Stabilisierung von ungesättigten Glyceriden gegen Autoxidation durch molekulare Verkapselung mit Stärkederivaten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

> vorgelegt von Axel Lache aus Düsseldorf 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wulff
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2000

Die Dissertation ist elektronisch veröffentlicht unter der Adresse: http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2000/lache.html Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. G. Wulff in der Zeit von April 1997 bis Oktober 2000 am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Wulff für die Vergabe des interessanten und perspektivenreichen Themas sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die gemeinsame Zeit bedanken, die neben dem Laboralltag auch viele private Unternehmungen beinhaltete. Speziell meine Laborkollegen Dr. Andrea Biffis, Dr. Christoph Schunicht, Mark Wehner und Jochen Bitta haben zu einer angenehmen und humorvollen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Den Mitgleidern der "Stärkegruppe", insbesonders Dr. Marcus Guzmann und Dr. Olaf Höller danke ich für die wertvollen Anregungen und die gute Zusammenarbeit. Erwähnen möchte ich in diesem Zusammnhang außerdem Dr. Stefan Kubik, der die gesamte Rohfassung meiner Dissertation korrekturgelesen hat.

Herrn Dr. U. Matthiesen danke ich für die Anfertigung der zahlreichen Massenspektren.

Abschließend möchte ich mich bei den Firmen Nestlé (Lausanne, CH) und Eridania Beghín-Say (Vilvoorde, B) - speziell bei Herrn Dr. Bernd Kettlitz - für die Förderung der Arbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

2 Theoretischer Teil	15
2.1 Problemstellung	15
2.2 Reinigung der Ausgangsstoffe	18
2.3 Monoglycerid-Komplexe	26
2.4 Diglycerid-Komplexe	53
2.5 Triglycerid-Komplexe	73
2.6 DSC-Messungen	84
2.7 Rheologische Untersuchungen	92
2.8 Extrusions-Komplexe	100
3 Zusammenfassung	111
4 Experimenteller Teil	116
4.1 Apparatives	116
4.2 Chemikalien	117
4.3 Reinigung der Ausgangsstoffe	118
4.4 Synthesen	123
	105

4.5 Darstellung der Stärke-Glycerid-Komplexe1354.6 Analytik137

5 Literatur

147

Häufig verwendete Abkürzungen

AA:	Arachidonsäure
AHG:	Anhydroglucoseeinheit
AM70:	Highamylomaisstärke
DCC:	Dicyclocarbodiimid
DHA:	Docosahexaensäure
DMAP:	4-(Dimethylamino)-pyridin
DSC:	Differential Scanning Calorimetry
EPA:	Eicosapentaensäure
FAME:	Fettsäuremethylester
GC:	Gaschromatographie
GPC:	Gelpermeationschromatographie
KA:	Kartoffelamylose
P _n :	Polymerisationsgrad
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acid
TMSH:	Trimethylsulfoniumhydroxid

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat das Bewußtsein für eine gesunde Lebens- und Ernährungsweise immer stärker zugenommen. Dies hat dazu geführt, daß der Verbraucher Lebensmittel heute verstärkt hinsichtlich ihres gesundheitlichen Wertes beurteilt. Um diesem veränderten Verbraucherverhalten gerecht zu werden, ist die Lebensmittelindustrie dazu übergegangen, spezielle Convenience-Produkte mit einem erhöhten Gesundheitsnutzen zu entwickeln. Neben brennwert-, zucker- und fettreduzierten Lebensmitteln gewinnen hier auch nährstoffangereicherte Produkte zunehmend an Bedeutung.

Für eine Anreicherung eignen sich speziell Lebensmittel, deren Gehalt an bestimmten Nährstoffen entweder von Natur aus gering ist oder der durch den Herstellungsprozeß vermindert wurde. Der Zusatz von Nährstoffen soll in diesen Fällen einen physiologisch sinnvollen Beitrag zur Deckung des jeweiligen Tagesbedarfs leisten. Eine wichtige Voraussetzung für eine solche Anreicherung ist jedoch, daß die herkömmlichen Eigenschaften des Lebensmittels nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt werden, um eine entsprechende Akzeptanz bei den Verbrauchern zu gewährleisten.

Welchen Erfolg solche Konzepte haben können, zeigt das Beispiel von vitaminierten Produkten, die heutzutage in fast allen Marktsegmenten plaziert sind. So wurde beispielsweise 1994 auf die Frage, wie der tägliche Vitaminbedarf gedeckt werden kann, von 26 % aller Verbraucher der Verzehr von Multivitaminsäften genannt.^[1] Weiterhin haben sich der Zusatz von Mineralstoffen wie Calcium und Magnesium, die Jodierung und Fluorierung von Speisesalz oder die Anreicherung mit Ballaststoffen bei Lebensmittelprodukten etabliert.

Speziell in den letzten Jahren hat sich in Zusammenhang mit neuesten medizinischen und ernährungsphysiologischen Studien ein neuer Trend bei den "Funktions-Nahrungsmitteln" herausgebildet, nämlich die Anreicherung von Lebensmitteln mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA).

Unter dem Begriff PUFA faßt man alle Fettsäuren zusammen, die mindestens 18 Kohlenstoffatome und mindestens zwei ungesättigte Doppelbindungen enthalten. Je nach der Position der ersten Doppelbindung vom Methylgruppenende (ω -C-Atom) spricht man von n-3- (ω -3-) bzw. n-6- (ω -6-)-Fettsäuren. Die Unterteilung der ungesättigten Fettsäuren in zwei Klassen ist gerade für die Ernährung von entscheidender Bedeutung, da der menschliche Organismus die Fettsäuren der n-3- und der n-6-Serie nicht ineinander umwandeln kann. Bei der Biosynthese langkettiger, hochungesättigter Fettsäuren konkurrieren sie um die gleichen Enzyme (Abb. 2). Durch reichliche Zufuhr von n-6-PUFA kann also ein Mangel an n-3-Fettsäuren im Organismus erzeugt werden und umgekehrt.

Die Umwandlung der Fettsäuren geschieht durch Kombination von Elongationsund Desaturierungsreaktionen. Bei der Elongation, die eine Umkehr der Fettsäureoxidation darstellt, werden nacheinander Acetyleinheiten angehängt und reduziert. Ungesättigte Fettsäuren werden von terminalen Desaturasen hergestellt. Säugetiere besitzen vier verschiedene terminale Desaturasen, die als Δ^9 -, Δ^6 -, Δ^5 - und Δ^4 -Fettsäure-Acyl-CoA-Desaturasen bezeichnet werden. Die Enzyme katalysieren die folgende Reaktion.^[2]



Abb. 1: Reaktionsschema der Desaturierung von Fettsäuren

Die neue Doppelbindung wird zwischen bereits vorhandene Doppelbindungen und der CoA-Gruppe eingeführt. Sie liegt jeweils drei Kohlenstoffatome näher an der CoA-Gruppe als die vorherige und ist demnach nicht mit einer bereits vorhandenen Doppelbindung konjugiert. Der menschliche Organismus kann jedoch keine Doppelbindungen an Positionen jenseits von C(9) einführen.

Folglich ist eine Bildung von Linolsäure ($\Delta^{9,12}$ – Octadecadiensäure) und Linolensäure ($\Delta^{9,12,15}$ – Octadecatriensäure), die den Start der Syntheseketten bilden, ausgeschlossen. Sie müssen aus der Nahrung aufgenommen werden und sind somit *essentielle Fettsäuren*.



*Abb. 2: Biochemische Kettenverlängerung der PUFA im menschlichen Körper. PGE*_{1,2,3} : *Prostaglandine*^[3]

Für den menschlichen Organismus stellen die PUFAs vielfältig wirksame Substanzen dar, die drei wichtige Hauptfunktionen besitzen. So dienen sie zum einen als Energielieferant und –speicher, sind struktureller Bestandteil der Zellmembranen und haben darüber hinaus wichtige regulatorische Funktionen. Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosa-hexaensäure (DHA) stellen Vorläufer von Eicosanoiden, hochwirksamen Gewebehormonen wie Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen dar, die vielfältigen Einfluß auf Entzündungs- und Blutbildungsprozesse und das Immunsystem nehmen.^[4, 5]

Aufgrund dieser Effekte kam es in der letzten Zeit zur Erstellung von medizinischen Studien, die die Untersuchung eines vorbeugenden oder therapeutischen Einflusses von PUFA auf eine Vielzahl von Krankheiten beinhalten. So wird ein Einfluß auf Herzrhythmusstörungen, Rheuma und selbst Krebs vermutet.^[6] Als wissenschaftlich abgesichert gelten bis heute jedoch lediglich zwei Anwendungen.

Die n-3- und n-6-Fettsäuren DHA und AA sind Bausteine im Gehirn und in der Netzhaut. Besonders wichtig ist eine optimale Versorgung mit diesen Fettsäuren bei Neugeborenen, weshalb sie auch in der Muttermilch enthalten sind. Herkömmliche Säuglingsnahrungen enthalten sie dagegen nicht, sondern nur die Vorläufer Linol- und Linolensäure. Da die Fettsäuresynthese im Neugeborenen noch nicht vollständig ausgebildet ist, kann bei Säuglingen, die mit solchen Nahrungen ernährt werden, eine Unterversorgung an DHA und AA resultieren. Tatsächlich wurden in vergleichenden Studien an gestillten und mit herkömmlicher Nahrung gefütterten Säuglingen Unterschiede in der geistigen Leistungsfähigkeit^[7, 8] und des Sehvermögens^[9, 10] gefunden. Mittlerweile empfiehlt die WHO, industriell hergestellte Säuglingsnahrungen mit DHA und AA anzureichern, um sie dem Fettsäureprofil der Muttermilch anzugleichen.^[11]

Für Erwachsene werden günstige Effekte von n-3-Fettsäuren bei der wirksamen Vorbeugung von koronaren Herzerkrankungen beschrieben. Erste Studien der siebziger Jahre untersuchten die Ernährungsgewohnheiten von Eskimos und den Zusammenhang mit Zivilisationskrankheiten.^[12] Sie führten erstmals zu dem Schluß, daß vermehrte Zufuhr von Fettfisch, einer der Hauptquellen von PUFAs, zu einer niedrigeren Sterblichkeit durch Herzinfarkt führt. Weitere Studien belegten die vorbeugende Wirkung einer fischhaltigen Kost.^[5, 13, 14] Die wahrscheinlichen Wirkmechanismen der n-3-PUFA beruhen auf einer Senkung der Bluttriglyceridkonzentration, des Blutdruckes und der Neigung zur Blutplättchenaggregation sowie eine Erhöhung des Gehaltes an HDL-Cholesterin.^[15]

Unsere heutige Ernährung enthält hinsichtlich der ungesättigten Fettsäuren im Durchschnitt ausreichend n-6-Fettsäuren, während allerdings gleichzeitig zu wenig n-3-PUFA zugeführt werden. Dies liegt im wesentlichen darin begründet, daß n-6-Fettsäuren in gut verfügbaren und häufig verwendeten Lebensmitteln wie Sonnenblumenöl, Distelöl und Margarine vorkommen. Die prophylaktisch wirksamen EPA und DHA sind dagegen fast ausschließlich in fettem Fisch wie Hering, Makrele oder Sardine enthalten; Lebensmittel also, die in Deutschland nur selten auf dem Speiseplan stehen. Nach einer Empfehlung der British Nutrition Foundation (BNF) sollten rund 0,5% der täglichen Energiezufuhr in Form von EPA und DHA zugeführt werden.^[16] Bei einer typischen Energieaufnahme von 2500 kcal entspricht dies ca. 1,25 g EPA und DHA. Erhebungen in England belegen, daß dort die durchschnittliche tägliche Aufnahme an den beiden ω -3-Fettsäuren bei nur rund 0,25 g liegt.^[3] Es besteht also eine Ernährungslücke von rund 1 g EPA und DHA pro Tag, die auf deutsche Verhältnisse in dieser Größenordnung übertragbar ist. Um diese Lücke zu schließen, wäre der tägliche Verzehr von 30 – 60 g Fettfisch nötig. Die Akzeptanz solcher Maßnahmen dürfte jedoch bei der Mehrzahl der Verbraucher gering sein. Eine sinnvolle Alternative stellt die Anreicherung von gewohnheitsmäßig konsumierten Lebensmitteln dar.

Die Gewinnung der ω -3-Fettsäuren erfolgt aus Fischölen, deren PUFA-Gehalt bei ca. 30% liegt. Die Fettsäuren liegen hier größtenteils in ihrer natürlichen Form als Triglyceride vor. Um letztendlich ein geschmacksneutrales und hochreines Endprodukt zu erhalten, ist ein spezielles Raffinationsverfahren nötig, in dem das Rohöl in mehreren Schritten neutralisiert, gebleicht und desodoriert wird. Eines der größten Probleme der hochungesättigten Fettsäuren ist jedoch ihre Oxidationsempfindlichkeit. PUFAs werden sehr leicht autoxidiert, wobei die dabei entstehenden Oxidationsprodukte zusätzlich zu ihrem unangenehmen, ranzigen Geruch im Verdacht stehen, giftig zu sein.^[17, 18] Eine Stabilisierung wird im allgemeinen durch Zusatz von handelsüblichen Antioxidantien wie Ascorbylpalmitat oder Tocopherol, sowie durch Verpackung unter Inertgas erreicht.

Eine weitere Alternative zur Stabilisierung von oxidationsempfindlichen Produkten stellt die Mikroverkapselung dar. Hierbei wird das Öl in einer Matrix eines inerten Materials eingelagert. Ein Beispiel ist das Produkt DRY n-3[®] der Firma DanoChem A/S aus Dänemark. Das Fischöl wird zunächst in einer wäßrigen Lösung des Coating-Materials, das aus einer Mischung von Gelatine, Saccharose und Maisstärke besteht, emulgiert. Anschließend findet eine Sprühtrocknung statt, so daß im Endeffekt Kapseln mit einem Durchmesser von ca. 300 µm entstehen, in denen das Öl tröpfchenweise (\emptyset 1-2 µm) eingelagert ist.^[19]

Gerade stärkehaltigen Materialen werden häufig bei der Herstellung von mikroverkapselten Produkten verwendet. Ihre hervorragende Eignung als Einschlußmaterial liegt in den Struktur- und Materialeigenschaften der Stärke begründet. Stärke ist keine homogene Verbindung, sondern sie besteht aus zwei strukturell verschiedenen Komponenten, der Amylose und dem Amylopektin. Beides sind Makromoleküle, die aus D-Glucose aufgebaut sind (Abb. 3).



Abb. 3: Molekülaufbau der Amylose und des Amylopektins^[20]

Amylose ist im wesentlichen aus α -1,4-verknüpften D-Glucopyranose-Bausteinen aufgebaut und besitzt somit eine lineare Struktur. Im Amylopektin liegen zusätzlich Verzweigungen vor, an denen Seitenketten über α-1,6glycosidische Bindungen an die Hauptkette gebunden sind. Diese Seitenketten können wiederum gleichermaßen verzweigt sein. Aus Strukturaufklärungen mit Hilfe vollständiger Methylierung und anschließender Hydrolyse hat man einen Anteil der α -1,6-Verknüpfungen von 4-6 % ermittelt, wodurch eine Anzahl von mehr als 20.000 Verzweigungen in einem Amylopektinmolekül resultieren.^[21] Hizukuri belegen eine bimodale Verteilung Untersuchungen von der Seitenketten.^[22] Die kürzeren Ketten besitzen einen durchschittlichen Polymerisationsgrad (P_n) von 15, während der P_n der längeren Ketten bei ca. 45 liegt. Der gesamte Pn von Amylopektin kann von 6.000 bis 1.000.000 variieren, woraus sich ein Molekulargewicht (MW) von 1.000.000 bis 20.000.000 ergibt.^[23] Je nach botanischer Herkunft liegt der P_n von Amylose dagegen zwischen 250 und 1.000 (MW = 40.000 - 160.000).^[24]

Unterschiede in den Molgewichten ergeben sich hierbei sowohl aus der Pflanzensorte, der Isolierung als auch aus der Methode der Molgewichtsbestimmung. Das Verhältnis des Amylose- und des Amylopektinanteils ist ebenfalls von Stärke zu Stärke unterschiedlich (Tab. 1).

Stärke	Amylose-Gehalt (%)	Amylopektin-Gehalt (%)
Mais	25	75
Highamylo-Mais	55 - 70	45 - 30
Wachsmais	< 1	> 99
Kartoffel	20	80
Weizen	25	75
Tapioca	17	83
Reis	19	81

Tab. 1: Durchschnittlicher Amylose- und Amylopektin-Gehalt verschiedener Stärken^[25]

Die Anordnung der Amylose und des Amylopektins innerhalb der Stärkekörner ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Verteilung der beiden Polymere ist nicht zufällig, sondern sehr geordnet. Ein Großteil der heutigen Kenntnisse über die innere Struktur der Körner basiert auf mikroskopischen Untersuchungen von teilabgebauten Stärkekörnern. So zeigen Stärkekörner, die einem enzymatischen Abbau durch α -Amylase ausgesetzt werden, unter dem Mikroskop ein Muster ähnlich den Jahresringen eines Baumstammes (Abb. 3).^[26] Dies läßt darauf schließen, daß sich amorphe Bereiche, die einem raschen Abbau unterliegen, mit kristallinen Bereichen abwechseln, die nur sehr langsam von α -Amylase angegriffen werden. Man vermutet, daß diese Struktur durch alternierende Wachstums- und Ruhephasen während der Synthese des Stärkekorns zustande kommt.



Abb. 3: Aufnahme von Sorghumhirse-Körnern, die mit α-Amylase behandelt wurden (links; der Balken entspricht 10 µm) und dem Modell der Struktur innerhalb eines Wachstumsringes von French (rechts)

Nach Montgomery und Senit ist hauptsächlich das Amylopektin für die Kristallinität verantwortlich.^[27] Die kürzeren Seitenketten treten bedingt durch ihre geringe Nähe zueinander in eine enge Wechselwirkung, die in der Ausbildung kristalliner Bereiche resultiert.

Ein Modell eines solchen "Wachstumsringes" stammt von French (Abb. 3).^[28] Innerhalb eines Ringes, der ein Ausmaß von 1200 – 4000 Å besitzt, befinden sich periodische Abschnitte von 70 Å, die aus kristallinen (50 Å) und amorphen Bereichen (20 Å) bestehen. Die Lage der Amylosemoleküle innerhalb dieser Amylopektinstruktur ist immer noch umstritten. Blanshard schlägt ein Modell vor, in dem Amylosemoleküle sowohl frei als auch in einer hybridartigen Amylose-Amylopektin-Struktur in den kristallinen und amorphen Bereichen des Stärkekorns verflochten sind.^[29]

Die Aufklärung der kristallinen Strukturen gelang mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie. Abhängig von ihrer botanischen Herkunft besitzt jede Stärkesorte ihr charakteristisches Diffraktogramm. Grundsätzlich lassen sich jedoch die drei Strukturtypen A-Form, B-Form und C-Form unterscheiden, wobei die C-Form eine Mischform aus A und B darstellt. Aufbauend auf einem Modell von Wu und Sarko^[30] haben Imberty und Pérez^[31, 32] aus Röntgendaten eines aus Lösung gezogenen Amylose-Einkristalles Modelle des A- und B-Typs entwickelt, die jeweils parallel angeordnete, linksgängige Doppelhelices mit 6 Anhydroglucoseeinheiten (AHG) pro Windung beinhalten und sich lediglich in der Anzahl der Wassermoleküle pro Elementarzelle unterscheiden (Abb. 4).



Abb. 4: Modell der Kristallstruktur von A- (links) und B-Amylose (rechts)

Der A-Typ kristallisiert in einem monoklinen Gitter mit 4 Wassermolekülen pro Elementarzelle, der B-Typ besitzt ein hexagonale Struktur, in der sich 36 Wassermoleküle zwischen den Doppelhelices befinden.

Neben der A- und der B-Amylose existiert jedoch noch eine weitere Konformation der Amylose, in der die Amylosemoleküle in einer einfachen helikalen Struktur vorliegen. Diese sogenannte V-Amylose entsteht durch die Komplexierung, d. h. durch die Einlagerung von geeigneten Molekülen wie DMSO, Fettsäuren, Alkoholen oder Iod in das Innere der Helix. Die Kristallstrukturen der entsprechenden V-Amylose-Komplexe sind eingehend mit Hilfe der Röntgen-^[33, 34] oder Elektronenbeugung^[35] untersucht worden. Der wohl bekannteste und meistuntersuchte Komplex ist sicherlich der Amylose-Iod-Komplex, dessen Struktur bereits 1947 von Rundle^[36] aufgeklärt worden ist. Er besitzt im kristallinen Zustand eine linksgängige Helix mit 6 AHG pro Helixwindung, wobei diese eine Ganghöhe von 8 Å aufweisen. Der äußere Durchmesser der Helix beträgt 13,4 Å, der innere 5,4 Å. Im Inneren der Helix befinden sich lineare Polviodid-Ketten von unterschiedlicher Länge, wobei die Iodatome zueinander mit 2,91 - 2,99 Å nahezu äquidistant sind. Die Farbe des Komplexes ist vom Polymerisationsgrad der Amylose abhängig. Während Amylose mit einem P_n von < 30 rötlich erscheint, zeigt sich ab einem P_n von 50 die charakteristische tiefblaue Färbung des Amylose-Iod-Komplexes.^[37]

Seit der Entdeckung der Amylose-Komplexe ist neben seiner Struktur die Triebkraft der Komplexierung die am meisten diskutierte Frage. Hierbei werden das Zusammenwirken von van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen und die Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen angenommen.^[38, 39] Die Anhydroglucoseeinheiten liegen innerhalb der Helix in der ⁴C₁-Sesselkonformation vor, wodurch eine Struktur entsteht, in der sämtliche Hydroxylgruppen der Glucosemoleküle nach außen weisen. Die äußere Oberfläche der Helix ist somit hydrophil, wohingegen das aufgrund dorthin orientierten C-H-Bindungen Innere der und der Sauerstoffatome der glycosidischen Bindungen einen ausgeprägt hydrophoben Charakter besitzt. Aus der daraus resultierenden Amphiphilie ist die Amylosehelix in der Lage, unpolare Moleküle oder unpolare Teile dipolarer Moleküle in ihrem Inneren einzuschließen. Neueste Untersuchungen dazu stammen von Lichtenthaler, der mit Hilfe von computer-berechneten "molecular lipophilicity profiles" (MLPs) die Unterscheidung in hydrophobe und hydrophile Bereiche sichtbar macht.^[40]

Spezielle Untersuchungen zur Strukturaufklärung von V-Amylose-Fettsäure-Komplexen stammen von Godet und Buléon.^[41, 42] Basierend auf den Kristallstrukturdaten der V-Amylose von Rappenecker und Zugenmaier^[34] berechneten sie die energieärmste Konformation bei Einlagerung der C₁₂-Fettsäure Laurinsäure. Es ergibt sich, daß während die aliphatische Kohlenwasserstoffkette komplexiert wird, die polare Carboxylgruppe der Fettsäure sowohl aus sterischen als auch aufgrund elektrostatischer Repulsion nicht im Helixinneren eingelagert werden kann (Abb. 5).



