wu and F.C. Felker. 1996. Shear-thickening behavior and shear-induced structure in gently solubilized starches. *Cereal Chem.* 73: 638-643.
11. Durrani, C.M. and A.M. Donald. 2000. Shape, molecular weight distribution and viscosity of amylopectin in dilute solution. *Carbohydr. Polym.* 41: 207-217.
12. Dubois, M., K.K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
13. Eliasson, A.C. 1980. Effect of water content on the gelatinisation of wheat starch. *Starch-Stärke* 32: 270-272.
14. Fan, J. 1994. Bubble growth and starch conversion in extruded and baked cereal systems. Ph.D. Thesis, The University of Nottingham, Nottingham, UK.
15. Gibson, T.S., V.A. Solah and B.V. McCleary. 1997. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *J. Cereal Sci.* 25: 111-119.
16. Faubion, J.M. and R.C. Hosney. 1982. High-temperature short-time extrusion cooking of wheat starch and flour. *Cereal Chem.* 59: 529-533.
17. Fronimos, P. 1990. Physico-chemical properties of two important food polysaccharides. Ph.D. Thesis: The University of Leicester.
18. Guy, R.C.E. and A.W. Horne. 1988. Extrusion and co-extrusion of cereals. PP. 65-100. *In: J.M.V. Blanshard and J.R. Mitchell. (Eds.), Food Structure-Its Creation and Evaluation. Butterworths. London, UK.*
19. Han, J.-A., J.N. BeMiller, B.R. Hamaker and S. T. Lim. 2003. Structural changes of debranched corn starch by aqueous heating and stirring. *Cereal Chem.* 80: 323-328.
20. Harding, S. E. 1992. Sedimentation analysis of polysaccharides. PP. 80-100. *In: S.E. Harding, A.J. Rowe and J.C. Horton. (Eds.), Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. The Royal Society of Chemistry, Nottingham, UK.*
21. Harding, S.E. 1997. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Prog. Biophy. Mol. Bio.* 68: 207-262.
22. Harper, J.M. 1981. *Extrusion of Foods. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida, USA.*
23. Hizukuri, S. 1988. Recent advances in molecular structures of starch. *J. S. Starch Sci.* 35: 185-200.
24. Iwaki, K. and H. Fuwa. 1983. Fractionation of non-waxy rice starch by sucrose density gradient centrifugation. *J. S. Starch Sic.* 30: 264-269.
25. Kadan, R.S. and A.B. Pepperman. 2002. Physicochemical properties of starch in extruded rice flours. *Cereal Chem.* 79: 476-480.
26. Majzoobi, M., A.J. Rowe, M. Connock, S.E. Hill and S.E. Harding. 2003. Partial fractionation of wheat starch amylose and amylopectin using zonal ultracentrifugation. *Carbohydr. Polym.* 52: 269-274.
27. Majzoobi, M. 2004. Effect of processing on the molecular structure of wheat starch. Ph.D. Thesis, The University of Nottingham, Nottingham, UK.
28. Millard, M., F.R. Dintzis, J.L. Willett and J.A. Klavons. 1997. Light scattering molecular weights and intrinsic viscosity of processed waxy maize starches in 90% DMSO and H₂O. *Cereal Chem.* 74: 687-691.
29. Philo, J.S. 2000. A method for directly fitting the time derivative of sedimentation velocity data and an alternative algorithm for calculating sedimentation coefficient distribution functions. *Anal. Biochem.* 279: 151-163.
30. Ralston, G. 1993. *Introduction to Analytical Ultracentrifugation. Beckman Instruments Inc., California, USA.*
31. Vesterinen, E., T. Suortti and K. Autio. 2001. Effects of preparation temperature on gelation properties and molecular structure of high-amylose maize starch. *Cereal Chem.* 78: 442-446.
32. Van Holde, K.E., W.C. Johnson and K.H. Ho. 1998. *Principle of Physical Biochemistry. Prentice Hall Inc., New Jersey, USA.*
33. Zobel, H.F., S.N. Young and A. Rocca. 1988. Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chem.* 65: 443-446.