Abb. 5: Berechnete energieärmste Konformation eines Laurinsäure-V-Amylose-Komplexes (rechts: Aufsicht)^[42]

Während die Struktur der Amylose im festen bzw. kristallinen Zustand eindeutig bewiesen ist, ist die Konformation von Amylose in Lösung noch immer nicht zweifelsfrei geklärt (Abb. 6). So implizieren die Untersuchungen von Banks und Greenwood^[43], daß Amylose in wäßriger Lösung keinerlei helikalen Charakter aufweist und somit als statistisches Knäuel vorliegt. Erst die Gegenwart von Komplexbildnern ruft einen Übergang vom Knäuel zur Helix hervor. Kuge^[44], Rao^[45] und Pfannemüller^[46] gehen dagegen von einer deformierten, jedoch durchgehend helikalen Struktur aus. Das Modell jedoch, das heutzutage überwiegend zur Beschreibung der Konformation von Amylose in wäßrigen Lösungen verwendet und akzeptiert wird, beruht auf dem Vorliegen sowohl ungeordneter random coil-Regionen als auch geordneter helikaler Abschnitte im Amylosemolekül. Umstritten bleibt allerdings der jeweilige Anteil beiden Strukturen. So beschreibt Muroga^[47] die Konformation als statistisches Knäuel mit kurzen, unregelmäßigen helikalen Abschnitten, während Senior und Hamori^[48] das Amylose-Modell als aufgeweitete helikale Struktur charakterisieren, die von ungeordneten Abschnitten unterbrochen ist. Monte-Carlo-Studien einer 100 Einheiten langen Amylosekette von Jordan, Brant und Cesàro^[49] generierten eine random-coil-Struktur, die deutliche Regionen mit pseudo-helikalem Charakter aufweist.



Abb. 6: Konformationsmodelle von Amylose in wäßriger Lösung^[50]
A) random coil-Struktur, B) deformierte Helix, C) unterbrochene Helix

Amyloselösungen sind metastabil und neigen zur Retrogradation. Unter Retrogradation versteht man die Assoziation der Stärke zu geordneten Strukturen. Hierbei formen die Stärkeketten unlösliche Doppelhelices, die zu kristallinen Aggregaten und einer gelartigen Textur führen. Aufgrund seiner verzweigten Struktur zeigt Amylopektin eine weitaus geringere Neigung zur Retrogradation als Amylose. Für die Isolierung von Amylose aus nativer Stärke macht man sich die angesprochene Komplexierungsfähigkeit zunutze. Die meisten Komplexbildner ergeben mit Amylose schwerlösliche Komplexe, die durch Zentrifugation leicht abgetrennt werden können. Die reine Amylose erhält man anschließend durch Extraktion des Komplexanden. Das Amylopektin bleibt dagegen in Lösung; der stark verzweigte Aufbau verhindert die Kristallisation. Allerdings ist auch das Komplexierungsvermögen des Amylopektins weitaus geringer als das der Amylose. So ergibt Amylopektin mit Iod lediglich eine rotbraune Färbung, die auf eine Wechselwirkung mit den kurzen Seitenketten schließen läßt.

Amylose bildet mit einer Vielzahl von organischen Molekülen Inklusionskomplexe. Einschlußverbindungen mit linearen und verzweigten Alkoholen, Ketonen, Fettsäuren, Terpenen und aromatischen Verbindungen sind bekannt. ^[51, 52] Selbst sterisch anspruchsvolle und polycyclische Verbindungen können komplexiert werden, indem geeignete Molekülteile wie längere aliphatische Seitenketten oder para-substituierte Aromaten in die Helix eingeschlossen werden.^[53-55] Die relativ flexible Struktur der Amylosehelix ermöglicht es dabei, ihren Innendurchmesser den räumlichen Anforderungen der jeweiligen Komplexanden anzupassen. So sind Helices mit sechs, sieben oder acht Anhydroglucoseeinheiten pro Helixwindung bekannt (Tab. 2).

Anzahl AHG pro	Substanzklasse des Komplexanden	Beispiele	Durchmesser der Helix [Å]	
Helixwindung			außen	innen
	offenkettige Aliphaten	Iod, n-Butanol,		
6		Decanal, Fettsäuren	13,2	4,5
	verzweigte oder cyclische	tertButanol, Menthon,		
7	Aliphaten oder Aromaten	(-)-Limonen	14,7	6
	bicyclische Aliphaten	1-Naphthol,		
8	und größere Aromaten	Anthracen	16,2	7-8

Tab. 2: Abhängigkeit der Helixgröße vom Komplexanden^[56]

Ihre besonderen Eigenschaften machen die Amylose zu einem Rohstoff, der in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Speziell ihre Fähigkeit zur Komplexbildung und damit die Möglichkeit zur molekularen Verkapselung von empfindlichen oder hochwirksamen Substanzen stößt im Pharmabereich, Pflanzenschutz und gerade in der Nahrungsmittelindustrie auf ständig wachsendes Interesse.

2 Theoretischer Teil

2.1 Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit es möglich ist, durch Komplexierung von ungesättigten Lipiden mit Stärke bzw. Amylose eine Steigerung der Stabilität gegen Autoxidation zu erreichen. Da in der Literatur die Begriffe Komplexierung und Verkapselung häufig fälschlicherweise gleichberechtigt für die Wechselwirkung von Stärke mit niedermolekularen Molekülen verwendet werden, soll zunächst für das weitere Verständnis eine genaue Definition der einzelnen Begriffe erfolgen. So berichtet Tomasik^[57] über Komplexe von Stärke mit niedermolekularen Sacchariden. Er postuliert die Bildung von Komplexen durch die Penetration der Zuckermoleküle in die aufgequollenen Stärkekörner. Nachfolgende Untersuchungen ergaben jedoch keinen Aufschluß über die Bildung von helikalen Strukturen. Desweiteren findet man in der Literatur eine Vielzahl von Veröffentlichungen über Komplexe von Amylose mit anorganischen Salzen, die an Hand von Änderungen der optischen Rotation oder des UV-Spektrums bei Zugabe von Calciumchlorid bzw. Kaliumbromid belegt werden.^[58] Es steht außer Frage, daß die Eigenschaften der Stärke durch Wechselwirkungen mit diesen Substanzen verändert werden. Innerhalb dieser Arbeit wird der Begriff Komplexierung jedoch nur verwendet werden, falls eine Einlagerung eines Gastmoleküls in die Amylosehelix vorliegt. In diesem Zusammenhang wird dann von Inklusions- oder Einlagerungskomplexen die Rede sein. Dagegen grenzt sich der Begriff des Adsorbates ab, der lediglich eine unstöchiometrische Bindung der Gastmoleküle an der Oberfläche oder zwischen den Stärkemolekülen beinhaltet.

Ein weiterer Begriff, der synonym für die Komplexierung in Gebrauch ist, ist die sogenannte *molekulare Verkapselung*, die jedoch leicht mit dem allgemeinen Begriff *Verkapselung* oder *Mikroverkapselung* verwechselt werden kann. Bei dem Beispiel des mikroverkapselten Fischöl-Produktes Dry n-3[®], das in der Einleitung erwähnt worden ist, liegen tatsächlich keine Einlagerungskomplexe von Stärke und Lipiden vor, sondern das Öl ist hier lediglich tröpfchenweise in der Stärkematrix eingebaut. Ein Zusatz von Antioxidantien ist auch in diesem

Fall unerläßlich, um einen ausreichenden Schutz vor Oxidation zu gewährleisten. Eine weitaus bessere Stabilisierung der ungesättigten Fette sollte jedoch durch die Bildung von Einlagerungskomplexen erreicht werden, da in diesem Fall die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren durch die umgebende Amylosehelix vor einem Angriff von Sauerstoff, der die Autoxidation einleitet, geschützt sind (für den exakten Mechanismus der Autoxidation s. Kapitel 2.3.6).

In der Literatur findet man zahlreiche Publikationen über die Stabilisierung von oxidationsempfindlichen Fettsäuren. Bereits 1950 konnten Schlenk und Holman^[59] zeigen, daß eine Einlagerung von ungesättigten Fettsäuren in Harnstoff ihre Oxidationsstabilität deutlich erhöht. Wenige Jahre später wurde erstmalig über die Stabilisierung in Einschlußverbindungen von α - und β -Cyclodextrin berichtet.^[60] In den letzten Jahren gab es mehrere Untersuchungen, die sich mit der Stabilisierung der hochungesättigten Fettsäuren DHA und EPA befassen.^[61, 62] Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden allerdings in der überwiegenden Mehrheit für die Komplexierung der ungesättigten Fettsäuren Cyclodextrine als Modell-substanzen für Amylose verwendet,^[63] oder die Lipide lediglich in stärkeähnlichen Materialien wie Maltodextrinen verkapselt.^[64, 65] Zusätzlich erfolgen die meisten Untersuchungen mit den freien Fettsäuren oder den ernährungsphysiologisch irrelevanten Methyl- oder Ethylestern.^[61]

Arbeiten, in denen die Stabilisierung von ungesättigten Fettsäuren, die in ihrer natürlichen Form als Mono-, Di-, oder Triglyceride vorliegen, durch molekulare Verkapselung in Amylose oder amylosereiche Stärken untersucht wird, sind rar. Zwar ist das Komplexierungsverhalten gerade von Monoglyceriden in der Vergangenheit umfassend untersucht worden, jedoch liegt dies hauptsächlich in ihrem Einfluß auf die rheologischen Eigenschaften der Stärke wie Löslichkeit, Quellvermögen, Viskosität oder Retrogradationsverhalten begründet. Wichtigstes Anwendungsbeispiel ist in diesem Zusammenhang der Einsatz von Monoglyceriden bei der Herstellung von Backwaren, um deren Alterungsverhalten günstig zu beeinflussen.^[66, 67]

Über die Komplexe von Di- und Triglyceriden mit Amylose ist dagegen relativ wenig bekannt. Eine Einlagerung von reinen Diglyceriden in die Amylosehelix wird lediglich von Osman, Leith und Fles erwähnt.^[68] Die Autoren beweisen die Komplexierung durch IR-Spektroskopie. Über eine konkurrierende Einlagerung von Mono- und Diglyceriden aus einem Glyceridgemisch berichtet Brauner^[69], wobei sie jedoch bei der Verwendung von reinem Diglycerid keine Einschlußverbindungen nachweisen konnte. Auch über die Komplexierung von Triglyceriden existieren in der Literatur widersprüchliche Angaben. So berichtet Meuser^[70] über eine Komplexierung von Triglyceriden bei der Kochextrusion, während Bhatnagar und Hanna^[71] oder Mercier^[72] in analogen Untersuchungen keine Einlagerung in Stärke nachweisen konnten. Die Bildung von Inklusionskomplexen von Triglyceriden ausgehend von Stärkelösungen ist nicht literaturbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, das Komplexierungsverhalten von ungesättigten Glyceriden mit Amylose systematisch zu untersuchen und zu optimieren. Die zu erwartende erhöhte Stabilität der eingelagerten Lipide gegen Autoxidation wird in Langzeitmessungen durch Lagerung bei erhöhten Temperaturen untersucht. Als Komplexanden werden die jeweiligen Glyceride der Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und der Linolensäure (C18:3) verwendet. Um den Einfluß der Anzahl der Doppelbindungen bei der Komplexierung untersuchen zu können, werden ausschließlich hochreine Glyceride bzw. Fettsäuren verwendet. Bei den Di- und Triglyceriden handelt es sich zusätzlich um symmetrische Verbindungen, d. h. sie enthalten nur eine Fettsäuresorte.

Beginnend mit der Untersuchung der Komplexierung der Monoglyceride, über die Diglyceride, bis zu den Triglyceriden ist zu erwarten, daß die Komplexierungsneigung hauptsächlich durch den wachsenden sterischen Anspruch der Verbindungen beeinflußt wird.

Die Ausbeuten und Gastgehalte der erhaltenen Amylosekomplexe werden mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und GC bestimmt; eine Charakterisierung ihrer physikalischen Eigenschaften erfolgt anhand von DSC-Messungen. Zusätzlich sollen im Verlauf der Arbeit die Eigenschaften der aus Lösung dargestellten Amylose-Komplexe mit denen von entsprechenden Extrusionskomplexen verglichen werden. Des weiteren ist eine eingehende Untersuchung des Einflußes der Glyceride auf die rheologischen Eigenschaften, speziell auf die Viskosität von konzentrierten Stärkesystemen geplant.

2.2 Reinigung der Ausgangsstoffe

2.2.1 Stärke

Um otimale Einlagerungsvoraussetzungen für die Glyceride zu schaffen, ist es aufgrund der geringen Komplexierungsfähigkeit von Amylopektin ratsam, für die Darstellung der Inklusionskomplexe nur amylosereiche Stärken oder sogar reine Amylose zu verwenden. Als Grundsubstanzen werden deshalb reine Kartoffelamylose (KA) und eine native Highamylomaisstärke mit einem Amylosegehalt von ca. 70 % (AM70) gewählt. Die Kartoffelamylose wird vorher durch wiederholte Fällung mit Cyclohexanon aus Kartoffelstärke gewonnen. Abbildung 7 zeigt die GPC-Kurven der nativen Kartoffelstärke und der daraus nach zweimaliger Fraktionierung gewonnenen Amylose. Die Molgewichtsverteilung der Highamylomaisstärke wurde ebenfalls mit GPC ermittelt. Die Kartoffelamylose enthält selbst nach zwei Fällungen mit Cyclohexanon noch geringe hochmolekulare Anteile. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um gering vernetzte Amylosen, die im Gegensatz zum hochvernetzten Amylopektin noch in der Lage sind, Komplexe zu bilden und auszukristallisieren. Auch die trimodale Molgewichtsverteilung der AM70-Stärke deutet auf das Vorhandensein solcher Zwischenfraktionen hin. Der strukturelle Übergang zwischen Amylose und Amylopektin verläuft demnach fließend, so daß eine exakte Bestimmung des Amylosegehaltes nur schwer möglich ist.



Abb. 7: Molgewichtsverteilung der verwendeten Stärken

Bei der Darstellung von Amylose-Lipid-Komplexen muß man beachten, daß Stärke von Natur aus eine nicht unerhebliche Menge an Lipiden enthält, die sowohl die Synthese als auch die Analyse der Glycerid-Komplexe beeinflussen würden (s. Tab. 3).

	Mais	Wachsmais	Weizen	Kartoffel	Tapioca
Lipidgehalt (%)	0,8	0,2	0,9	0,1	0,1

Tab. 3: Lipidgehalte von Stärken^[25]

Den Hauptanteil unter den Lipiden macht das Lysolecithin aus, daneben sind freie Fettsäuren mit etwa 10 % vertreten. Die wichtigsten freien Fettsäuren sind Linolsäure und Palmitinsäure, deren Anteil zusammen etwa 80 % beträgt.^[73] Die Frage, ob und in welchem Maße die Lipide in Form von Einschlußverbindungen in der Stärke vorliegen, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Aus diesem Grund müssen die Stärken vor Verwendung entfettet werden. In der Literatur findet man eine Vielzahl von Veröffentlichungen über Entfettungsmethoden von Stärke, in denen verschiedene Extraktionsgemische miteinander verglichen werden.^[74-77] Als am besten geeignet hat sich ein Gemisch aus n-Propanol und Wasser (3:1) herausgestellt, das deshalb bei den folgenden Untersuchungen ebenfalls für die Entfettung der Kartoffel- und der Highamylomaisstärke verwendet wurde. Hierbei werden die Stärken mehrere Male über 1 – 2 Stunden bei 80 °C im Extraktionsmittel suspendiert, abfiltriert und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ein Maß für die Fähigkeit einer Amylose, Einschlußverbindungen zu bilden, ist der Blauwert. Zu seiner Bestimmung wird eine Amyloselösung bekannter Konzentration mit einer 0,2 %igen I_2/KI -Lösung versetzt. Nach Messung der Extinktion der Lösung bei 680 nm ergibt sich der Blauwert (B.V.) gemäß:

$$B.V. = \frac{4 \cdot E}{c}$$

E : Extinktion der Lösung bei 680 nm

c : Konzentration in mg Amylose/100 ml Lösung

Aus diesem Wert für die Bildung des Iodkomplexes läßt sich generell auf die Fähigkeit der Amylose schließen, Inklusionsverbindungen zu bilden bzw. eine helikale Konformation anzunehmen. Nach dieser Methode ergeben sich für die entfettete Kartoffelamylose bzw. AM70-Stärke folgende Blauwerte:

Stärke	Amylosegehalt	Blauwert
	(%)	
AM70	~ 70	8,9
KA	~ 100	12,2

Tab. 4: Blauwerte der verwendeten Stärken

Wie erwartet zeigt die reine Kartoffelamylose einen höheren Blauwert als die Highamylomaisstärke. Berücksichtigt man jedoch den ca. 30 %igen Anteil des Amylopektins, das keine blauen Iodkomplexe bildet, so ergibt sich für die AM70-Amylose ein theoretischer Blauwert von 12,7. Insofern sollten die Komplexierungseigenschaften der beiden Substanzen nahezu gleich sein. Für mögliche technische Anwendungen ist allerdings der Einsatz von nativen Stärken wünschenswert.

2.2.2 Fettsäuren

Wie bereits angesprochen, ist für eine systematische Untersuchung die Verwendung von hochreinen Gastverbindungen unerläßlich. Da allerdings die benötigten Glyceride der Öl-, Linol- und Linolensäure oder selbst die Fettsäuren in der gewünschten Reinheit nicht käuflich zu erwerben sind, müssen die Fettsäuren aus nativen Ölen gewonnen werden und die Glyceride anschließend daraus synthetisiert werden. Ausgangssubstanzen sollten demnach native Öle sein, die die jeweiligen Fettsäuren schon in hohen Anteilen enthalten. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Öle und deren prozentuale Fettsäurezusammensetzung. Diese Öle werden zunächst in ethanolischer Lösung mit 6,5 N Natronlauge bei 60 °C verseift, so daß man die freien Fettsäuren vorliegen hat.

	Gehalt in % an				
natives Ol	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Sonnenblumenöl	4	5	81	8	2
Baumwollsamenöl	21	3	18	56	<1
Leinsamenöl	6	4	18	17	53

Tab. 5: Zusammensetzung der nativen Öle

Für die Isolierung und Trennung der einzelnen Fettsäuren existieren zwei unterschiedliche Verfahren.^[78] Das erste ist die Tieftemperaturkristallisation, die darauf beruht, daß ungesättigte Fettsäuren niedrigere Schmelzpunkte und höhere Löslichkeiten aufweisen als gesättigte und somit erst bei weitaus tieferen Temperaturen aus einer Lösung ausfallen. Dabei sinkt die Kristallisationstemperatur mit steigender Anzahl der Doppelbindungen. Während die gesättigten Verbindungen bereits bei Temperaturen knapp unterhalb 0 °C auskristallisieren, beträgt z. B. die Kristallisationstemperatur für Linolensäure in Aceton –75 °C. Das Abfiltrieren der Präzipitate muß jedoch ebenfalls bei den entsprechenden Temperaturen erfolgen. In den Filtraten reichern sich jeweils die höher ungesättigten Fettsäuren an.

Beim zweiten Verfahren wird die Fraktionierung mit Hilfe von Harnstoff durchgeführt. Normalerweise kristallisiert Harnstoff in einer tetragonalen Struktur, bei Anwesenheit von langkettigen aliphatischen Verbindungen bildet er jedoch hexagonale Prismen.^[79] Die Elementarzelle enthält einen durchgehenden kanalartigen Hohlraum von ca. 4 x 6 Å, in dem ein entsprechend langes und nicht zu sterisch anspruchsvolles Molekül eingeschlossen werden kann. Dies ermöglicht z. B., verzweigte von unverzweigten oder offenkettige von cyclischen Verbindungen zu trennen. Aber auch eine Separation von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ist möglich, da die Molekülketten der ungesättigten Verbindungen aufgrund der cis-Konfiguration der Doppelbindungen eine Krümmung aufweisen und somit einen erhöhten Raumbedarf besitzen. Lediglich durch Rotation um die Einfachbindungen in Nachbarschaft zur cis-Doppelbindung kann eine quasi-lineare Konformation eingenommen werden. Mit steigender Anzahl an Doppelbindungen sinkt somit die Möglichkeit, in den Harnstoffkanälen eingelagert zu werden.

Für die Harnstoff-Fraktionierung wird das Fettsäuregemisch und der Harnstoff in heißem Methanol gelöst, und anschließend läßt man die Lösung langsam abkühlen. Im ausgefallenen Harnstoff-Addukt reichern sich die gesättigten bzw. weniger ungesättigten Fettsäuren an, die durch Lösen des Harnstoffes in Wasser und darauffolgender Etherextraktion zurückgewonnen werden.

In der Praxis hat sich im vorliegenden Fall zur Anreicherung der ungesättigten C18-Fettsäuren eine Kombination aus Tieftemperaturkristallisation und Harnstoffkomplexierung bewährt. So konnte die Ölsäure ausgehend vom Sonnenblumenöl nach Abtrennung der gesättigten Fettsäuren durch Umkristallisation in Aceton bei -25 °C und einmaliger Harnstoffkomplexierung in einer Reinheit von 97,0 % gewonnen werden. Mit Hilfe des gleichen Verfahrens wurde der Linolsäuregehalt des Baumwollsamenöls auf 97,6 % angereichert. Dazu waren allerdings drei Harnstoff-Fraktionierungen nötig, wobei sich im Gegensatz zur Ölsäure die jeweils angereicherte Fraktion im Filtrat befindet. Bei der Aufkonzentrierung des Leinsamenöls zur Gewinnung der reinen Linolensäure trat jedoch ein Problem auf. Selbst nach mehrmaliger Harnstoffkomplexierung konnte der Gehalt an C18:3 lediglich auf 77 % (22 % C18:2) erhöht werden, weitere Reinigungsschritte brachten keine Verbesserung des Verhältnisses von Linol- und Linolensäure von ca. 4 : 1. Die äußerst schwierige Trennbarkeit der beiden Fettsäuren durch fraktionierte Kristallisation wird auch in der Literatur beschrieben.^[80] Eine Alternative bietet die Trennung durch vollstängige Bromierung und anschließender Debromierung der Fettsäuren mit Zink.^[80, 81] Hierbei macht man sich die geringe Löslichkeit von Hexabromstearin-säure in Ether zunutze. Bei 0 °C beträgt diese lediglich 26 mg/100 ml.^[82] Setzt man ein linolensäurehaltiges Fettsäuregemisch in Ether mit einem Überschuß an Brom um, so fällt während der Reaktion das unlöslicher Hexabromid aus, während das entsprechende Tetrabromid der Linolsäure sowie das Dibromid der Ölsäure in Lösung verbleiben. Durch mehrfaches Waschen mit Ether und Umkristallisation aus Dioxan konnte die reine Hexabromstearinsäure gewonnen werden. Der nachfolgende Debromierungs-schritt unter der Einwirkung von Zink verläuft weitgehend stereospezifisch anti-periplanar unter Zurückbildung der cis-konfigurierten Doppelbindungen (Abb. 8).



Abb. 8: Mechanismus der Bromierung – Debromierung von Linolensäure

Die gaschromatographische Analyse des Produktgemisches beweist die vollständige Abtrennung der Öl- und auch der Linolsäure. Dafür enthielt es jedoch insgesamt 13 % an unterschiedlichen Konfigurationsisomeren, deren Bildung auf eine unvollständige Selektivität der cis-Eliminierung bei der Debromierung zurückzuführen ist.^[83] Durch eine anschließende Harnstoff-Fraktionierung des Isomerengemisches, bei der sich die all-cis-konfigurierten Moleküle im Filtrat anreichern, gelang es, die gewünschte Linolensäure in 90 %iger Reinheit zu isolieren.

Die genauen Reinheiten der hochangereicherten Fettsäuren sind in Tabelle 6 zusammen mit den jeweils enthaltenen Verunreinigungen nochmals aufgeführt.

Fettsäure	Reinheit	Verunreinigungen
		0,7 % C18:0
Ölsäure	97,0 %	1,8 % C18:2
		0,5 % C18:3
		0,2 % C16:0
Linolsäure	97,6 %	1,9 % C18:1
		0,3 % C18:3
Linolensäure	90,8 %	9,2 % trans-Isomere

Tab. 6: Zusammensetzung der angereicherten Fettsäuren

Sämtliche Fettsäuregemische wurden gaschromatographisch als Fettsäuremethylester (FAME) auf einer hochpolaren Kapillarsäule (BPX70) analysiert, die speziell für die Trennung von unterschiedlich gesättigten FAMEs geeignet ist.^[84] Für die Umsetzung der Fettsäuren zu den entsprechenden Estern wurde eine 1 %ige Lösung von Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) in Methanol verwendet. Die Methylierung verläuft bei 100 °C innerhalb von 20 min quantitativ.^[85] Als einzige Nebenprodukte entstehen bei dieser Reaktion das leichtflüchtige Dimethylsulfid und Wasser (Abb. 9), so daß die Reaktionslösung ohne weitere Aufarbeitung direkt analysiert werden kann.



Abb. 9: Reaktionsschema der Fettsäuremethylierung mit TMSH

2.3 Monoglycerid-Komplexe

2.3.1 Synthese der Monoglyceride

Die Darstellung der Monoglyceride erfolgt nach einem literaturbekannten Syntheseweg. Im ersten Schritt wird Glycerin mit Aceton unter Einwirkung von p-Toluolsulfonsäure zu 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-methanol (Acetonglycerin) umgesetzt. Die Kopplung der Fettsäure an die freie Hydroxylgruppe des isopropylidengeschützten Glycerins wird anschließend mit DCC/DMAP in CCl₄ durchgeführt, in dem der als Nebenprodukt entstehende Harnstoff nahezu quantitativ ausfällt und somit leicht abgetrennt werden kann. Durch Abspaltung der Schutzgruppe mit dem tonminerallischen Katalysator Montmorillonit K10^[86] erhält man nach säulenchromatographischer Aufarbeitung das jeweilige 1-Monoglycerid in guter Ausbeute (Abb. 10).





Abb. 10: Darstellung der Monoglyceride

Die früher häufig in der Literatur beschriebene Methode, die Reaktion ausgehend von einem Säurechlorid^[87, 88] durchzuführen, wurde bewußt vermieden. Zum einen würde dies aufgrund der Umsetzung der Fettsäuren zu den entsprechenden Säurechloriden einen weiteren Syntheseschritt bedeuten. Desweiteren sind die hierbei notwendigen Reaktionsbedingungen relativ rigoros, was bei den ungesättigen Fettsäuren zu unerwünschten Isomerisierungen oder Abbaureaktionen führen könnte. Die DCC-Kopplung findet im Gegensatz dazu unter sehr milden Bedingungen bei Raumtemperatur statt.

2.3.2 Darstellung der Inklusionskomplexe

Die Synthese der Amylose-Monoglycerid-Inklusionskomplexe erfolgt durch Ausfällen der schwer löslichen Komplexe aus einer verdünnten Amyloselösung. Für den Lösungsprozeß der nur sehr schlecht wasserlöslichen Kartoffelamylose bzw. Highamylomaisstärke stehen zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung. So finden sich in der Literatur Beispiele für die Präparation von Amyloselösungen im alkalischen Milieu^[89], in DMSO^[38, 90] oder DMSO-Harnstoff-Mischungen ^[91, 92], als n-Butanolkomplex in heißem Wasser^[93, 94] oder in einem Autoklav bei erhöhtem Druck und Temperaturen über 100 °C^[95]. Hiervon sind allerdings die meisten Methoden für die hier durchgeführten Untersuchungen ungeeignet. So ist zum Beispiel DMSO nicht für die Verwendung im Lebensmittelbereich zugelassen. Außerdem ist bekannt, daß DMSO selbst ein guter Komplexand für Amylose darstellt und daher mit den Glyceriden um die Einlagerung in die Helix konkurriert.^[96, 97] Wird die Amylose im Alkalischen gelöst, so besteht der Nachteil, daß sich durch die notwendige Neutralisierung nicht unerhebliche Mengen an Salzen in der Lösung befinden, die möglicherweise Einfluß auf die Komplexierungseigenschaften der Amylose haben.^[58] Die Verwendung des n-Butanolkomplexes wirkt sich zwar aufgrund der vorgebildeten helikalen Struktur eventuell günstig auf die Komplexierungseigenschaften der Amylose aus, jedoch ist dieses Vefahren kaum für eine technische Anwendung geeignet. Als am besten geeignete Methode verbleibt die Autoklavierung der Amylose, da sie das Lösen der Amylose ohne Zusatzstoffe in reinem Wasser ermöglicht. Das

Verfahren hat sich bereits in vorangegangenen Arbeiten in unserem Institut bewährt.^[98] Hierbei wird eine ca. 3 %ige Suspension von Amylose bzw. Stärke in deionisiertem und deoxigeniertem Wasser durch Erhitzen auf 140 °C innerhalb von 1 ½ Stunden in einem Autoklav vollständig gelöst. Die Lösung wird, nachdem sie wieder auf 100 °C abgekühlt ist, heiß filtriert und auf 1 % verdünnt.

Nach Riisom, Krog und Eriksen hat das Phasenverhalten der Monoglyceride in wäßriger Lösung einen großen Einfluß auf ihre Komplexierungseigenschaften.^[91] So eignen sich die lamellare Mesophase von Monoglyceriden und Wasser und besonders Liposome (sphärische multilamellare Vesikel), die aus der lamellaren Phase bei einem Überschuß an Wasser gebildet werden, am besten zu Komplexierung, während die β -kristalline, die kubische oder die hexagonale Phase inaktive Formen darstellen. Hierbei muß man jedoch beachten, daß sich die Phasendiagramme von gesättigten und ungesättigten Monoglyceriden deutlich voneinander unterscheiden. Abbildung 11 zeigt die binären Phasendiagramme von Monopalmitat (C16:0) und Monooleat in Wasser.



Abb. 11: Phasendiagramme von Monoglyceriden in Wasser^[91]

Speziell bei 60 °C differieren das Phasenverhalten und damit die Komplexierungseigenschaften von gesättigtem und ungesättigtem Monoglycerid deutlich. Während Monopalmitat in der lamellaren Mesophase vorliegt, aus der bei Verdünnung Liposome gebildet werden, liegt Monooleat in der kubischen Phase vor, die in einem Überschuß an Wasser nicht dispergierbar ist. Zwar existiert im Phasendiagramm des Monooleats ebenfalls ein Bereich, in dem die Monoglyceride eine lamellare Phase bilden, allerdings nur bis zu einem Wassergehalt von 20 %. Bei der Zugabe des lamellaren Monoglycerids zur Amyloselösung würde sich sofort wieder die kubische Phase ausbilden.

Mit Hilfe eines Emulgators können aber auch die ungesättigten Monoglyceride in eine liposomenartige Form gebracht und damit in Wasser dispergiert werden. Für die Darstellung von stabilen Emulsionen ist die Wahl des Emulgators, dessen Dispersionseigenschaften anhand des HLB (hydrophilic lipophilic balance)-Systems eingestuft werden, entscheidend. Der HLB-Wert ist ein Maß für die Hydro- bzw. Lipophilie von Emulgatoren, wobei im allgemeinen Substanzen mit einem niedrigen HLB-Wert (< 10) gute Wasser-in-Öl (W/O)-Emulgatoren sind, während die mehr wasserfreundlichen Tenside mit höherem HLB-Wert als O/W-Emulgatoren wirken.^[20]

Da es sich bei der Dispersion von Glyceriden in Wasser im Grunde genommen um O/W-Emulsionen handelt, benötigt man demnach Emulgatoren mit einem hohen HLB-Wert. Zwei Emulgatoren, die diese Eigenschaft erfüllen, sind Natriumcholat und Natriumoleat. Die sehr gute Eignung von Natriumcholat bei der Dispersion von ungesättigten Monoglyceriden wurde bereits von Riisom^[91] beschrieben, während die Verwendung von Natriumoleat als Emulgator erstmalig von Höller im Fall von Fettsäuremethylestern beobachtet wurde.^[98] Höller gelangen in diesem Zusammenhang wichtige Untersuchungen bezüglich der Synthesetechnik von Stärkekomplexen aus verdünnten Lösungen, die teilweise Grundlage der vorliegenden Arbeit sind.



Abb. 12: Strukturen der verwendeten Emulgatoren Na-Cholat und Na-Oleat

Der jeweilige Einsatz der Emulgatoren hat in beiden Fällen sowohl Vor- als auch Nachteile. Das Natriumoleat stellt im Gegensatz zur sterisch anspruchsvollen Cholsäure bedingt durch seine lineare Struktur eine mögliche Konkurrenz zu den Monoglyceriden um die Einlagerung in die Amylosehelix dar. Dem kann man entgegenwirken, indem man bei Verwendung von Natriumoleat das Verhältnis von Emulgator und angebotenem Glycerid möglichst klein wählt. Auf der anderen Seite ist Natriumoleat für den Einsatz im Lebensmittelbereich weitaus besser geeignet als Natriumcholat, da das Cholsäuresalz aufgrund Rückstände an der Oberfläche Komplexe möglicher der zu einer Geschmacksbeeinflussung der Produkte führen kann.

Bezogen auf die Dispersionsleistung sind beide Emulgatoren jedoch gleich gut geeignet. In beiden Fällen erhält man nach einer ca. 45 minütigen Behandlung im Ultraschallbad bei 40 °C nahezu durchsichtige Emulsionen, die einen perlmuttartigen Glanz aufweisen. Die genauen Verhälnisse von Emulgator, Glycerid und Wasser in den Emulsionen zeigt Tabelle 7.

Fmulgator	Gewichtsanteile			
Elliuigator	Emulgator	Glycerid	Wasser	
Natriumcholat	1	5	100	
Natriumoleat	1	25	1000	

Tab. 7: Zusammensetzung der Glycerid-Emulsionen

Für die Darstellung der Inklusionskomplexe werden die Emulsionen anschließend zu den Amyloselösungen gegeben und langsam unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Temperatur der Amyloselösung, bei der der Gast addiert wird (im folgenden Komplexierungstemperatur genannt), hat dabei einen großen Einfluß auf die Komplexierung der Glyceride. Die gefriergetrocknet ausfallenden Komplexe abzentrifugiert, werden und Waschen anschließend durch mehrmaliges mit Methylenchlorid von adsorbierten Lipidanteilen befreit.



Abb. 13: Flußdiagramm zur Darstellung der Inklusionskomplexe
2.3.3 Bestimmung der Lipidgehalte der Inklusionskomplexe

Für die Bestimmung der in der Amylose inkludierten Menge an Glycerid stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Eine in der Vergangenheit oft angewendete Methode ist die Bestimmung der verbliebenen Iodbindekapazität der Reaktionsfiltrate, die erstmalig von Krog^[99] Anfang der 70er Jahre beschrieben wurde. Hierbei wird der nach Zusammengabe einer definierten Menge Amylose und einem Komplexanden ausgefallene Komplex abfiltriert und anschließend die restliche Iodaffinität (IA) der Reaktionslösung mit Hilfe einer amperometrischen Iodtitration^[100] bestimmt. Aus der Iodbindekapazität der reinen Amylose ergibt sich ein Amylose-Komplex-Index (ACI) nach:

$$ACI = \frac{(IA_{reine Amylose} - IA_{Filtrat}) \cdot 100}{IA_{reine Amylose}} \qquad mit \qquad IA = \frac{mg_{gebundenes Iod}}{mg_{Einwaage}}$$

Der Wert des ACI liegt somit zwischen 0 (keinerlei Komplexierung) und 100 (vollständige Komplexierung). Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist, daß der ACI lediglich eine qualitative Aussage über die "Güte" des Komplexanden beinhaltet. Zwar lassen sich die Komplexierungseigenschaften verschiedener Substanzen miteinander vergleichen, die wirklich eingelagerte Menge aber läßt sich auf diese Weise nicht ermitteln, so daß die Anwendung dieses Verfahrens für die geplanten Untersuchungen nicht in Frage kommt. Zudem werden mögliche Retrogradationsvorgänge, d.h. der Ausfall von Amylose ohne Einschluß eines Gastes nicht berücksichtigt.

Eine elegante Methode zur quantitativen Bestimmung der Gastgehalte bietet dagegen die NMR-Spektroskopie, bei der der zu analysierende Amylose-Komplex in einem Gemisch aus DMSO- d_6 und DCl (15:1) gelöst wird. Aus dem NMR-Spektrum läßt sich an Hand des Verhältnisses der Integralflächen der Protonen der Amylose und den Signalen der Methylengruppen in der Fettsäurekette die inkludierte Menge Glycerid bestimmen. Alternativ kann auch

das Signal der Doppelbindungsprotonen für die Berechnung herangezogen werden. Eine solche Vorgehensweise ist jedoch nur dann zulässig, wenn es sich bei den inkludierten Gästen um hochreine und zusätzlich im Fall der Di- und Triglyceride um symmetrische Verbindungen handelt, die lediglich eine Fettsäureart enthalten.

Für die geplanten Stabilitätsuntersuchungen der Inklusionskomplexe läßt sich die NMR-Spektroskopie allerdings nicht einsetzen. Durch die entstehenden Oxidationsprodukte wird eine genaue Zuordnung der Gastsignale im NMR-Spektrum unmöglich, so daß hierfür eine alternative Analysenmethode verwendet werden muß.

Eine weitere Methode, die sich für die quantitative Bestimmung der eingeschlossenen Lipidmenge eignet, ist die Extraktion der Glyceride aus den Komplexen und die anschließende gaschromatographische Analyse unter Verwendung eines internen Standards. Die direkte Analyse der Monoglyceride ist aufgrund der zwei freien Hydroxylgruppen und der damit verbundenen hohen Polarität der Verbindungen sehr problematisch. Eine Erhöhung der "GC-Gängigkeit" läßt sich entweder durch Silylierung bzw. Acylierung der OH-Gruppen^[101] oder durch Umesterung in die entsprechenden Methlyester erreichen. Ein Vorteil der Umwandlung der Monoglyceride in ihre FAMEs wäre, daß wie im Fall der freien Fettsäuren, das Methylierungsreagenz Trimetyhlsulfoniumhydroxid verwendet werden kann, da es gleichzeitig eine Umesterung der Glyceride in die Methylester bewirkt. Weiterhin ist diese Methode auch auf die Analytik der Di- und Triglyceride übertragbar, so daß sämtliche GC-Analysen mit Hilfe einer einzigen Kapillarsäule durchgeführt werden können. Diese Vorgehensweise wurde daher für diese Untersuchungen gewählt. Als interner Standard wurde die nicht natürlich vorkommende Heptadecansäure (C17:0) den Extrakten zugesetzt, die durch TMSH ebenfalls in den Methylester umgewandelt wird.

Für eine exakte quantitative Analytik muß zunächst eine Eichung des GC-Systems mit Hilfe von Kalibrierlösungen zur Bestimmung der Methodenfaktoren f_M der Glyceride erfolgen. Die Methodenfaktoren sind sowohl substanz- als auch gerätespezifisch und berechnen sich aus dem Verhältnis von Massenanteil im Analysengemisch und prozentualer Peakfläche im GC-Chromatogramm relativ zum internen Standard:

$$f_{M} = \frac{m_{Glycerid} \cdot \%_{int. Standard}}{m_{int. Standard} \cdot \%_{Glycerid}}$$

m = Einwaage in mg% = prozentualer Anteil im GC



Abb. 14: Beispielchromatogramm einer GC-Kalibrierlösung (interner Standard: C17:0)

Ein mögliche Fehlerquelle bei dieser Methode ist, daß für ein exaktes Ergebnis eine quantitative Extraktion der Glyceride notwendig ist. Karkalas und Raphaelides^[93] führen daher zur Freisetzung von in Amylose inkludierten Molekülen zunächst einen enzymatischen Abbau mit Amyloglucosidase durch. Anschließend extrahieren sie die Lipide mit Diethylether. Eine andere Möglichkeit ist die Extraktion der Komplexe mit sehr polaren Lösungsmitteln, wobei eine Verwendung eines Alkohol-Wasser-Gemisches wie im Fall der Entfettung von nativer Stärke aufgrund der Unverträglichkeit des GC-Säulenmaterials gegenüber größeren Mengen Wasser nicht in Frage kommt. Höller^[98] konnte jedoch zeigen, daß auch eine Behandlung der Komplexe mit reinem Methanol bei 100 °C innerhalb von 15 Minuten zu einer vollständigen Extraktion führt.

Für die Analyse der Glycerid-Amylose-Komplexe werden diese in ein dicht schließendes Schraubdeckelgefäß exakt eingewogen, mit einer definierten Menge an Heptadecansäure als internem Standard versetzt und mit Methanol bei 100 °C extrahiert. Nach Zentrifugation wird ein Teil der überstehenden Lösung abgenommen und mit TMSH-Lösung versetzt. Die quantitative Umsetzung der Lipide in die Methylester erfolgt innerhalb von 20 Minuten bei 100 °C, wonach die Reaktionslösung direkt auf die Kapillarsäule aufgegeben werden kann. Der Glyceridgehalt des Komplexes berechnet sich dann gemäß:

$$m_{Glycerid} = f_{M} \cdot \frac{m_{int.Standard} (mg) \cdot \%_{Lipid}}{\%_{int.Standard} \cdot m_{Komplex}(g)}$$
 in mg Glycerid/g Komplex

2.3.4 Optimierung der Monoglycerid-Komplexierung

Durch Variation einzelner Versuchsparameter erfolgt nun eine Optimierung der Monoglycerid-Komplexierung bezüglich der eingeschlossenen Menge an Gastmolekülen. Untersucht wird der Einfluß der Komplexierungstemperatur (dies ist die Temperatur, bei der die Monoglyceride zu der Amylose- bzw. Stärkelösung hinzugegeben werden), des verwendeten Emulgators, der zugegebenen Menge Monoglycerid und des Grades der Ungesättigtheit der Fettsäurereste auf die Gastgehalte und die Ausbeute der gebildeten Inklusionskomplexe.

An Hand von Monooleat als Beispielsubstanz soll zunächst der Einfluß der Komplexierungstemperatur bei Verwendung der beiden Emulgatoren Natriumcholat und Natriumoleat bestimmt werden. Als Vergleich werden die selben Komplexierungsversuche ohne Zusatz eines Emulgators unternommen, um den Einfluß der Liposomenbildung bei Anwesenheit eines Emulgators zu untersuchen.

Die Komplexierungen werden jeweils mit AM70-Stärke bei einer Lipidzugabe von 200 mg/g Amylose (= 1,43 g Stärke) durchgeführt. Die Bestimmung der inkludierten Menge Monooleat erfolgte NMR-spektroskopisch nach der in Kapital 2.3.3 beschriebenen Methode.



Abb. 15: Temperaturabhängige Komplexierung von Monooleat mit AM70-Stärke

Man erkennt deutlich, daß ohne Zugabe eines Emulgators weitaus geringere Gastgehalte erzielt werden als mit, allerdings nimmt die eingeschlossene Menge Monoglycerid mit steigender Temperatur zu. Während bei niedriger Komplexierungstemperatur nahezu keine Komplexbildung stattfindet, steigt der Lipidgehalt der AM70-Komplexe bei 70 °C auf fast 7 %. Er liegt damit aber immer noch um 30 – 40 % niedriger als bei Verwendung von Natriumcholat bzw. Natriumoleat. Anscheinend steigt die Löslichkeit des in der β -kristallinen Phase vorliegenden Monooleats und damit die Komplexierungsfähigkeit mit höheren Temperaturen an. Komplexierungsversuche bei Temperaturen über 70 °C wurden wegen der Empfindlichkeit der ungesättigten Monoglyceride nicht unternommen.

Die Wirkung der Emulgatoren auf die erzielten Lipidgehalte ist klar erkennbar. Durch die Liposomenbildung liegen die Monoglyceride in einer für die Komplexierung sehr günstigen Form in der Reaktionslösung vor, wodurch Lipidgehalte von 9 bis 11 % erreicht werden. Die Komplexierungstemperatur hat hier einen geringen, jedoch erkennbaren Einfluß auf die Menge des inkludierten Monoglycerids. Sowohl im Fall von Natriumcholat als auch bei Natriumoleat steigt der Gastgehalt leicht mit steigender Temperatur an, wobei der Anstieg bei Verwendung des Ölsäuresalzes stärker ist. Während bei 30 – 50 °C die Lipidgehalte mit Natriumcholat geringfügig höher liegen, erreicht man bei 60 und 70 °C mit Natriumoleat die besseren Ergebnisse. Generell läßt sich sagen, daß die Monoglyceridzugabe bei höheren Temperaturen erfolgen sollte. Alle weiteren Komplexierungen werden deshalb bei 70 °C durchgeführt.

Als nächstes stellt sich die Frage, welchen Einfluß die Anzahl der Doppelbindungen auf die Komplexierungsfähigkeit der Monoglyceride besitzt. Hierzu werden Komplexe aus Monooleat, Monolinolat und Monolinolenat mit Highamylomaisstärke hergestellt; zum Vergleich werden sowohl Natriumoleat als auch Natriumcholat als Emulgator eingesetzt (Abb. 16).



Abb. 16: Gastgehalte der Monoglycerid-AM70-Komplexe in Abhängigkeit der Anzahl der Doppelbindungen

Wie man anhand von Abbildung 16 sehen kann, sinkt der Lipidgehalt der Komplexe mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen der Monoglyceride. Für eine Einlagerung in die Amylosehelix muß der Fettsäurerest der Monoglyceride eine lineare Konformation einnehmen, was bei Anwesenheit einer cis-konfigurierten Doppelbindung nur durch Rotation um eine benachbarte Einfachbindung möglich ist. Es ist daher einleuchtend, daß mit steigender Anzahl von cis-Doppelbindungen die Möglichkeit einer Inklusion der ungesättigten Fettsäuren sinkt. In der Literatur finden sich zum Vergleich sehr widersprüchliche Angaben über den Einfluß von Doppelbindungen in Fettsäuren bzw. Monoglyceriden auf ihre Einlagerung in Amylose. Während Hahn und Hood^[95] bei steigender Anzahl an Doppelbindungen ebenfalls einen sinkenden Gastgehalt beobachtet, finden sowohl Karkalas^[93] als auch Riisom^[91] nahezu keinen Unterschied zwischen den Komplexierungseigenschaften von C18:1, C18:2 und C18:3. Riisom findet sogar für die ungesättigten Verbindungen eine höhere "relative Komplex-Effizienz" als für die gesättigte Stearinsäure (C18:0).

Auffällig ist, daß die Gastgehalte bei Verwendung von Natriumoleat ca. 5 -10 % höher sind als bei Einsatz von Natriumcholat. Auf den ersten Blick könnte der Grund hierfür in einer Einlagerung geringer Mengen von Natriumcholat in die Amylosehelix liegen. Die dadurch "belegte" Bereiche der Amylose ständen somit für eine Komplexierung der Monoglyceride nicht mehr zur Verfügung. Aufgrund der fehlenden Signale des Steroidgerüstes in den NMR-Spektren der Komplexe läßt sich diese Möglichkeit aber ausgeschließen. Auf der anderen Seite ließen sich die höheren Lipidgehalte der "Natriumoleat-Komplexe" auch mit einer Inklusion des Ölsäuresalzes erklären. Die identische Verschiebung der Methylengruppen chemische im Fettsäurerest der Monoglyceride und des Natriumoleats hat zur Folge, daß bei der NMRspektroskopischen Bestimmung des Gastgehaltes eingelagerte Anteile des Emulgators mitintegriert werden und somit zu einem scheinbar höheren Monoglyceridgehalt führen. Bei einer angebotenen Lipidmenge von 200 mg/g Amylose und einem Verhältnis Emulgator : Monoglycerid = 1 : 25 befinden sich in der Reaktionsmischung 8 mg Natriumoleat/g Amylose, die theoretisch eingelagert werden könnten. Für eine Bewertung dieser Möglichkeit muß man jedoch den Monooleat-Komplex getrennt von denen der höher ungesättigten Monoglyceride betrachten.

Im Fall des C18:1-Monoglycerids sind die Fettsäureketten des Glycerids und die des Natriumoleats identisch, so daß eine Einlagerung von daher gleich wahrscheinlich ist. Der Einfluß der unterschiedlichen hydrophilen Bereiche beider Moleküle sollte, da sie nicht in die Helix eingeschlossen werden, eine untergeordnete Rolle spielen. Das Monoglycerid wird bei der Komplexierung im Überschuß angeboten. Eine eingehende stöchiometrische Betrachtung der Einlagerungskomplexe erfolgt in Kapitel 2.3.5; vorweggenommen kann man aber sagen, daß ein Lipidgehalt von 10 - 11 % die maximal inkludierbare Menge darstellt. Von den angebotenen 200 mg Monoglycerid/g Amylose können nur in etwa die Hälfte eingelagert werden. Insofern erfolgt eine mögliche Einlagerung von Emulgator-Molekülen lediglich anstatt der Monoglyceride und nicht zusätzlich. Zudem beträgt der Unterschied des Gastgehaltes zwischen dem "Natriumcholat-" und dem "Natriumoleat-Komplex" ca. 11 mg/g, was höher ist als die Gesamtmenge an vorhandenem Emulgator. Leider läßt sich weder mit Hilfe der NMR-Spektroskopie noch durch GC-Analytik der Anteil des komplexierten Natriumoleats ermitteln.

Bei der Darstellung der Monolinolat- und Monolinolenat-Komplexen sollte die Einlagerung des einfach ungesättigten Fettsäurerestes des Natriumoleats gegenüber der der zwei- und dreifach ungesättigten Gastmoleküle begünstigt sein. GC-Analysen der entsprechenden Inklusionskomplexe ergaben einen C18:1-Gehalt von durchschnittlich 4 – 5 %, was nahezu der Zusammensetzung der Monoglycerid-Emulsion entspricht. Das Natriumoleat wird zwar wie erwartet mit in die Amylosehelix eingelagert, es findet aber keine merkliche Anreicherung statt. Der Anteil entspricht relativ genau den jeweiligen Differenzen der durch NMR-Spektroskopie bestimmten Geamt-Lipidgehalte. Man erhält also unabhängig vom eingesetzten Emulgator nahezu die gleichen Gastgehalte an Monolinolat bzw. Monolinolenat. Ob die Einlagerung des Natriumoleats nun zusätzlich zu den Monoglyceriden oder "auf ihre Kosten" erfolgt, kann somit abschließend nicht eindeutig geklärt werden. Als weiterer Punkt wurden die Gastgehalte der Monoglycerid-Komplexe in Abhängigkeit von der zugegebenen Lipidmenge untersucht. Zusätzlich zu den üblichen Komplexierungen mit 200 mg Monoglycerid/g Amylose wurden Versuche mit 100 und 70 mg/g durchgeführt. Ein Menge von 100 mg/g entspricht in etwa einem stöchiometrischen Zusatz (also der Menge Monoglycerid, die theoretisch eingelagert werden könnte), 70 mg/g bedeuten einen leichten Unterschuß an Gast. Die erhaltenen Gastgehalte der AM70-Komplexe für die verschiedenen Monoglyceride zeigt Abbildung 17. Die Komplexierungen erfolgten mit Natriumoleat bei 70 °C.



Abb. 17: Gastgehalte in Abhängigkeit der angebotenen Menge Monoglycerid

Unabhängig von der zugegebenen Menge an Monoglycerid erhält man in allen drei Fällen mit steigender Anzahl an Doppelbindungen sinkende Gastgehalte in den Komplexen. Weitaus interessanter ist allerdings die Tatsache, daß eine Halbierung der angebotenen Menge Lipid von 200 auf 100 mg/g Amylose eine Abnahme der Komplexgehalte von lediglich 10 - 20 % zur Folge hat. Die äußerst effiziente Einlagerung der Monoglyceride deutet auf sehr hohe Stabilitätskonstanten der gebildeten Komplexe hin. Die Beobachtungen decken sich mit den Untersuchungen von Szejtli und Bánky-Elöd, die für die Amylosekomplexe langkettiger Fettsäuren mit Hilfe der photometrischen Titration Dissoziationskonstanten von ca. 10^{-7} ermittelt haben.^[102]

enthält die Verhältnisse von angebotener und eingelagerter Menge an Monoglycerid, sowie in Klammern die Komplexausbeuten, d. h. die ausgefallene Menge Komplex bezogen auf die Gesamtmenge an Stärke.

angebotene Gastmenge	eingelagerte Lipidmenge (Komplexausbeute) in %			
(mg/g Amylose)	C18:1	C18:2	C18:3	
70	100 (77)	97 (75)	90 (76)	
100	88 (77)	88 (81)	77 (78)	
200	55 (89)	48 (77)	47 (81)	

Tab.	8:	Verhältnis	von ang	ebotener	und	eingelagerte	r Menge	an	Monogly	cerid;
		in Klamme	rn: Kom	plexausb	euten					

Man erkennt, daß mit abnehmender Menge an angebotenem Gast die Effektivität der Komplexierung zunimmt. Bei einer Zugabe von 70 mg/g Amylose werden nahezu alle Monoglycerid-Moleküle inkludiert. Betrachtet man allerdings zusätzlich die erzielten Gastgehalte, so stellen sicherlich die Komplexierungen mit 100 mg Monoglycerid/g Amylose das Optimum dar. Das Verhältnis von angebotener und eingelagerter Lipidmenge beträgt hier 80 – 90 %. Zwar lassen sich bei Zugabe von 200 mg/g noch etwas höhere Gastgehalte erzielen, der prozentuale Anteil der eingeschlossenen Menge Monoglycerid sinkt dann allerdings auf ca. 50 %. Diese Betrachtungen spielen gerade in Hinblick auf einen möglichen industriellen Einsatz eine wichtige Rolle, bei der die Effizienz der Komplexierung aufgrund der wertvollen Gastmoleküle höher einzustufen ist als der maximale Lipidgehalt der Komplexe. Ein Verlust von 50 % der eingesetzten Menge Gast wäre in diesem Fall sicherlich inakzeptabel.

Auf die Komplexausbeuten haben weder die angebotene Gastmenge noch die Anzahl der Doppelbindungen in den Monoglyceriden Auswirkungen. Bis auf eine Ausnahme betragen die Mengen an ausgefallenem Komplex in allen Fällen 75 – 80 % bezogen auf die Einwaage an AM70-Stärke. Theoretisch sind bei einem Amylosegehalt der Highamylomaisstärke von 70 % Komplexausbeuten von ebenfalls höchstens 70 % zu erwarten, da wie bereits erwähnt, sowohl die Komplexierungsfähigkeit als auch die Kristallisationsneigung des Amylopektins aufgrund seiner stark verzweigten Struktur sehr gering ist. Es ist jedoch möglich, daß derjenige Anteile des Amylopektins, der nur schwach verzweigt ist, ebenfalls mit den Monoglyceriden unlösliche Komplexe bildet. Auf die Existenz solcher Zwischenfraktionen deutet auch die trimodale Molgewichtsverteilung der Highamylomaisstärke hin (s. Abb. 7).

Als letzter Punkt im Rahmen der Komplex-Optimierung soll der Vergleich zwischen der Verwendung der nativen AM70-Stärke und reiner Kartoffelamylose erfolgen. Hierzu werden mit beiden Substanzen Komplexe der verschiedenen Monoglyceride unter Verwendung von Natriumoleat hergestellt (Abb. 18). Die zugegebene Gastmenge beträgt 200 mg/g Amylose.



Abb. 18: Vergleich der Gastgehalte von AM70- und KA-Komplexen

Das Komplexierungsverhalten von AM70-Stärke und Kartoffelamylose zeigt in Abhängigkeit der zugesetzten Monoglyceride interesssante Unterschiede. Während der Gastgehalt des Monooleat-Komplexes mit Highamylomaisstärke etwas höher liegt als bei Verwendung von Kartoffelamylose, so beobachtet man im Fall von Monolinolat und Monolinolenat das Gegenteil, wobei der Komplexgehalt des dreifach ungesättigten Monoglycerids sogar etwas höher liegt als der des zweifach ungesättigten. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Gewinnung der Kartoffelamylose durch Fällung als Cyclohexanon-Komplex begründet. Die für die Einlagerung nötige lineare Anordnung der ungesättigten Monoglyceride, die durch eine Konformationsänderung des Fettsäurerestes erreicht wird, hat eine Zunahme ihres Durchmessers zur Folge. Wie man in Abbildung 19 erkennt, steigt der sterische Anspruch dabei zusammen mit der Anzahl der Doppelbindungen an. Es wird vermutet, daß sich dadurch, zumindest bei den mehrfach ungesättigten Monoglyceriden, die Amylosehelix für eine Einlagerung von sechs auf sieben AHGs pro Windung aufweiten muß.^[103] Nun besitzt der Amylose-Komplex des Fällungsreagenzes Cyclohexanon ebenfalls eine 7er-Helix (s. Tab. 2), wobei wahrscheinlich die helikale Struktur nach Herauslösen des Ketons teilweise bestehen bleibt. Diese vorgebildeten helikalen Bereiche mit 7 AHGs pro Windung begünstigen offensichtlich speziell eine Einlagerung der höher ungesättigten und damit "sperrigeren" Monoglyceride. Allerdings könnten hierbei auch generelle strukturelle Unterschiede zwischen der Mais- und der Kartoffelamylose eine Rolle spielen.

Die Ausbeuten der Monoglycerin-Kartoffelamylose-Komplexe lagen mit 72 – 77 % unerwartet niedrig. Eigentlich würde man bei der Komplexierung von reiner Amylose, gerade bei Verwendung eines Gastüberschusses, mit einer 100 %igen Ausbeute rechnen. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die in der Kartoffelamylose enthaltenen hochmolekularen Anteile von schwach verzweigtem Amylopektin (s. Abb. 7) nicht zu einer Komplexbildung mit den Monoglyceriden fähig sind. Während die relativ kleinen und kompakten Cyclohexanonmoleküle bei der Gewinnung der Amylose problemlos in die Seitenketten eingelagert werden können, ist die Bildung unlöslicher Komplexe durch die Inklusion der langkettigen Lipide nicht mehr möglich, und somit bleibt ein Teil der Kartoffelamylose in Lösung.

Die maximal erzielten Gastgehalte bezüglich der Komplexierung der drei verschiedenen Monoglyceride sind abschließend zusammen mit den jeweiligen optimierten Reaktionsbedingungen und den Komplexausbeuten nochmals in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Mono-	Stärke	Emulgator	Lipidzugabe Temperatur Ausbeu		Ausbeute	Gastgehalt
glycerid			(mg/g Amylose)	(°C)	(%)	(mg/g Komplex)
C18:1	AM70	Na-Oleat	200	70	89	110
C18:2	KA	Na-Oleat	200	70	78	96
C18:3	KA	Na-Oleat	200	70	74	98

 Tab. 9: Maximale Gastgehalte der Monoglycerid-Komplexe

2.3.5 Stöchiometrie der Monoglycerid-Komplexe

Um die erzielten Gastgehalte der Monoglycerid-Komplexe tatsächlich einschätzen und bewerten zu können, soll mit Hilfe von Stöchiometriebetrachtungen die maximale Einlagerungskapazität der Amylose abgeschätzt werden. Dazu wird aus der berechneten Kettenlänge der Monoglyceride und den bekannten Daten über die Konformation der helikalen Amylose ein theoretisches molares Verhältnis zwischen den Gastmolekülen und den AHGs der Amylose ermittelt. Ein Vergleich mit den experimentell gewonnenen Gastgehalten der Monoglycerid-Komplexe ermöglicht dann eine Beurteilung über die "Güte" der Komplexierung. Bei der Komplexierung der Monoglyceride erfolgt lediglich eine Inklusion des Fettsäurerestes. Genau wie im Fall der freien Fettsäuren kann die polare Kopfgruppe nicht in das unpolare Helixinnere eingelagert werden. Zusätzlich spielen hier sicherlich sterische Gründe eine Rolle. Die für die Komplexierung relevante Länge der Monoglyceride beschränkt sich deshalb auf die 18 C-Atome der Fettsäure. Die Berechung des Abstandes des Carbonyl-C(1)-Atom von den H-Atomen der Methylgruppe erfolgt in einer idealisierten quasi-linearen Konformation, in der die Monoglyceride für eine Einlagerung in die Helix vorliegen müssen, unter Annahme folgender Parameter:

Bindungslängen:	C–C : 1,54 Å
	C=C : 1,34 Å
	C–H : 1,09 Å
Bindungswinkel:	$\mathrm{C_{sp^3}}$: 109,471 °
	C_{sp^2} : 120 °
Torsionswinkel:	0 ° bzw. 180 °

Die Kalottenmodelle der Monoglyceride in der sich daraus ergebenen Anordnung sind in Abbildung 19 dargestellt.



Abb. 19: Kalottenmodelle der ungesättigten Monoglyceride in der quasilinearen Konformation

Es zeigt sich, daß die Länge der Fettsäurekette mit steigender Anzahl an Doppelbindungen abnimmt. Die Verringerung der Kettenlänge von ca. 1,2 Å pro Doppelbindung beruht auf der Torsion der benachbarten C-C-Einfachbindungen, die zur Einnahme der quasi-linearen Konformation notwendig ist. Dies führt zwangsläufig zu einer Zunahme des Kettendurchmessers. Während die Ausmaße des gesättigten Monostearats (C18:0) lediglich etwa 2,2 Å betragen^[104], wächst der Durchmesser bei dem einfach ungesättigten Monooleat mit 4,5 Å auf das Doppelte. Dieser Wert entspricht exakt dem Innendurchmesser einer Amylosehelix mit 6 AHGs pro Windung, so daß hier sowohl eine Komplexierung in einer 6er- als auch in einer 7er-Helix denkbar wäre. Im Fall des Monolinolats und Monolinolenats ist aufgrund des noch größeren Kettendurchmessers von 5,0 bzw. 5,3 Å eine Einlagerung in eine 6er-Helix vermutlich nicht mehr möglich und somit eine Aufweitung der Amylosehelix auf sieben AHGs sehr wahrscheinlich. Mit einer durchmesserunabhängigen Ganghöhe von 8 Å pro Windung ergeben sich in Abhängigkeit der Helixgröße für die Monoglyceridkomplexe rein rechnerisch folgende Stöchiometrien.

Monodroorid	Kettenlänge	AHG/Ga	stmolekül	theor. molares Verhältnis		
Monoglyceria	(Å)	6er-Helix	7er-Helix	6er-Helix	7er-Helix	
C18:1	20,5	15,3	17,9	0,065	0,056	
C18:2	19,4	14,5	16,9	0,069	0,059	
C18:3	18,1	13,6	15,9	0,074	0,063	

Tab. 10: Theoretische molare Verhältnisse der Monoglyceridkomplexe(= Gastmolekül/AHG)

Im Gegenzug können jeweils aus den Daten derjenigen Monoglycerid-Komplexe mit den höchsten Gastgehalten (s. Tabelle 9) die entsprechenden experimentell erzielten molaren Verhältnisse von Gastmolekülen und AHG-Einheiten berechnet werden.

Monoglycowid	maximaler Gastgehalt		AUC/Costmolobii	exp. molares	
Monogryceria	mg/g Komplex	mg/g Amylose	Ang/Gastiliolekui	Verhältnis	
C18:1	110	124	17,7	0,057	
C18:2	96	106	20,6	0,049	
C18:3	98	109	19,9	0,050	

Tab. 11: experimentelle molare Verhältnisse der Monoglycerid-Komplexe(mit $M_{AHG} = 162, 14 \ M_{C18:1} = 356, 54, \ M_{C18:2} = 354, 53, \ M_{C18:3} = 352, 51)$

Für einen Vergleich der theoretischen und experimentellen molaren Verhältnisse muß man jedoch noch beachten, daß der theoretische Wert von einer Amylose ausgeht, die zu 100 % helikal vorliegt. Dies ist in Wirklichkeit jedoch nicht der Fall. Arbeiten von Jane und Robyt^[97] zeigen, daß komplexierte Amylose lamellare Kristalle bildet, in denen kurze helikale Ketten faltenartig senkrecht zu den Lamellen angeordnet sind. Jede Falte besteht aus einer amorphen Region, die nicht zur Komplexbildung fähig ist. Karkalas und Raphaelides schätzen den Anteil der helikalen Bereiche auf 6/7 bzw. 86 %.^[93] In den einzelnen helikalen Segmenten sind wahrscheinlich jeweils zwei Monoglyceridmoleküle entgegengesetzt von jedem Ende her in die Helix einkomplexiert (Abb. 20).



Abb. 20: Schematische Darstellung der Amylose-Monoglycerid-Komplexe^[105]

Berechnet man nun die Quotienten aus den experimentellen und den theoretischen molaren Verhältnissen, so erhält man jeweils in Abhängigkeit der Helixweite den Anteil der Amylose, der für die Komplexierung der ermittelten Monoglyceridgehalte notwendig ist (Tab. 12).

Monoglygowid	exp. molares Verhältnis : theor. molares Verhältnis			
wionogryceriu	6er-Helix	7er-Helix		
C18:1	0,88	1,02		
C18:2	0,71	0,83		
C18:3	0,68	0,79		

Tab. 12: Belegungsgrad der Monoglycerid-Amylose-Komplexe in Abhängigkeit der Helixgröße

Die sich ergebenden Werte bestätigen in vollem Umfang die vorausgegangenen Überlegungen und experimentellen Beobachtungen. Die Stöchiometriebetrachtungen sprechen eindeutig dafür, daß der Monooleat-Komplex eine 6er-Helix bildet, während Monolinolat und Monolinolenat in einer 7er-Helix inkludiert werden. Im Fall des Monoleats ist das Vorliegen einer 7er-Helix nahezu ausgeschlossen, da hier der helikale Anteil der Amylose im Komplex 100 % betragen müßte. Dafür entspricht der Quotient aus theoretischem und experimentellem molaren Verhältnis in einer 6er-Helix mit 0,88 fast exakt dem von Karkalas ermittelten maximalen helikalen Amyloseanteil von 86 %. Dies bedeutet, daß der Gastgehalt des Monoleat-Komplexes von 110 mg/g die größtmögliche Kapazität darstellt. Die mehrfach ungesättigten C18:2- und C18:3-Monoglyceride werden aufgrund des großen sterischen Anspruches ihrer Fettsäureketten unter Aufweitung der Helix auf 7 AHGs pro Windung in die Amylose eingelagert. Die entsprechenden Belegungsgrade der Komplexe sind 0,83 und 0,79, womit die Amylose ebenfalls nahezu vollständig mit Gastmolekülen gefüllt ist. Dies bedeutet allerdings, daß die Komplexierungsfähigkeit des Monolinolats und des Monolinolenats effektiv gesehen nahezu genauso hoch ist wie die des Monooleats. Die um ca. 15 % niedrigeren Gastgehalte kommen durch die größere Helixweite zustande, die zur Folge hat, daß für die Komplexierung der gleichen Menge Monoglycerid eine größere Anzahl AHGs und damit eine höhere Masse Amylose notwendig ist. Bei einer Aufweitung von 6 auf 7 AHG pro Windung beträgt die Gewichtszunahme 1/6 = 16 %.

2.3.6 Stabilitätsuntersuchungen der Monoglyceridkomplexe

Eines der größten Probleme beim Umgang mit ungesättigten Lipiden ist ihre Oxidationsempfindlichkeit. Einen sehr wichtigen Aspekt bei der Charakterisierung der Glycerid-Amylose-Komplexe stellt deshalb die Untersuchung dar, inwieweit eine Einlagerung der ungesättigten Fettsäureketten in die Helix eine Verringerung der Autoxidation bewirkt. Grundsätzlich ist die Geschwindigkeit der Autoxidation abhängig von der Fettsäurezusammensetzung, der mit Sauerstoff in Berührung kommenden Oberfläche und von den Bedingungen, unter denen die fetthaltige Substanz gelagert wird (Temperatur, Licht, Wassergehalt). Die Oxidation beginnt nach Ablauf einer bestimmten Induktionsperiode; danach steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit immer weiter an. Die Länge der Induktionsperiode hängt hauptsächlich vom Grad der Ungesättigtheit der Fettsäuren ab. Je höher die Anzahl der Doppelbindungen ist, desto kürzer ist die Induktionsperiode und um so schneller verläuft die Oxidation (Tabelle 13).

Fottsöuro	Induktions-	rel. Oxidations-	
reusaure	periode (h)	geschwindigkeit	
C18:0		1	
C18:1	82	100	
C18:2	19	1200	
C18:3	1,3	2500	

Tab. 13: Induktionsperiode und relative Oxidationsgeschwindigkeit vonFettsäuren bei 25 °C

Die enorme Zunahme der Oxidationsempfindlichkeit mit steigender Anzahl an Doppelbindungen liegt im Reaktionsmechanismus der Autoxidation begründet (Abb. 21).



Abb. 21: Reaktionsprodukte der Autoxidation von Linolsäure

Die Oxidation verläuft über radikalische Zwischenstufen, wobei relativ stabile und damit reaktionsträge Peroxyradikale auftreten, die nur besonders aktivierte H-Atome abstrahieren können. Bevorzugt handelt es sich dabei um die H-Atome aus einer Methylengruppe eines 1,4-Pentadiensystems, wie sie in höher ungesättigten Fettsäuren vorkommen. Gestartet wir die Autoxidation z. B. durch den Angriff von Singulettsauerstoff oder durch die Anwesenheit von Schwermetallionen, die die Bildung von Peroxyradikalen katalysieren. Als Primärprodukte der Oxidation entstehen Monohydroperoxide, die allerdings völlig geruch- und geschmacklos sind. Die Qualität eines Lebensmittels ändert sich erst, wenn sekundär flüchtige Verbindungen entstehen, da zu ihnen eine Vielzahl intensiver Aromastoffe gehören, die schon in den geringen Konzentrationen, in denen sie normalerweise auftreten, sehr stark den Geruch und Geschmack beeinflussen können. Die Hauptaromastoffe aus der Lipidperoxidation sind Aldehyde; daneben spielen noch Kohlenwasserstoffe und Alkohole eine Rolle. Die Bildung der flüchtigen Abbauprodukte erfolgt durch die β -Spaltung der Monohydroperoxide.

Für die Stabilitätsuntersuchungen werden zunächst Komplexe der drei ungesättigten Monoglyceride mit AM70-Stärke hergestellt. Als Emulgator wird in diesem Fall Natriumcholat verwendet, damit sichergestellt ist, daß ausschließlich die Monoglyceride eingelagert werden. Die Komplexe werden gründlich mit einem unpolaren Lösungsmittel gewaschen, um anhaftende oder inkludierte teilweise Moleküle vollständig zu entfernen. nur Als Vergleichsproben zu den Amylosekomplexen werden aus der Highamolymais-Stärke und den reinen Monoglyceriden entsprechende Adsorbate hergestellt, bei denen die Lipide lediglich auf der Oberfläche der Stärke angelagert sind. Dazu werden die beiden Komponenten in Methylenchlorid ca. 30 Minuten suspendiert. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und die Adsorbate im Vakuum getrocknet. Hierbei entspricht die Zusammensetzung der Adsorbate in etwa den Gastgehalten der Einlagerungskomplexe (Lipidanteil 8 – 11 %). Die Komplexe werden nun zusammen mit den Adsorbaten bei erhöhter Temperatur (40 °C) über Phosphorpentoxid gelagert. Das Trockenmittel sorgt für eine konstante Luftfeuchtigkeit und verhindert bei den Proben die Aufnahme von Wasser, die zu einer Gewichtzunahme und damit einer Verfälschung der Gastgehalte führen würde. Von Zeit zu Zeit werden die Lipidgehalte mit Hilfe der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen GC-Analysenmethode bestimmt. Der gesamte Lagerversuch umfaßt einen Zeitraum von 100 Tagen. Die erhaltenen Meßergebnisse zeigt Abbildung 22.



Abb. 22: Stabilität komplexierter (K) bzw. adsorbierter (A) Monoglyceride bei 40 °C

Nach Ablauf der Versuchsreihe ist der Gastgehalt im Komplex von ca. 10 auf 8 % gefallen. Hierbei kann es sich jedoch nicht um adsorbierte Anteile handeln, da diese sofort und nicht nach und nach oxidiert werden müßten. Aus der Kurvenform läßt sich ableiten, daß die Monoglyceride zwar komplexiert sind, aber nicht vollständig vor dem Angriff von Luftsauerstoff geschützt sind. Die Oxidation wird zwar extrem erschwert, jedoch nicht ausgeschlossen. Dies macht sich allerdings erst bei den sehr empfindlichen hoch ungesättigten Fettsäurederivaten bemerkbar.

2.4 Diglycerid-Komplexe

2.4.1 Vorausgehende Betrachtungen

Nach der erfolgreichen Optimierung der Monoglycerid-Komplexierung soll nun untersucht werden, ob es mit der gleichen Methode möglich ist, eine Inklusion von Diglyceriden zu erreichen. Bei der Übertragung der Versuchsparameter von den Monoglyceriden auf die Diglyceride muß man allerdings beachten, daß sich die beiden Substanzklassen stark voneinander unterscheiden. Neben der verminderten Hydrohilie bedingt durch den zweiten Fettsäurerest bzw. den Wegfall einer Hydroxylgruppe, hat sicherlich der enorme sterische Anspruch der Diglyceride einen erheblichen Einfluß auf die Komplexierungseigenschaften.

Über das Komplexierungsverhalten von Diglyceriden ist allgemein nur sehr wenig bekannt. So finden sich in der Literatur lediglich eine Handvoll Veröffentlichungen, die sich mit Amylose-Komplexen von Diglyceriden beschäftigen. Zudem stammen diese aus den 60er und 70er Jahren; neurere Arbeiten existieren überhaupt nicht. Ein Grund dafür ist sicherlich die im Gegensatz zu den Monoglyceriden weitaus geringere industrielle Bedeutung.

1961 berichten Osman, Leith und Fles über den Einschluß von Diglyceriden in Amylose.^[68] Die Komplexierung bestätigen die Autoren durch IR-Spektroskopie. Die eingelagerten Diglyceride zeigten ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 1725 cm⁻¹, welches durch die Carboxylgruppen der Fettsäurereste hervorgerufen wurde. Außerdem beobachteten die Autoren bei den Diglycerid-Amylose-Komplexen eine Reduzierung der Iodaffinität im Vergleich zu reiner Amylose. Krog erwähnt lediglich, daß ein Monoglycerid-Diglycerid-Gemisch ein geringeres Komplexierungsvermögen aufweist als reine Monoglyceride.^[99] Er erklärt diesen Effekt damit, daß die Mono- und die Diglyceride eine Öl-in-Wasser-Phase bilden, gemeinsame in der die Monoglyceride eingeschlossen werden und somit nicht mehr für eine Komplexierung verfügbar sind. Eine mögliche Komplexierung der Diglyceride wird nicht diskutiert bzw. ausgeschlossen. Von Brauner stammt eine Arbeit über die konkurrierende Einlagerung von Mono- und Diglyceriden.^[69] Ähnlich wie bei Krog wird darin bei der Verwendung eines Glyceridgemisches eine Abnahme des Gastgehaltes der Amylosekomplexe beschrieben. Durch GC-Analyse konnte eine "Co-Komplexierung" von Diglyceriden eindeutig bewiesen werden. Komplexierungsversuche ausgehend von reinen Diglyceriden führten aber nur zu äußerst geringen Gastgehalten von 0,5 %. Über Amylose-Komplexe von anderen Molekülen mit zwei Seitenketten berichtet Szejtli.^[102] Mit Hilfe der Iodtitration konnte er den Einschluß eines Prostaglandins und von Saccharosedistearat nachweisen. Es wird vermutet, daß dabei jeweils nur ein Seitenkette im Helixinneren eingeschlossen wird.

Eine Einlagerung eines kompletten Diglycerid-Moleküls würde die lineare Anordnung sowohl des Glycerid-Gerüstes als auch beider Fettsäureketten erfordern. Die Einnahme einer solchen Konformation ist bei Diglyceriden, bei denen sich die Fettsäuren in 1- und 3-Position befinden, weitaus eher denkbar als im Fall der entsprechenden 1,2-Diglyceride. Hinweise darauf geben z. B. Kristallstruktur-Untersuchungen der beiden Regioisomere des Stearinsäure-Ölsäure-Diglycerids von Sato (Abb. 23).^[107]



Abb. 23: Kristallstrukturen des 1,3- und des 1,2-Stearoyl-oleoyl-glycerins

Während die 1,2-Diglyceride eine V-förmige Konformation einnehmen, in der beide Fettsäurereste aufeinander zu liegen kommen, befinden sich die 1,3-Diglyceride im Kristall in einer nahezu idealen linearen Anordnung, die, übertragen auf das Vorliegen in Lösung, eine Einlagerung in die Amylosehelix ermöglichen würde. Daher wurde beschlossen, für die Darstellung von Amylose-Diglycerid-Komplexen reine 1,3-Diglyceride einzusetzen. In Hinblick auf die exakte Bestimmung des Gastgehaltes der Komplexe ist es hierbei wichtig, daß es sich um symmetrische Verbindungen handelt, d. h. die beiden Fettsäurereste müssen identisch sein. Aber auch für Untersuchungen über den Einfluß der Anzahl der Doppelbindungen auf die Komplexierung, sollten die Diglyceride ausschließlich Öl-, Linol- oder Linolensäure enthalten, um einen Vergleich mit den Monoglyceriden zu ermöglichen.

2.4.2 Synthese der 1,3-Diglyceride

Ein sehr eleganter Weg zur Darstellung von symmetrischen 1,3-disubstituierten Glyceriden stammt von Cockman.^[108] Durch Verwendung von Dihydroxyaceton wird der Einsatz von Schutzgruppen unnötig. Die in 1- und 3- Position befindlichen Hydroxylgruppen werden direkt mit Hilfe von DCC/DMAP mit

den Fettsäuren verestert. Das Keton wird anschließend mit Natriumborhydrid in THF reduziert (Abb. 24).



Abb. 24: Mögliche Darstellung von 1,3-Digylceriden

Leider konnte trotz mehrmaliger Wiederholung und genauester Einhaltung der angegebenen Reaktionsbedingungen das gewünschte Produkt aus Dihydroxyaceton und den ungesättigten C18-Fettsäuren nicht erhalten werden. Die Kopplung mit DCC führte im ersten Schritt laut DC-Analyse stets zu einem komplizierten Produktgemisch, das säulenchromatographisch nicht voneinander getrennt und somit auch nicht genauer identifiziert werden konnte. Es ist allerdings bekannt, daß 1,3-Dihydroxyaceton, das in festem Zustand in dimerer Form vorliegt, in Lösung sowohl monomer als auch in drei diastereomeren Dimeren vorkommt (Abb. 25).^[109]



Abb. 25: Gleichgewicht von Dihydroxyaceton in Lösung

Wie man leicht erkennt, kann dadurch der Angriff eines Fettsäurerestes auch in 2-Position erfolgen. Dies hat zusätzlich zur Folge, daß anschließend an dieser

Stelle keine Ringöffnung mehr möglich ist, so daß sich im Laufe der Reaktion auch kondensierte bzw. zyklische Produkte bilden können.

Aus diesem Grund wurde für die Synthese der 1,3-Diglyceride ein klassischer Weg ausgehend von Glycerin gewählt. Er ist mit 5 Stufen zwar weitaus länger, durch den Einsatz von spezifischen Schutzgruppen verläuft die Einführung der Fettsäuren jedoch regioselektiv (Abb. 26).



Abb. 26: Darstellung der 1,3-Diglyceride

Im ersten Schritt wird das Glycerin mit Benzaldehyd zum 1,3-geschützten das der Benzylidenglycerin umgesetzt. Für Schützen verbleibenden Hydroxylgruppe wird tert.-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS) gewählt, da es unter den Abspaltbedingungen der Benzylidengruppe stabil ist und unter aprotischen Bedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid entfernt werden kann. Dies ist besonders wichtig, um eine Acylwanderung der Fettsäurereste im letzten Schritt so weit wie möglich zu vermeiden. Das ölige Reaktionsprodukt wird ohne Aufarbeitung direkt hydriert, da eine Reinigung des Folgeproduktes wegen der sehr guten Kristallisationseigenschaften weitaus einfacher ist. Nach der Entfernung der Benzylidenschutzgruppe erfolgt die Kopplung der Fettsäuren mit DCC/DMAP in 1- und 3-Stellung. Trotz des aprotischen Milieus beim Entfernen der Silylgruppe kann man die Bildung von ca. 20 % 1,2-Diglyceriden nicht vermeiden. Aufgrund der leicht unterschiedlichen R_f-Werte lassen sich die beiden Isomere jedoch säulenchromatographisch voneinander trennen, was aber mit Ausbeuteverlusten verbunden ist.

Auffällig ist die niedrige Ausbeute bei der Synthese des Benzylidenglycerins. Diese ist darauf zurückzuführen, daß die Reaktion keinesfalls auschließlich das 1,3-geschützte Produkt liefert, wie in vielen Lehrbüchern zu finden ist, sondern ebenfalls in nahezu gleichen Anteilen das 1,2-Produkt, da die Bildung des 5-Ringes kinetisch bevorzugt ist. Zudem entstehen jeweils das cis- und das trans-Isomer, so daß im Endeffekt zunächst ein öliges Produktgemisch aus vier verschieden geschützten Glycerinderivaten vorliegt. Die vier Isomere lassen sich im NMR anhand der unterschiedlichen chemischen Verschiebung des jeweiligen benzylischen Protons eindeutig voneinander unterscheiden. Eine Ringerweiterung der 1,2-geschützten Produkte in die thermodynamisch stabileren 6-Ringe gelingt bei tiefen Temperaturen unter der Einwirkung von HCl-Gas. Erkennbar ist die Umwandlung mit bloßem Auge an der nach einiger Zeit einsetzenden Kristallisation. Nach mehrmaliger Umkristallisation des Rohproduktes erhält man in 95 % iger Reinheit das cis-1,3-Benzylidenglycerin. Abbildung 27 zeigt die NMR-Spektren des Reaktionsgemisches vor und nach der Aufreinigung.



Abb. 27: ¹H-NMR Spektren der Benzylidenglyceride vor (oben) und nach (unten) der Aufreinigung

2.4.2 Optimierung der Diglycerid-Komplexierung

Es soll nun untersucht werden, ob eine Komplexierung von 1,3-Diglyceriden überhaupt möglich ist und wenn ja, welchen Einfluß die Variation der Reaktionsbedingungen auf die erzielten Gastgehalte hat. Die Darstellung der Diglycerid-Komplexe erfolgt analog zu den Monoglyceriden; alle Versuchsparameter wie Emulgatorsysteme, Menge der Lipidzugabe oder die verwendeten Stärken werden übernommen. Die Suspension der Diglyceride gelingt sowohl bei Zugabe von Natriumoleat als auch von Natriumcholat. Nach ca. 60 minütiger Ultraschallbehandlung erhält man stabile milchig-weiße Emulsionen, die dann zu den Stärke- bzw. Amylose-Lösungen hinzugegeben werden. Für die Bestimmung der einkludierten Diglycerid-Menge stehen wiederum die NMR-Spektroskopie und die GC-Analyse zur Verfügung, wobei, wie bereits beschrieben, die Umesterung zu den FAMEs den Einsatz der gleichen Kapillarsäule wie im Fall der Monoglyceride ermöglicht. Lediglich die Methodenfaktoren müssen spezifisch für die Diglyceride neu bestimmt werden.

Als erstes wurden Diglycerid-Komplexe mit Dioleat als Modellsubstanz und AM70-Stärke bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellt. Die Gastzugabe betrug in allen Fällen 200 mg/g Amylose. In Abbildung 28 sind die erzielten Gastgehalte im Vergleich der beiden Emulgatoren dargestellt.



Abb. 28: Temperaturabhängige Komplexierung von 1,3-Dioleat

Grundsätzlich lassen sich selbst nach intensiver Behandlung der Amylose-Präzipitate mit Methylenchlorid Gastgehalte von mehreren Prozent nachweisen. Dies spricht dafür, daß tatsächlich eine Komplexierung der Diglyceride stattfindet. Ob nun beide Fettsäurereste in die Amylosehelix eingelagert sind oder nur einer, läßt sich so allerdings nicht feststellen. Einen Hinweis darauf sollten jedoch spätere Stabilitätsuntersuchungen der Komplexe geben, da entsprechend den Ergebnissen der Monoglycerid-Komplexe ein oxidativer Abbau aller nicht inkludierten Glyceride zu erwarten ist. So sollte man, falls bei der Komplexie-rung der Diglyceride nur eine der beiden Fettsäureketten inkludiert und damit geschützt wird, einen raschen Abfall des Gastgehaltes auf 50 % des Ausgangswertes erwarten.

Wie man in Abbildung 28 sieht, hat die Veränderung der Komplexierungstemperatur je nach Emulgatorsystem einen unterschiedlichen Einfluß auf die Gastgehalte. Bei der Verwendung von Natriumcholat ergibt sich unabhängig von der Temperatur, bei der die Diglycerid-Emulsion zur Stärkelösung dazugegeben wird, nahezu der gleiche Gastgehalt: es werden ca. 25 mg Dioleat/g Amylose eingelagert, wobei mit steigender Temperatur sogar eine leichte Abnahme zu beobachten ist. Die optimale Komplexierungstemperatur liegt bei 30 °C. Im Gegensatz dazu steigt die Menge des inkludierten Diglycerids im Fall des Natriumoleats mit zunehmender Temperatur deutlich an. Während bei 30 °C nur 10 mg/g Amylose komplexiert werden, beträgt der Gastgehalt bei 70 °C über 30 mg/g. Hierbei muß man allerdings die gleichzeitige Komplexierung des Emulgators berücksichtigen. Aufgrund der - im Vergleich zu den Monoglycerid-Komplexen - relativ geringen Gastgehalte wirken sich bereits die Einlagerung von wenigen mg Natriumoleat deutlich auf die Genauigkeit der NMR-spektroskopischen Gehaltsbestimmung aus. Leider ist auch per GC-Analyse keine exakte Ermittlung des Diglyceridanteils möglich, da ja sowohl Natriumoleat als auch das Dioleat als Ölsäuremethylester detektiert werden, so daß über die eingelagerte Emulgatormenge nur spekuliert werden kann. Ein Vergleich der maximal erzielten Gastgehalte für Natriumoleat und Natriumcholat zeigt eine Differenz von ca. 7 mg/g Amylose, was in der gleichen Größenordnung liegt wie die im System vorhandenen Menge Natriumoleat. Insofern erzielt man also hier mit beiden Emulgatoren in etwa die gleichen Diglyceridgehalte.

Die zugehörigen Komplexausbeuten zeigen eine auffallend gleiche Tendenz. Bei Einsatz von Natriumcholat liegen die Ausbeuten durchgehend bei ca. 60 %, wobei der maximale Wert von 64 % bei einer Komplexierungstemperatur von 30 °C erzielt wird. Mit Natriumoleat als Emulgator fallen bei niedrigeren Temperaturen nur rund 35 % der AM70-Stärke als Dioleat-Komplex aus, während die Komplexierung bei 70 °C mit 78 % eine gute bis sehr gute Ausbeute ergibt. Gemessen an den relativ geringen Gastgehalten liegen die Komplexausbeuten erstaunlich hoch. Anscheinend führt bereits eine Lipid-inklusion von 2 – 3 % zu einer nahezu vollständigen Kristallisation der Amylose.

Die Lipidgehalte der Komplexe liegen weit unter denen der Monoglycerid-Komplexe. Von den angebotenen 200 mg Diglycerid/g Amylose werden gerade einmal 20 – 30 mg in die Helix eingelagert. Mit einem nicht inkludierten Anteil von fast 90 % ist demnach die Komplexierung relativ uneffektiv, was auf eine kleine Stabilitätskonstante der Diglycerid-Komplexe schließen läßt. Es soll daher untersucht werden, ob durch eine Reduzierung der angebotenen Menge Lipid auf 100 mg/g bzw. 50 mg/g die Effektivität bzw. der prozentuale Anteil der komplexierten Diglyceride beeinflußt werden kann (Abb. 29).



Abb. 29: Gastgehalte in Abhängigkeit der angebotenen Menge Dioleat

Wie man sieht, führt eine Verringerung der zugesetzten Dioleatmenge im Fall von Natriumcholat zu keiner Veränderung des Anteils der eingelagerten Gastmenge, der konstant bei ca. 12 % liegt. Eine Halbierung der Lipidmenge hat auch eine Abnahme des Gastgehaltes um 50 % zur Folge. Die Effektivität der Diglycerid-Komplexierung unter Zusatz von Natriumoleat steigt demgegenüber mit sinkenden Dioleatmengen auf bis zu 30 % an. Auch bei Berücksichtigung der inkludierten Emulgatormoleküle erhält man durch die Verwendung von Natriumoleat höhere Diglyceridgehalte als durch Natriumcholat. Man muß dabei beachten, daß durch das konstante Verhältnis von zugegebenem Gast und Emulgator (s. Tab. 7) sich z. B. bei einer Gastzugabe von 50 mg/g Amylose lediglich 2 mg Natriumoleat/g Amylose in der Komplexierungslösung befinden. Zieht man sowohl den komplexierten Diglycerid-Anteil als auch den erzielten Gastgehalt in Betracht, SO liefert der Dioleat-AM70-Komplex unter Verwendung von Natriumoleat und einer Lipidzugabe von 100 mg/g Amylose das beste Ergebnis. Es ist zu vermuten, daß bei Zusatz von Gastmengen von mehr als 200 mg/g durch die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen freien und komplexierten Diglyceridmolekülen höhere Gastgehalte zu erreichen sind. Da dies allerdings mit immer größeren Verlusten der wertvollen Gastmoleküle verbunden wäre, wurden in diese Richtung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Auf die Komplexausbeuten hat eine Veränderung der angebotenen Lipidmenge keinerlei Einfluß. Sie betragen selbst bei geringer Gastzugabe 70 - 90 %.

Als nächster Punkt erfolgt die Komplexierung der höher ungesättigten 1,3-Diglyceride Dilinolat und Dilinolenat. Die Komplexe wurden wiederum mit AM70-Stärke bei einer Lipidzugabe von 200 mg/g Amylose hergestellt. Die Komplexierungstemperatur betrug 30 °C bei Zusatz von Natriumcholat und 70 °C im Fall der Natriumoleat-Emulsionen. Bei Verwendung von Natriumoleat wurde zur Ermittlung der reinen C18:2- bzw. C18:3-Gehalte der Komplexe, zusätzlich zur NMR-spektroskopischen Bestimmung eine GC-Analyse der Extrakte durchgeführt. Hierbei konnte nun bestätigt werden, daß die Emulgatormoleküle tatsächlich zu einem großen Teil in die Amylosehelix eingelagert werden. Die Gehalte von Natriumoleat in den Diglycerid-Komplexen betrugen zwischen 4 und 8 mg/g. Sie sind bei der Angabe der Dilinolat- und Dilinolenat-Gehalte in Abbildung 30 berücksichtigt: angegeben ist nur die inkludierte Menge Diglycerid. Um die Werte mit dem entsprechenden Dioleat-Komplex vergleichen zu können, ist bei ihm der maximal mögliche Emulgatoranteil am gesamten Gastgehalt schraffiert hervorgehoben.



Abb. 30: Gastgehalte der Diglycerid-AM70-Komplexe

Erstaunlicherweise nehmen die Gastgehalte der Diglycerid-Komplexe mit steigender Anzahl an Doppelbindungen in den Fettsäureresten tendenziell zu. Lediglich der Dilinolenat-Komplex, der mit Hilfe einer Natriumoleat-Emulsion hergestellt wurde, besitzt einen relativ niedrigen Diglyceridgehalt von 20 mg/g. Geht man bei der Inklusion der Diglyceride davon aus, daß die gesamten Moleküle mit beiden Fettsäureresten in die Helix eingelagert werden, so wäre zu erwarten, daß die Komplexierungsfähigkeit der Diglyceride mit zunehmender Ungesättigtheit deutlich sinkt. Um komplett in die Amylosehelix einzudringen, müssen beide Fettsäuren des Diglycerid-Moleküls in einer linearen Konformation vorliegen, was bei vier oder sogar sechs Doppelbindungen immer unwahrscheinlicher wird. Insofern spricht dies eher für die Einlagerung von jeweils nur einer Seitenkette, obwohl selbst in diesem Fall die Gastgehalte vom Dioleat zum Dilinolenat sinken sollten. Die Ergebnisse lassen sich nur bedingt mit denen der Monoglycerid-Komplexe vergleichen, bei denen sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Helixweiten für alle drei Fettsäurederivate nahezu die gleichen Komplexgehalte ergeben. Die Einlagerung wird hier aufgrund der enormen Komplexierungsneigung der Monoglyceride durch die maximale Aufnahmekapazität der Amylose begrenzt, so daß sterische Unterschiede der Gäste bei der Inklusion nur eine untergeordnete Rolle spielen. Wenn überhaupt, so kann ein Vergleich lediglich mit den Komplexgehalten der Monoglycerid-Komplexe erfolgen, bei denen ein Unterschuß an Gast zugesetzt wurde. Wie man in Abbildung 17 sieht, ergibt sich bei einer Gastzugabe von 70 mg/g Amylose tatsächlich eine leichte Abnahme der Gastgehalte mit steigender Anzahl an Doppelbindungen. Die relativ gute Komplexierungsfähigkeit der höher ungesättigten Diglyceride muß demnach andere Gründe haben, die die sterischen Nachteile überwiegen. Es könnte z. B. sein, daß sich mit der Anzahl der Doppelbindungen auch das Phasenverhalten der Diglyceride in den Emulsionen ändert, so daß sich eine größere Anzahl von Molekülen in einem für eine Einlagerung günstigen Zustand befinden. Wegen mangelnder Kenntnis der Phasendiagramme von Diglyceriden-Wasser-Gemischen kann darüber jedoch nur spekuliert werden.

Als letzter Aspekt bei der Optimierung der Diglycerid-Komplexierung verbleibt der Einfluß der verwendeten Stärke auf die Gastgehalte. Um möglichst viele Ansatzpunkte für einen Vergleich zu erhalten, wurden Kartoffelamylosekomplexe von sämtlichen Diglyceriden mit beiden Emulgatorensystemen hergestellt.



Abb. 31: Gastgehalte der Diglycerid-KA-Komplexe

Im Fall der Emulgierung durch Natriumoleat sind wiederum die aus der GC-Analyse ermittelten reinen Diglyceridgehalte angegeben; beim zugehörigen Dioleat-Komplex ist der vermutete Emulgatoranteil schraffiert (Abb. 31). Die gemessenen Komplexgehalte beim Zusatz von Natriumcholat sind in etwa die gleichen wie bei den AM70-Komplexen. Die Werte sind zwar etwas geringer, sie zeigen aber auch hier keine Abnahme mit steigender Anzahl der Doppelbindungen. Alle drei Diglyceride werden in gleichem Maße in die Amylosehelix eingebaut. Allerdings sind speziell die Ausbeuten des Dioleatund des Dilinolatkomplexes mit gerade einmal 15 % sehr niedrig. Wirklich überraschend sind die Ergebnisse für die "Natriumoleatkomplexe". Die erzielten Gastgehalte liegen mit ca. 30 mg/g Komplex für das Dioleat und das Dilinolat bzw. 46 mg/g für das Dilinolenat bei weitem höher als die Gehalte, die bei Verwendung von Natriumcholat erzielt werden. Der Wert des Dilinolenat-Komplexes übersteigt mit 4,6 % den höchsten in der Literatur angegebenen Diglyceridgehalt von 3,2 % um mehr als 40 %. Brauner erreichte dieses Ergebnis bei einer Komplexierung eines 2:1-Gemisches aus Mono- und Diglyceriden.^[69] Bei dem Diglycerid handelte es sich um ein gesättigtes Dipalmitat-stearat.

Daß gerade die Kombination aus Kartoffelamylose und Natriumoleat-Emulgator so hohe Diglyceridgehalte liefert, könnte wie im Fall der Co-Komplexierung von Mono-und Diglyceriden mit einem Synergieeffekt zusammenhängen. Voraus-setzung dafür sind sehr wahrscheinlich sowohl die präorganisierten helikalen Bereiche in der Kartoffelamylose, die von der Gewinnung als Cyclohexanonkomplex herrühren, als auch die Anwesenheit des Natriumoleats. Man kann sich vorstellen, daß in diese Abschnitte zunächst bevorzugt die Natriumoleat-Moleküle eingelagert werden. Dies hat die Ausbildung weiterer helikaler Bereiche zur Folge, in die dann die Diglyceride inkludiert werden. Die Verwendung von Kartoffelamylose führt allerdings nicht zwangsläufig zu höheren Diglyceridgehalten, wie man an den weitaus geringeren Gastgehalten bei Zusatz von Natriumcholat erkennt. Erst die zusätzliche Anwesenheit des Ölsäuresalzes erleichtert die Komplexierung der Glyceride. Die erzielten Komplexausbeuten liegen mit 90 – 95 % sehr hoch, nur beim Dilinolat ist sie mit 50 % etwas geringer. In Tabelle 14 sind die maximal erzielten Komplexgehalte der drei 1,3-Diglyceride mit den optimierten Reaktionsbedingungen nochmals zusammengefaßt.

Diglycerid	Stärke	Emulgator	Lipidzugabe	Temperatur	Ausbeute	Gastgehalt
			(mg/g Amylose)	(° C)	(%)	(mg/g Komplex)
C18:1	KA	Na-Oleat	200	70	94	35 ^(*)
C18:2	KA	Na-Oleat	200	70	52	30
C18:3	KA	Na-Oleat	200	70	92	46

Tab. 14: Maximale Gastgehalte der 1,3-Diglycerid-Komplexe (*): geschätzter Diglyceridgehalt

2.4.3 Stöchiometrie der Diglycerid-Komplexe

Im folgenden sollen entsprechend den Betrachtungen zu den Monoglyceridkomplexen in Kapitel 2.3.5 anhand der geometrischen Ausmaße der 1,3-Diglyceride und der Amylosehelix die maximal erreichbaren Gastgehalte bei vollständiger Belegung der helikalen Bereiche abgeschätzt werden und mit den experimentell erzielten Werten verglichen werden. Hierbei wird sowohl die Einlagerung des gesamten Diglycerid-Moleküls als auch die Komplexierung nur eines Fettsäurerestes in Betracht gezogen. Abbildung 32 zeigt die Kalottenmodelle der drei verwendeten Diglyceride in der für eine Einlagerung idealen linearen Konformation. Wie man sieht, ist aufgrund der beiden sp²hybridisierten Kohlenstoffatome der Carbonylgruppen keine vollständig gestreckte Anordnung möglich, die Moleküle weisen eine leichte Krümmung auf.
1,3-Dioleat:



Abb. 32: Kalottenmodelle der 1,3-Diglyceride in einer ideal linearen Konformation

Speziell bei den höher ungesättigten Diglyceriden bewirkt diese Krümmung eine deutliche Zunahme des Moleküldurchmessers auf 6,5 Å. Theoretisch müßte sich damit die Amylosehelix für eine Komplexierung auf 8 AHGs pro Windung aufweiten. Eine 8er-Helix ist bis jetzt nur im Fall von Amylosekomplexen mit kondensierten Aromaten wie Naphthol^[110] oder Ketoprofen^[111] bekannt und nachgewiesen. Im Fall der langkettigen Diglyceride ist es jedoch auch denkbar, daß die Einlagerung in eine 7er-Helix erfolgt, wobei sich die helikalen Bereiche durch eine leichte Deformation der Krümmung der Moleküle anpassen. Der "effektive" Kettendurchmesser würde sich damit in etwa auf die Werte der Monoglyceride verringern (s. Abb. 19). Erfolgt bei der Komplexierung der Diglyceride lediglich die Einlagerung eines Fettsäurerestes, so entspricht sowohl

die Länge des in der Helix eingeschlossenen Anteils der Diglyceride als auch der dafür notwendige Durchmesser den Werten, die für die Monoglyceride ermittelt wurden. Da es sich bei diesen Betrachtungen lediglich um eine grobe Abschätzung handeln kann, wird vereinfachend angenommen, daß die Inklusion der Diglyceride in allen Fällen eine Amylosehelix mit 7 AHGs pro Windung erfordert. Je nachdem, ob eine oder beide Fettsäurereste komplexiert werden, betragen die theoretischen molaren Verhältnisse in den Komplexen somit:

Diglycerid	eingelagerte Kettenlänge (Å)		AHG/Gastmolekül		theor. molares Verhältnis	
	1 Fettsäure	2 Fettsäuren	1 Fettsäure	2 Fettsäuren	1 Fettsäure	2 Fettsäuren
C18:1	20,5	46,8	17,9	41,0	0,056	0,024
C18:2	19,4	44,6	16,9	39,0	0,059	0,026
C18:3	18,1	43,1	15,9	37,7	0,063	0,027

Tab. 15: Theoretische molare Verhältnisse (Gastmolekül/AHG) der Diglyceridkomplexe

Die molaren Verhältnisse in den Diglycerid-Komplexe mit den höchsten experimentell erzielten Gastgehalten (s. Tab. 14) betragen demgegenüber:

Diglycerid	maximaler	Gastgehalt	AUC/Costmolokiil	exp. molares
	mg/g Komplex	mg/g Amylose	Ang/Gasunoleku	Verhältnis
C18:1	35	36	106,4	0,0094
C18:2	30	31	122,7	0,0081
C18:3	46	48	78,8	0,0127

Tab. 16: Experimentelle molare Verhältnisse der Diglycerid-Komplexe(mit $M_{AHG} = 162, 14, M_{C18:1} = 620, 99, M_{C18:2} = 616, 96, M_{C18:3} = 612, 93)$

Setzt man nun die theoretischen und die experimentellen molaren Verhältnisse zueinander in Relation, so ergibt sich der jeweilige "Füllungsgrad" der Amylose, d. h. der Bruchteil der gesamten AHG-Einheiten, der für die Komplexierung der Diglyceride benötigt wird. Bei der Berechnung in Tabelle 17 wurde bereits der maximale helikale Anteil der Amylose von 86 % berücksichtigt.

Diglycerid	exp. molares Verhältnis : theor. molares Verhältnis				
	eine Fettsäure inkludiert	zwei Fettsäuren inkludiert			
C18:1	0,20	0,46			
C18:2	0,16	0,36			
C18:3	0,23	0,55			

Tab. 17: Belegungsgrade der Diglycerid-Amylose-Komplexe

Je nachdem welches Modell für die Komplexierung der Diglyceride bei der Berechnung zugrunde gelegt wird, ergeben sich Belegungsgrade von ca. 20 – 50 %. Dies würde bedeuten, daß im Fall eines kompletten Eindringens der Diglycerid-Moleküle in das Helixinnere immerhin die Hälfte der Amylose belegt ist. Werden die Diglyceride allerdings nur mit einer Seitenkette komplexiert, so beträgt der unkomplexierte Anteil der Amylose noch etwa 80 %. Eine vollständige Belegung der Amylose mit Diglyceriden ist vermutlich aufgrund der geringen Stabilitätskonstante - wenn überhaupt - erst bei hohen Gastüberschüssen möglich.

2.4.4 Stabilitätsuntersuchungen der 1,3-Diglyceridkomplexe bei erhöhter Temperatur

Weitaus wichtiger als die maximalen Gastgehalte ist für einen industriellen Einsatz solcher Diglyceridkomplexe die Frage, ob durch die Komplexierung eine ebensogute Stabilisierung der oxidationsempfindlichen ungesättigten Verbindungen erreicht wird wie bei den Monoglyceriden. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden Komplexe des Dilinolats und des Dilinolenats mit Kartoffelamylose verwendet, die mit Natriumoleat als Emulgator bei einer Gastzugabe von 200 mg/g Amylose hergestellt wurden. Wegen der verhältnismäßig langsamen Autoxidation der Ölsäurederivate wurde auf eine Dioleatkomplexes Untersuchung des entsprechenden verzichtet. Als Vergleichssubstanzen neben den Komplexen dienen entsprechende Adsorbate aus dem jeweiligen Diglycerid und der Kartoffelamylose, bei denen die Lipide lediglich an der Oberfläche anhaften und somit nicht vor einer Oxidation geschützt sind. Die Diglyceridgehalte der Adsorbate entsprechen dabei mit 3 -5 % in etwa denen der Komplexe. Aus bestimmten Gründen, die im folgenden erklärt werden, wurden die Adsorbate zusätzlich auf der Basis von reinem Maisamylopektin hergestellt. Die Lagerung der Komplexe und der Adsorbate erfolgt analog zu den Untersuchungen der Monoglyceridkomplexe bei 40 °C über Phosphorpentoxid. Der Gastgehalt der Proben wird über einen Zeitraum von 100 Tagen durch GC-Messungen ermittelt (Abb. 33).

Die Stabilitätsmessungen zeigen sehr interessante Ergebnisse. Überraschenderweise sind die Diglyceride auch in den Kartoffelamylose-Adsorbaten erstaunlich gut gegen Oxidation geschützt. Nach einem raschen Abfall in den ersten Tagen stabilisieren sich die Gastgehalte auf einem konstanten Niveau, das bei ca. 40 % der Ausgangswertes liegt. Dies ist einmal mehr ein Indiz, daß in der Kartoffelamylose vororientierte helikale Bereiche existieren, die aus der Gewinnung als Cyclohexanon-Komplex stammen. Schon der einfache Mischungsvorgang der Kartoffelamylose und der Diglyceride für 30 Minuten in Methylenchlorid bei der Herstellung der Adsorbate reicht anscheinend aus, um eine gewisse Menge der Moleküle zu komplexieren. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden die Diglyceride nach dem gleichen Verfahren zusätzlich auf Maisamylopektin adsorbiert, das überhaupt keine helikalen Bereiche aufweisen sollte. Wie man in Abbildung 33 erkennt, werden die ungesättigten Diglyceride in diesen Amylopektin-Adsorbaten innerhalb kürzester Zeit vollständig oxidiert. Das beweist, daß der Schutz der Diglyceride in den Kartoffelamylose-Adsorbaten tatsächlich auf eine teilweise Inklusion ihrer Fettsäurereste während des Herstellungsprozesses zurückzuführen ist. Bei den Stabilitätsuntersuchungen der Monoglyceridkomplexe konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden, da in diesem Fall sämtliche Adsorbate entsprechend den Komplexen auf der Basis von Highamylomaisstärke hergestellt wurden.



Abb. 33: Stabilität komplexierter (K) und adsorbierter (A) 1,3-Diglyceride bei 40 °C (KA: Kartoffelamylose, AP: Maisamylopektin)

Bei den Stabilitätsmessungen der Diglycerid-Komplexe zeigt sich, daß das Dilinolenat weitaus besser vor einem oxidativen Abbau geschützt ist als das weniger ungesättigte Dilinolat. Der Gehalt des C18:2-Diglycerid-Komplexes sinkt innerhalb der ersten Tage um etwa 30 %, danach bleibt er nahezu konstant. Diese Abhängigkeit deutet auf einen großen Anteil an ungeschützten Doppelbindungen hin und könnte durch eine Einlagerung nur eines Fettsäurerestes erklärt werden. Allerdings sollte in diesem Fall der Gastgehalt theoretisch auf die Hälfte des Ausgangswertes absinken. Insofern muß zumindest ein Teil der Diglyceride vollständig in der Amylosehelix inkludiert sein. Im Vergleich dazu beträgt die oxidativ bedingte Reduzierung des Dilinolenatgehaltes im Kartoffelamylose-Komplex nur ca. 10 %. Diese hohe Stabilisierung kann ausschließlich mit einer vollständigen Einlagerung nahezu sämtlicher Diglyceridmoleküle erklärt werden.

Die Stabilitätsuntersuchungen beweisen eindeutig die Komplexierung der 1,3-Diglyceride. Zudem zeigt sich, daß die Moleküle in der Lage sind, eine lineare Konformation, ähnlich der in Abbildung 32 gezeigten, anzunehmen, die es ihnen ermöglicht, in das Helixinnere einzudringen. Im Fall des C18:2-Diglycerids erfolgt die Komplexierung wahrscheinlich jedoch zu einem großen Teil nur durch Einlagerung eines Fettsäurerestes, was eine Oxidation derjenigen Ketten zur Folge hat, die sich außerhalb der Helix befinden und damit ungeschützt sind. Das C18:3-Diglycerid scheint demgegenüber fast vollständig in die Amylosehelix eingeschlossen zu werden. Möglicherweise liegt im ersten Fall ein ungünstiges Verhältnis zwischen dem sterischen Anspruch der Gastmoleküle und dem ausgebildeten Helixdurchmesser vor, so daß ein Eindringen beider Fettsäurereste gehindert ist.

2.5. Triglycerid-Komplexe

2.5.1 Vorausgehende Betrachtungen

Über die Komplexierung von Triglyceriden mit Stärke bzw. Amylose existieren in der Literatur zwar relativ viele Untersuchungen, sie widersprechen sich aber zum Teil gegenseitig. Meuser^[112] beobachtet bei der Kochextrusion von Weizenstärke und Erdnußfett eine Abnahme des Iodbindevermögens der Stärke, aus der er auf die Bildung von Triglyceridkomplexen mit einem Gastgehalt von ca. 1 % schließt. Sowohl Bhatnagar^[71, 113] als auch Mercier^[72] bestreiten dagegen die Komplexierung von Triglyceriden durch Extrusion, da in den Röntgendiffraktometermessungen der Extrudate keinerlei charakteristische V-Amylose-Strukturen, an denen man normalerweise die Bildung von Inklusionskomplexen eindeutig erkennen kann, auftraten. Die Röntgenaufnahmen der Triglycerid-Stärke-Extrudate unterschieden sich nicht von denen nativer Stärke.

Bei der Darstellung von Triglycerid-Amylose-Komplexen aus Lösung konnten Liu^[114] und auch Robinson^[89] nach der Aufarbeitung eine Abnahme des Iodbindevermögens der Amylose messen; anschließend durchgeführte DSC-Messungen ergaben allerdings keinen Aufschluß über eine tatsächliche Einlagerung. Navarro^[115] untersuchte den Einfluß von Lipiden auf das rheologische Verhalten von Stärkelösungen. Während die Zugabe von Monoglyceriden durch Bildung von Einlagerungskomplexen eine deutliche Abnahme des Quellungs-vermögens der Stärke bewirkte, ergaben sich mit Triglyceriden überhaupt keine Veränderungen.

Die meines Wissens einzige Arbeit über die Stabilisierung von ungesättigten Triglyceriden stammt von Yoshii.^[62] Er vermengte α-Cyclodextrin mit einem hoch ungesättigten Öl, dessen DHA-Anteil bei 45 % lag, in einer Doppelschneckenapparatur und bestimmte anhand der Peroxidbildung den zeitlichen Verlauf der Autoxidation. Ein Vergleich mit dem rohen, nicht behandelten Öl zeigte eine deutliche Zunahme der Stabilität. Eine genauere Untersuchung, ob die geringere Oxidationsempfindlichkeit tatsächlich auf die Bildung von Cyclodextrin-Triglycerid-Komplexen zurückzuführen ist, oder ob alleine die "Einlagerung" in die Kohlenhydratmatrix diesen Schutz bewirkt, erfolgte jedoch nicht.

Der wichtigste Punkt, der nach Auffassung der meisten Autoren gegen eine Einlagerung der Triglyceride in die Amylosehelix spricht, ist die sterische Hinderung der drei Fettsäurereste. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit Hilfe eines Kalottenmodelles von Trioleat eine Abschätzung der Molekülausmaße durchgeführt. Mit der zusätzlichen Fettsäure am Glycerinrest wird, im Gegensatz zu den Diglyceriden, eine vollständig lineare Anordnung des Moleküls unmöglich. Durch die parallele Anordnung zweier Ketten kann jedoch eine "stuhlförmige" und damit relativ kompakte Konformation eingenommen werden (Abb. 34). Diese Struktur entspricht der sogenannten β -Form, wie sie auch in Kristallstrukturen von Triglyceriden auftritt.^[116]



Abb. 34: Kalottenmodell des Trioleats

Obwohl die beiden Fettsäurereste in 1- und 2-Position in dieser Konformation nahezu perfekt parallel ausgerichtet sind, beträgt der daraus resultierende Gesamtdurchmesser des Trioleats etwa 10 Å. Da der maximale Innendurchmesser der Amylosehelix selbst bei einer Aufweitung auf 8 AHGs pro Windung lediglich bei 8 Å liegt, ist eine Einlagerung eines kompletten Triglyceridmoleküls in das Helixinnere ausgesprochen unwahrscheinlich. Eine denkbare Alternative wäre allerdings die Komplexierung nur eines Fettsäurerestes, wie es teilweise auch im Fall der Diglyceride geschieht. Alternativ könnten auch zwei oder sogar alle drei Fettsäureketten eines Triglycerides in verschiedenen Amylosehelices inkludiert werden.

2.5.2 Synthese der Triglyceride

Die Tatsache, daß es sich bei den zu untersuchenden Triglyceriden um die symmetrischen Verbindungen Trioleat, Trilinolat und Trilinolenat handelt, machte ihre Synthese einfach. Die Veresterung des Glycerins mit den jeweiligen Fettsäuren konnte in einem Schritt ohne den Einsatz von Schutzgruppen erfolgen. Ein Problem dabei war lediglich, ein Lösungsmittel zu finden, in dem sich sowohl das hochpolare Glycerin als auch die langkettigen Fettsäuren lösen. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Kopplung wurde daher mit DCC/DMAP in THF anstatt in CCl₄ durchgeführt. Obwohl bei der Reaktion ein Überschuß an Fettsäuren eingesetzt wurde, waren die erzielten Ausbeuten mit ca. 15 % niedrig. Möglicherweise ist die Kopplung des dritten Fettsäurerestes an das Glyceringerüst sterisch gehindert.



Abb. 35: Darstellung der symmetrischen Triglyceride

2.5.3 Komplexierung der symmetrischen Triglyceride

Die ersten Versuche zur Komplexierung der Triglyceride erfolgten grundsätzlich nach dem gleichen Schema wie der der Mono- und Diglyceride. Allerdings zeigte sich, daß sowohl Natriumoleat als auch Natriumcholat für die Darstellung von Triglycerid-Wasser-Emulsionen nicht geeignet sind, da auch nach längerer Ultraschallbehandlung nur eine unvollständige Emulgierung der Lipide errreicht werden konnte. Zudem trat bereits nach wenigen Stunden eine deutliche Phasentrennung auf. Trotzdem wurden einige Tests zur Einlagerung von Trioleat sowohl mit AM70-Stärke als auch mit Kartoffelamylose bei unterschiedlichen Komplexierungstemperaturen unternommen. Im Gegensatz zu den Mono- oder Diglyceride, bei denen man direkt nach ihrer Zugabe zu den Amyloselösungen die beginnende Komplexierung an einer spontan einsetzenden Trübung erkennen konnte, blieben die Lösungen bei Zugabe der Triglycerid-Emulsionen nahezu klar. Erst über Nacht bildete sich ein Niederschlag. Die Gastgehalte in den gefriergetrockneten Präzipitaten betrugen nach Behandlung mit Methylenchlorid in fast allen Fällen nur zwischen 2 und 6 mg/g Komplex. Selbst bei der Verwendung von Kartoffelamylose und Natriumoleat als Emulgator, deren Kombination bei der Komplexierung der Diglyceride sich als optimal herausgestellt hat, lag der gemessene C18:1-Gehalt im Bereich der eingesetzten Emulgatormenge. Der Anteil der ausgefallenen Stärke lag dagegen stets bei 60 – 90 %. Blindversuche ohne Gastzugabe zeigten das gleiche Ergebnis, so daß die Bildung des Niederschlages auf eine Retrogradation der Amylose zurückgeführt werden konnte.

Um eine bessere Emulgierung der Triglyceride zu gewährleisten, wurde versucht, die gesamte Komplexierung bei gleichzeitiger Ultraschallbehandlung durchzu-führen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß der hohe Energieeintrag der permanenten Ultraschallwellen ein Abkühlen der Komplexierungslösung verhindert. Das Wasserbad wurde daher mit einer externen Kühlvorrichtung versehen, wobei die Kühlleistung so eingestellt wurde, daß das Absenken der Badtemperatur - und damit der Komplexlösung - auf Raumtemperatur wie im Normalfall mehrere Stunden benötigte. Dieses Verfahren brachte aber ebenfalls keine Steigerung der eingeschlossenen Menge Trioleat, so daß nach einer anderen Möglichkeit zur Verbesserung der Emulsionseigenschaften gesucht werden mußte.

Ein weiterer Emulgator, der z. B. bei der Darstellung von Amylosekomplexen wasserunlöslicher Aromastoffe wie dem langkettigem Decanal verwendet wird, ist Phospholipon 90 H, einem Phosphatidylcholin (Lecithin).^[117]



Abb. 36: Struktur von Phospholipon 90 H

Aufgrund der sehr ähnlichen Struktur sollten die Triglyceride gut in die vom Lecithin gebildeten Liposomen eingebaut und damit emulgiert werden. Die strukturelle Verwandtschaft führt auf der anderen Seite dazu, daß die Fähigkeit, durch Inklusion der langkettigen Fettsäurereste Amylosekomplexe zu bilden, für beide Substanzen in etwa gleich sein sollte. Der Einfluß der polaren Cholingruppe auf eine mögliche Einlagerung läßt sich nur schwer abschätzen. In der Literatur wird die Existenz von Amylose-Lecithinkomplexen jedoch grundsätzlich ausgeschlossen.^[105, 118]

Die Herstellung der Triglycerid-Lecithin-Emulsionen erfolgte analog zu den Natriumcholat-Emulsionen in einer 1 %igen wäßrigen Lösung von Phospholipon 90H, wobei das Verhältnis von Emulgator, Lipid und Wasser 1:5:100 betrug. Wie vermutet, erhielt man nach ca. 60 minütiger Ultraschallbehandlung stabile milchig-weiße Emulsionen. Sämtliche weiteren Komplexierungsversuche wurden mit Kartoffelamylose durchgeführt, da die darin enthaltenen vorgebildeten helikalen Bereiche im Fall der zu erwartenden geringen Komplexierungsneigung der Triglyceride eine Einlagerung der Fettsäureketten begünstigen sollten. Bei der Zugabe der Lecithinemulsionen zu den Amyloselösungen beobachtete man eine spontan auftretende Trübung, was auf die Bildung von unlöslichen Komplexen hindeutet. Der Anteil der ausgefallenen Menge Amylose lag bei 80 – 90 %. Allerdings betrug erstaunlicherweise der Trioleatgehalt in den Präzipitaten unabhängig von der gewählten Komplexierungstemperatur nicht mehr als 5 - 8 mg/g Komplex. Weiterhin traten in den GC-Analysen die Signale der C16:0- und C18:0-Fettsäure des Lecithins auf. Obwohl die angebotene Menge des Trioleats fünfmal höher lag als die Emulgatormenge, betrug das Verhältnis in der Kartoffelamylose nahezu 1 : 1.

Ein Grund für den geringen Triglyceridgehalt in den Proben könnte darin liegen, daß durch die Behandlung mit Methylenchlorid ein Großteil der komplexierten Triglyceridmoleküle herausgewaschen wird. Für den Fall, daß in den Komplexen nur ein Fettsäurerest inkludiert wird, befinden sich die beiden restlichen Ketten außerhalb der Amylosehelix und können damit gerade von unpolaren Lösungsmitteln gut solvatisiert werden. In diesem Fall ist es denkbar, daß die Stabilität des Triglycerid-Amylosekomplexes nicht ausreicht, um die Dissoziation bzw. das Herauslösen des inkludierten Fettsäurerest aus der Helix zu verhindern. Aus diesem Grund wurde daraufhin der Triglyceridgehalt der Komplexe vor und nach der Behandlung mit Methylenchlorid bestimmt. Des weiteren wurde die Dauer des "Waschvorganges" auf 30 Sekunden beschränkt. Abbildung 37 zeigt die erhaltenen Werte für die Komplexierung aller drei Triglyceride mit Phospholipon 90H als Emulgator und einer Gastzugabe von 200 mg/g Amylose. Die Komplexierungstemperatur betrug 70 °C.



Abb. 37: Gastgehalte der Triglyceridkomplexe vor und nach der Behandlung mit Methylenchlorid

Die Gastgehalte der gefriergetrockneten Präzipitate liegen vor der Behandlung mit Methylenchlorid bei weitem höher als nachher. Selbst die extrem kurze Kontaktzeit von 30 Sekunden reicht dazu aus, fast 90 % der Lipidmenge aus den Komplexen herauszuwaschen. Um herauszufinden, ob es sich hier um eine instabile aber tatsächliche Komplexierung, oder lediglich um eine Adsorption der Triglyceride auf der Oberfläche der Amylose handelt, bietet es sich an, Stabilitätsuntersuchungen der unbehandelten Niederschläge durchzuführen. Im Fall einer Komplexierung sollte zumindest ein Teil der ungesättigten Fettsäurereste vor einem oxidativen Abbau geschützt sein.

2.5.4 Stabilitätsuntersuchungen der Triglyceridkomplexe bei erhöhter Temperatur

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden die unbehandelten C18:2- und C18:3-Komplexe zusammen mit den entsprechenden reinen Adsorbaten bei 40 °C gelagert. Die Adsorbate wurden aufgrund der Ergebnisse bei den Diglyceriden nicht wie die Komplexe auf der Basis von Kartoffelamylose hergestellt, sondern mit Maisamylopektin, das keinerlei Komplexierungsfähigkeit besitzt. Ansonsten erfolgte die Darstellung nach dem üblichen Verfahren. In Abbildung 38 ist der Verlauf der Stabilitätskurven graphisch dargestellt.



Abb. 38: Stabilitäten von adsorbiertem (A) bzw. komplexiertem (K) Trilinolat und Trilinolenat bei 40 °C

Die Meßreihe konnte bereits nach 10 Tagen abgebrochen werden, da sowohl die ungesättigten Triglyceride in den Adsorbaten als auch in den Komplexen durch Autoxidation vollständig abgebaut worden waren. In den GC-Analysen war kein Linolat bzw. Linolenat mehr nachweisbar. Aus den identischen Kurvenverläufen der Adsorbate und der Komplexe kann man schließen, daß es sich im Fall der unter Komplexierungsbedingungen dargestellten Produkte ebenfalls nur um Adsorbate handelt. Sämtliche Fettsäureketten der Triglyceride befinden sich außerhalb der Amylosehelices und sind somit ungeschützt gegen Oxidation. Selbst der geringe Anteil von ca. 5 mg/g Amylose, der nach der Behandlung mit Methylenchlorid noch in den Präzipitaten vorhanden ist, ist nicht inkludiert, sondern befindet sich wahrscheinlich im Inneren der Stärkematrix zwischen den Amylosemolekülen. Dort sind die Triglyceride zwar vor einer Solvatation durch das Lösungsmittel geschützt, nicht aber vor dem Angriff von Sauerstoff, der die Autoxidation einleitet. Die Bildung von Einlagerungskomplexen von Triglyceriden und Amylose kann aufgrund der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen ausgeschlossen werden. Interessant ist aber, daß alleine schon die Anlagerung der Triglyceride an die Amylose ein Ausfallen aus der Lösung bewirkt. Von den 200 mg Lipid/g Amylose, die sich in der Lösung befinden, werden ca. 20 - 30 % an der Oberfläche adsorbiert.

2.5.5 Komplexierungsversuche mit 1,3-Dibutyroyl-triglyceriden

Ein plausibler Grund für die fehlende Komplexierungsfähigkeit der Triglyceride ist sicherlich die sterische Hinderung durch die drei Fettsäurereste. Während die Einlagerung eines gesamten Moleküls in eine Amylosehelix, wie gezeigt, grundsätzlich nicht möglich erscheint, dürfte auch die Komplexierung von nur einem Fettsäurerest behindert sein, da das Triglycerid dafür eine Y-artige Konformation einnehmen muß, in der der eingelagerte Rest entgegengesetzt zu den anderen beiden orientiert ist. Um den Einfluß der sterischen Hinderung auf die Komplexierung genauer zu untersuchen, wurden spezielle Triglyceride synthetisiert, bei denen sich in 1- und 3- Position kurzkettige Buttersäurereste befinden und lediglich die 2-Position mit einer der ungesättigten C18-Fettsäuren verestert ist. Sollte der Grund für das Scheitern der Komplexierung im Fall der symmetrischen Triglyceride tatsächlich in der gegenseiteigen Beeinflussung der drei langkettigen Fettsäurereste liegen, so sollte bei den Dibutyroyltriglyceriden die Inklusion der C18-Fettsäure weitaus einfacher möglich sein. Wie man am Beispiel der geometrieoptimierten Struktur des 1,3-Dibutyroyl-2-oleoylglycerins in Abbildung 39 erkennt, ist die sterische Hinderung der Buttersäuregruppen in Hinblick auf eine Komplexierung des Ölsäurerestes minimal.



Abb. 39: Energieminimierte Struktur von 1,3-Dibutyroyl-2-oleoyl-glycerin (berechnet mit HyperChem[™]; Kraftfeld: MM+)

Rein strukurell gesehen besteht eine große Ähnlichkeit zwischen den Dibutyroyltriglyceriden und langkettigen 2-Monoglyceriden, was sogar Auswirkungen auf ihre ernährungsphysiologischen Eigenschaften hat. Es wird vermutet, daß die Adsorption solcher Triglyceride im Darm wie im Fall der Monoglyceride ohne vorhergehende Hydrolyse durch Verdauungsenzyme möglich ist.^[119] Dies läßt den Schluß zu, daß sich das Komplexierungsverhalten der 1,3-Dibutyroyltriglyceride von dem der symmetrischen Triglyceride unterscheiden sollte.

Ihre Synthese geht aus von 1,3-Dibrom-2-propanol, das im ersten Schritt mit dem Natriumsalz der Buttersäure umgesetzt wird. Erstaunlicherweise enthält das entstehende Dibutyroylglyerin neben dem gewünschten 1,3-Isomer ca. 20 % des 1,2-Derivates. Eine destillative Trennung der beiden Konstitutionsisomere war aufgrund der eng beeinander liegenden Siedepunkte nicht möglich. Nach der Kopplung der langkettigen Fettsäure mit DCC/DMAP konnten die beiden Regioisomere jedoch problemlos säulenchromatographisch voneinander getrennt werden.



Abb. 40: Darstellung der 1,3-Dibutyroyltriglyceride

Die Darstellung der 1,3-Dibutyroyltriglycerid-Komplexe erfolgte analog zu der der symmetrischen Triglyceride mit Kartoffelamylose unter Verwendung des Lecithinemulgators Phospholipon 90H bei einer Gastzugabe von 200 mg/g Amylose. Leider konnten auch hier keine Inklusionskomplexe mit Amylose isoliert werden. Genau wie im Fall der symmetrischen Triglyceride enthielt zwar die ausgefallene Amylose eine relativ große Menge an Dibutyroyltriglycerid von bis zu 80 mg/g, eine kurze Behandlung mit Methylenchlorid führte allerdings zu einer Abnahme des Gastgehaltes um mehr als 90 %. Die Vermutung, daß dies nicht auf eine Dissoziation der Triglycerid-Amylosekomplexe bzw. auf ein Herauslösen von bereits inkludierten C18-Fettsäureketten durch das Lösungsmittel beruhte, bestätigte sich in anschließenden Stabilitätsuntersuchungen von unbehandelten Präzipitaten. Die ungesättigten Fettsäuren der Dibutyroyltriglyceride wurden innerhalb weniger Tage vollständig oxidiert. Es findet keine Stabilisierung und damit keine Komplexbildung zwischen Amylose und Triglyceriden statt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann somit aber eine mögliche sterische Hinderung der drei Fettsäurereste als alleiniger Grund für die nicht beobachtete Inklusion ausgeschlossen werden. Einen großen Einfluß auf die Komplexbildung hat sicherlich ebenso das Phasenverhalten der Triglyceride. Es ist denkbar, daß die Triglyceride bei der Emulgierung durch das Lecithin in den gebildeten Liposomen vollständig eingeschlossen werden, und somit nicht für eine Einlagerung der Fettsäureketten in die Amylosehelices zur Verfügung stehen. Es kommt wahrscheinlich lediglich zu einer Adsorption der geladenen Vesikel auf der polaren Oberfläche der Amylose. Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens war im Rahmen dieser Arbeit jedoch leider nicht mehr möglich.

2.6 DSC-Messungen

Zur genaueren Charakterisierung der Monoglycerid- und Diglyceridkomplexe wurden DSC-Messungen durchgeführt, mit denen man Aussagen über ihr thermisches Verhalten erhält. Die Kenntnis der thermischen Stabilität, d. h. ob und bei welchen Temperaturen die Komplexe zerfallen oder sich umlagern, ist gerade bei der technischen Verwendung und Verarbeitung von großer Bedeutung. Die Dissoziation der Amylose-Lipid-Komplexe ist in den DSC-Kurven als charakteristischer endothermer Peak erkennbar, wobei man die Temperatur am Peakmaximum als Umwandlungs- oder Desintegrationstemperatur der Komplexe bezeichnet. Die Fläche unter der Kurve entspricht der benötigten Umwandlungsenthalpie.

Für die Messungen werden ca. 25 mg trockener Komplex unter Zugabe der vierfachen Menge Wasser in einen druckdichten Tiegel exakt eingewogen, und von Raumtemperatur bis 150 °C mit einer Rate von 5 °C/min aufgeheizt. Als Referenzprobe dient ein Tiegel, der reines Wasser enthält. Abbildung 41 zeigt die Thermogramme der Kartoffelamylose-Komplexe von Monooleat, Monolinolat und Monolinolenat. Hierbei handelt es sich jeweils um die Komplexe mit den höchsten erzielten Gastgehalten. Die Dissoziation der Komplexe erfolgt bei 90 – 100 °C, wobei die Desintegrationstemperatur mit steigender Anzahl an Doppelbindungen sinkt.



Abb. 41: DSC-Kurven der Monoglycerid-Kartoffelamylose-Komplexe

Die Ergebnisse stimmen mit denen von Karkalas^[103] und Stute^[120] überein, die im Fall von Amylosekomplexen ungesättigter Fettsäuren ebenfalls sinkende Dissoziationstemperaturen mit zunehmendem Grad an Ungesättigtheit ermittelten. Während allerdings Stute eine Abnahme konstante der Umwandlungstemperatur von ca. 8 °C pro Doppelbindung beobachtete, nimmt bei den Untersuchungen von Karkalas - wie auch im vorliegenden Fall - die Differenz der Peakmaxima mit steigender Anzahl an Doppelbindungen ab. Eine Erklärung für den relativ großen Unterschied zwischen der Umwandlungstemperatur des C18:1-Komplexes und der der beiden höher ungesättigten Komplexe, zwischen denen eine weitaus geringere Differenz besteht, könnte in den unterschiedlichen Helixdurchmessern der Amylose liegen. Wie anhand der Stöchiometrieuntersuchungen der Monoglyceridkomplexe in Kapitel 2.3.5 gezeigt werden konnte, liegt im Monooleat-Komplex eine 6er-Helix vor, während in den Komplexen der sterisch anspruchsvolleren C18:2- und C18:3-Monoglyceride eine Aufweitung der Helix auf 7 AHG-Einheiten pro Windung wahrscheinlich ist. Anscheinend besitzt eine 6er-Helix eine höhere Stabilität als eine 7er-Helix, was sich in der höheren Dissoziationstemperatur des

entsprechenden Komplexes bemerkbar macht. Der tatsächliche Einfluß der Ungesättigtheit ist dagegen nur gering, wie man anhand eines Vergleiches der Desintegrationstemperaturen des Monolinolat- und des Monolinolenatkomplexes erkennt. Die zusätzliche Doppelbindung im dreifach ungesättigten Monoglycerid führt lediglich zu einer Verschiebung des Peakmaximums um etwa 2 °C.

Die Dissoziationsenthalpien der Komplexe sind neben der Helixgeometrie und der Anzahl der Doppelbindungen hauptsächlich abhängig von dem Gastgehalt bzw. dem Füllungsgrad der Amylose. Da sämtliche Komplexe nahezu vollständig gefüllt sind (s. Tab. 12), sind auch die normalisierten (d. h. auf die Einwaage bezogenen) Enthalpien fast gleich. Der Wert für den C18:3-Komplexe liegt mit 17 J/g um ca. 10 % niedriger als die beiden anderen, was sowohl auf die etwas geringere Belegung als auch auf eine sinkende Stabilität des Komplexes zurückgeführt werden kann.

Erstaunlicherweise zeigen die Monoglyceridkomplexe mit AM70-Stärke ein völlig anderes thermisches Verhalten (Abb. 42).



^endotherm

Abb. 42: DSC-Kurven der Monoglycerid-AM70-Komplexe

Alle drei DSC-Kurven weisen eine deutliche Bimodalität auf, d. h. während des Aufheizens der Stärkekomplexe treten zwei Umwandlungen bzw. Desintegrationen auf. Die Temperatur am ersten Peakmaximum stimmt bis auf ca. 2 °C mit der Dissoziationstemperatur der entsprechenden Kartoffelamylosekomplexe überein. Es findet jedoch zusätzlich eine zweite endotherme Umwandlung bei 110 - 115 °C statt. Das Verhältnis der beiden Peakflächen ist bei den drei Komplexen sehr unterschiedlich. Während bei dem C18:1- und C18:2-Komplex der zweite Peak nur einen relativ kleinen Anteil an der Gesamtenthalpie besitzt, sind die benötigten Energiemengen für die beiden Umwandlungen im Fall des Monolinolenatkomplexes nahezu gleich. Der einzige Unterschied zwischen den Kartoffelamylose- und den Highamylomais-Komplexen liegt in der verwendeten Stärke. Alle anderen Parameter bei der Darstellung der Komplexe wie Emulgator, Komplexierungstemperatur und Gastzugabe sind gleich, und auch die Aufnahme der DSC-Thermogramme erfolgte unter den selben Versuchsbedingungen. Die erste Vermutung wäre daher, daß die beiden Peaks zwei verschiedene Amylose- bzw. Stärkefraktionen in der AM70-Stärke repräsentieren. In Kapitel 2.2.1 wurde ja bereits das Auftreten von komplexierungsfähigen, schwach verzweigten Amylosen neben den reinen Amylose- und Amylopektinfraktionen diskutiert. Diese Möglichkeit ist jedoch insofern unwahrscheinlich, da Biliaderis ebenfalls das Auftreten von zwei endothermen Umwandlungen bei einem Monopalmitinkomplex mit reiner Amylose beobachete, die eine nahezu unimodale Verteilung aufwies. Die Theorie von Raphaelides und Karkalas^[121], bei den zwei Umwandlungen würde es sich um die Dissoziation von nebeneinander vorliegenden 6er- und 7er-Helices handeln, erscheint aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen ebenso zweifelhaft.

Das Auftreten zweier endothermer Peaks in den DSC-Thermogrammen von Amylose-Lipidkomplexen wurde auch an anderen Stellen in der Literatur beschrieben.^[103, 120-124] Die genauen Hintergründe dieses Phänomens sind bis heute noch nicht restlos aufgeklärt. Es wird überwiegend angenommen, daß es sich um zwei verschiedene Komplexstrukturen handelt, die sich im Grad der Kristallinität unterscheiden. Biliaderis führte für die beiden Formen die Bezeichnungen Typ I und Typ II ein.^[124] Die helikale V-Amylose nimmt in den Lipidkomplexen eine lamellenartige Struktur ein, in der die Amyloseketten in der Art gefaltet sind, daß sie senkrecht zu der Oberfläche der Lamellen angeordnet sind. Im Amylose-Lipidkomplex des Typs I besitzen die Lamellen einen geringen Ordnungsgrad, so daß der gesamte Komplex eine amorphe Struktur aufweist. Der Typ II dagegen enthält ausgedehnte kristalline Bereiche, in denen die Amyloseketten in einem hochgeordneten Zustand vorliegen (Abb. 43). Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der Desintegrationstemperatur.



Abb. 43: Modell der beiden Amylose-Lipidkomplex-Formen

Beim Aufheizen eines Typ I-Komplexes besteht die endotherme Umwandlung in einer Disaggregation der Amyloseketten bzw. –helices und einer Dissoziation der Komplexe in Amylose und freie Lipidmoleküle. Im Fall der Typ II-Komplexe muß zusätzlich die Energie für das Aufschmelzen der Kristallite aufgebracht werden. Eine Umwandlung der amorphen in die kristalline Form kann durch langzeitiges Tempern eines Typ I-Komplexes oberhalb seiner Desintegrationstemperatur erreicht werden.^[103, 120] Biliaderis konnte zeigen, daß bei der Darstellung von Monoglycerid-Amylose-Komplexen die gewählte Komplexierungstemperatur einen maßgeblichen Einfluß auf den gebildeten Komplextyp hat.^[124] Während bei einer Komplexierungs-temperatur von 60 °C ausschließlich Typ I-Komplexe entstehen, führt eine Komplexierung bei 90 °C zur Bildung der Typ II-Form. Dies widerspricht allerdings den Ergebnissen dieser Arbeit, da die Komplexierungstemperatur bei der Darstellung sämtlicher vermessener AM70-Komplexe bei 70 °C lag und dennoch Typ II-Komplexe in den DSC-Thermogrammen nachgewiesen werden konnten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten der kristallinen Typ II-Komplexe, die auch von Stute^[120] diskutiert wird, ist, daß sie erst im Laufe der DSC-Messung gebildet werden. Während der Desintegration des Typ I-Amylosekomplexes bei ca. 100 °C kommt es teilweise zur Kristallisation der Amyloseketten, d. h. zur Bildung der Typ II-Modifikation mit einem höheren Ordnungsgrad und einem DSC-Peakmaximum bei etwa 115 °C. Erst bei einer Erhöhung der Temperatur desintegriert auch diese gerade gebildete kristalline Form des Amylose-Lipid-Komplexes durchgeführten endgültig. Warum jedoch bei den hier Untersuchungen Bildung die der Typ II-Form nur bei den Highamylomaisstärke-Monoglyceridkomplexen auftritt und nicht bei den Kartoffelamylose-Komplexen ist unklar. Wahrscheinlich spielen dabei strukturelle Unterschiede der beiden Amylosen eine Rolle, die je nachdem eine Kristallisation der helikalen Amyloseketten begünstigen bzw. verhindern.

Da die Peaks für die Desintegration der beiden Komplextypen in den der AM70-Komplexe keine genügend scharfe Trennung Thermogrammen aufweisen und somit eine exakte Bestimmung der einzelnen Peakflächen nicht möglich ist, wurden die Umwandlungsenthalpien durch Integration beider Peaks als Gesamtenthalpien bestimmt. Ein Vergleich mit den Werten, die für die Kartoffelamylose-Komplexe ermittelt wurden, zeigt, daß die normalisierten Umwandlungsenthalpien des Monolinolat- und des Monolinolenatkomplexes ca. 10 % geringer sind, was auf die etwas geringeren Gastgehalte der AM70-Komplexe zurückzuführen ist. Erstaunlich ist der sehr hohe Wert von fast 27 J/g für den C18:1-Komplex. Der Verlauf der DSC-Kurve im unteren Temperaturbereich, in dem man bei 85 °C ansatzweise einen weiteren Peak erkennt, läßt jedoch vermuten, daß neben der Dissoziation des Lipidkomplexes noch ein anderer endothermer Umwandlungsprozess einen Beitrag zur Gesamtenthalpie leistet. Hierbei könnte es sich um eine Verkleisterung von nicht komplexierter Stärke handeln; normalerweise beobachtet man den damit verbundenen endothermen Effekt allerdings nur bei der thermoanalytischen Untersuchung von nativen Stärken.^[120]

Im Fall der Diglyceride wurden lediglich die Komplexe vermessen, die mit Kartoffelamylose und Natriumoleat hergestellt wurden, da sie einen weitaus höheren Gastgehalt aufweisen als alle anderen. Die entsprechenden DSC-Kurven sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Thermogramme enthalten genau wie die Kartoffelamylose-Komplexe der Monoglyceride nur einen endothermen Peak.



Abb. 44: DSC-Kurven der Diglycerid-Kartoffelamylose-Komplexe

Erstaunlicherweise zeigen die Diglyceridkomplexe eine unerwartet hohe Thermostabilität. Das Peakmaximum des Dioleatkomplexes liegt bei 120 °C und damit fast 20 °C über dem des Monooleatkomplexes. Auch die Dissoziation des Dilinolatkomplexes erfolgt bei etwas höheren Temperaturen verglichen mit der entsprechenden Einschlußverbindung des C18:2-Monoglycerids. Die Umwandlungstemperatur der C18:3-Komplexe ist in etwa gleich, aber selbst dies ist überraschend, angesichts der weitaus geringeren Komplexierungsneigung der Diglyceride. Anscheinend sind die Diglyceridkomplexe, sobald sie sich einmal gebildet haben, außerordentlich stabil. Eine Erklärung dafür könnte in der Länge der Moleküle von ca. 45 Å liegen, die zur Folge hat, daß für ihre Einkomplexierung rund 40 AHG-Einheiten benötigt werden (s. Tab. 15). Die Inklusion eines Monoglycerids erfolgt dagegen mit Hilfe von nur 16 – 18 AHGs. Bei der Freisetzung eines eingelagerten Diglyceridmoleküls müssen also weitaus mehr Wechselwirkungen zu der umgebenden Amylosehelix aufgehoben werden als bei einem Monoglycerid. Die höhere Stabilität der Diglyceridkomplexe spiegelt sich auch in den Umwandlungsenthalpien wider, sobald man sie in Abhängigkeit der Gastgehalte betrachtet. Für die Dissoziation der Komplexe müssen ca. 0,3 J/mg Lipid aufgebracht werden, während die entsprechenden Werte für die Monoglyceridkomplexe nur etwa 0,2 J/mg betragen. Aufgrund der mit inkludierten Natriumoleat-Moleküle, deren Freisetzung vermutlich in etwa die gleiche Energiemenge benötigt wie die der Monoglyceride, liegt die Dissoziationsenthalpie für die Diglyceridkomplexe in Wirklichkeit sogar noch höher. Sämtliche Daten der DSC-Messungen sind in Tabelle 18 nochmals zusammengefaßt.

Glycerid	Stärke	Gastgehalt des	$\mathbf{T}^{1}_{\mathrm{Diss}}$	T^2_{Diss}	ΔH_{Diss}	ΔH_{Diss}
Giyceria		Komplexes (mg/g)	(°C)	(°C)	(J/g Komplex)	(J/mg Gast)
MG-C18:1	KA	106	101,8		19,16	0,18
	AM70	110	99,5	114,2	26,64	0,24
MG-C18:2	KA	96	93,6		18,87	0,20
	AM70	95	91,4	110,9	16,93	0,18
MG-C18:3	KA	98	91,1		17,02	0,17
	AM70	94	87,6	108,3	15,33	0,16
DG-C18:1	KA	43	119,5		12,55	0,29
DG-C18:2	KA	34	99,5		10,87	0,32
DG-C18:3	KA	49	90,1		15,95	0,33

Tab. 18: Umwandlungstemperaturen und -enthalpien der Mono- (MG) und
Diglyceridkomplexe (DG)

2.7 Rheologische Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit, die Bildung von Einlagerungskomplexen nachzuweisen bzw. zu verfolgen, besteht darin, den Einfluß der Komplexierung auf die rheologischen Eigenschaften von Stärkesystemen zu untersuchen. So läßt sich beispielsweise bei der Zugabe von Iod zu einer verdünnten Amyloselösung eine deutliche Abnahme der intrinsischen Viskosität beobachten.^[43, 48, 125] Die mit der Einlagerung der Iodmoleküle verbundene Konformationsänderung der Amylose führt durch die Ausbildung helikaler Bereiche zu einer Kontraktion der Amyloseketten und somit zu einer Abnahme des hydrodynamischen Volumens. Eine wichtige Voraussetzung bei dieser Meßmethode ist allerdings das Vorliegen von löslichen Amylosekomplexen. Da die überwiegende Mehrheit der Komplexanden unlösliche Präzipitate mit Amylose bildet, ist diese Methode auf einige Ausnahmen beschränkt. Eine der wenigen Arbeiten, in denen die Bildung von Amylose-Lipidkomplexen mit Hilfe der Kapillarviskosimetrie untersucht worden ist, stammt von Karkalas und Raphaelides.^[93] In basischer Amyloselösung fanden sie mit steigender Konzentration von freien Fettsäuren eine relative Abnahme der Viskosität, die nach Überschreiten eines bestimmten molaren Verhältnisses von Amylose und Fettsäure einen konstanten Wert erreichte. Die Autoren führten diese Tatsache auf die Sättigung der Amylosehelix mit Fettsäuremolekülen zurück.

Die Komplexierung von polaren Lipiden, wie oberflächenaktive Substanzen oder Emulgatoren, läßt sich jedoch sehr gut in konzentrierten Stärkesystemen nachweisen, da die Bildung entsprechender Inklusionskomplexe einen erheblichen Einfluß auf das viskoelastische Verhalten der Stärke hat.^[126-129] Beim Erhitzen wäßriger Stärkesuspensionen treten im Verlauf der Quellung und Verkleisterung charakteristische Veränderungen der rheologischen Eigenschaften auf, die mit einem Viskographen, der nach dem Prinzip eines Rotationsviskosimeters arbeitet, registriert werden können. Die wäßrige Stärkesuspension wird dabei unter Rühren mit konstanter Scherkraft einem definierten Heiz-Kühl-Programm ausgesetzt. Zur Aufrechterhaltung der Rührgeschwindigkeit wird in Folge der Verkleisterung auf die Spindel eine zunehmend stärker werdende Kraft ausgeübt. Die entsprechende Viskosität der Suspension wird in relativen Brabender-Einheiten (BE) angegeben. Der Verlauf des sich ergebenden charakteristischen Viskositätsprofils läßt sich mit den Veränderungen der Stärkekörner während der Verkleisterung erklären.



Abb. 45: Zusammenhang zwischen Stärkekornstruktur und Viskositätsprofil^[25]

Beim Aufheizen der Stärkesuspension beginnen die Stärkekörner ab einer charakteristischen Temperatur zu quellen, was einen starken Anstieg der Viskosität zur Folge hat. Diese Temperatur bezeichnet man als Gelierungstemperatur. Die beiden Begriffe "Gelierung" und "Verkleisterung" lassen sich nicht exakt voneinander trennen und werden häufig für ein und denselben Vorgang verwendet. Tatsächlich stellt aber die Verkleisterung die Fortsetzung der Gelierung dar. Aus den gequollenen Stärkekörnern treten nun verstärkt Amylosemoleküle aus und gehen in Lösung. Während der Hochtemperatur-Haltephase bei 95 °C findet demzufolge eine Zerstörung der Stärkekörner statt, die einen Abfall der Viskosität zur Folge hat. Am Peakmaximum liegen die meisten Körner intakt und vollständig gequollenen vor. Im Verlauf der Kühlphase beginnt eine Reassoziation der gelösten

Amylose- und Amylopektinmoleküle, wodurch ein erneuter Anstieg (*set-back*) der Viskosität zu beobachten ist. Die Höhe des set-backs ist stark von der verwendeten Stärke abhängig. Im allgemeinen ist der Anstieg der Viskosität umso höher, desto größer der Amylosegehalt der Stärke ist. Einen Einfluß auf den Verlauf des Viskositätsprofils hat außerdem die Stärkekonzentration in der Suspension, der pH-Wert sowie der Zusatz von Verbindungen, die in der Lage sind, Einschlußverbindungen mit Amylose zu bilden. Die bekanntesten Additive in diesem Zusammenhang stellen Monoglyceride dar. Sie besitzen als Zusatzstoff in Backwaren, die chemisch gesehen nichts anderes darstellen als hochkonzentrierte Stärkesuspensionen, eine große industrielle Bedeutung, da sie das Altbackenwerden der Lebensmittel verzögern oder sogar ganz verhindern. ^[66, 73] Viskograph-Kurven von Stärkesuspensionen, denen Monoglyceride zugesetzt worden sind, zeigen eine erhöhte Verkleisterungstemperatur und somit auch eine Verschiebung der Temperatur, an der das Viskositätsmaximum auftritt.^[91, 127, 129] Über den Mechanismus, nach welchem die Monoglyceride die Quellung der Stärke kontrollieren, existieren verschiedene Vorstellungen. Einerseits wird vermutet, daß durch die Bildung von Einlagerungskomplexen ein Film auf der Oberfläche der Stärkekörner gebildet wird und so zu Beginn der Verkleisterung das Eindringen von Wasser in das Korn behindert wird.^[129] Andere Autoren sind der Meinung, daß die Lipide in das Stärkekorn eindringen, dort Komplexe bilden und damit einen weiteren Austritt von Amylose aus dem Korn zu verhindern.^[91] Beide Mechanismen führen zu einer Erhöhung der Stabilität der Stärkekörner und damit zu einer verzögerten Gelierung bzw. Verkleisterung. Für den Einfluß der Glyceride auf die Höhe des Viskositätsmaximums ist keine eindeutige Tendenz feststellbar. In der Abkühlphase kann es in einigen Fällen zu einem verstärkten set-back der Viskosität kommen. Die zu Beginn gebildeten Inklusionskomplexe, die während der Hochtemperaturperiode größtenteils wieder zerstört wurden, bilden sich innerhalb des Gels erneut aus. Vorausgesetzt, die Stärkekörner sind nicht vollständig desintegriert, bildet sich ein intergranulares Netzwerk aus, das eine Erhöhung der Gelviskosität zur Folge hat. Die gequollenen Stärkekörner, die dicht gepackt vorliegen, bestehen dabei vor allem aus Amylopektin. Die aus dem Korn ausgetretene Amylose liegt relativ konzentriert zwischen den Stärkekörnern vor (Abb. 46). Das Vorhandensein von Monoglyceriden wirkt sich auch nach der Abkühlung Stärkegelen von konzentrierten auf deren mechanischen

Eigenschaften aus. So führt der Zusatz von Monoglyceriden zu einer Behinderung der Amylopektinrekristallisation, die die Hauptursache für das Altbackenwerden von Teigwaren darstellt, und somit zu einer Reduktion der Gelstärke.^[130-132]



Abb. 46: Modell eines intergranularen Netzwerkes aus Amylose-Inklusionskomplexen in konzentrierten Stärkesystemen^[133]

Im Gegensatz zu den Monoglyceriden existieren über den Einfluß von Diglyceriden auf das rheologische Verhalten von Stärkesystemen nahezu keine Untersuchungen. Ein Grund dafür ist sicherlich ihre weitaus geringere industrielle Bedeutung als Nahrungsmittelzusatz. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß auch 1,3-Diglyceride von Amylose in stabilen Komplexen gebunden werden können (s. Kap. 2.4). Es stellte sich daher die Frage, ob bei Zusatz von Diglyceriden zu konzentrierten Stärkesuspensionen ähnliche Veränderungen der rheologischen Eigenschaften zu beobachten sind, wie im Fall von Monoglyceriden. So sollte die Bildung von Einlagerungskomplexen ebenfalls zu einer Verzögerung der Gelierung führen, was sich in einer Erhöhung der Verkleisterungstemperatur sowie einer Verschiebung des Viskositätsmaximums bemerkbar machen würde. Sollte ein intergranularen Netzwerkes während der Abkühlphase ausgebildet werden, so wäre ein signifikanter Viskositätsanstieg zu erwarten, falls die beiden Fettsäurereste der Diglyceride jeweils von einem Amylosemolekül komplexiert werden. Die daraus resultierende intermolekulare Verknüpfung würde zu einer noch größeren Gelviskosität als in den Monoglycerid-Stärke-Systemen führen.

Die entsprechenden Viskositätsmessungen wurden mit einem Brabender[®]-Mikro-Viskoamylographen durchgeführt. Als Stärken wurden Kartoffel-, Tapioca- und Palerbsenstärke eingesetzt, die einen Amylosegehalt von 20, 17 bzw. 35 % aufweisen. Die Zugabe der Glyceride erfolgte wie im Fall der Komplexierungsversuche in verdünnten Lösungen als Emulsion, wobei die Lipidkonzentration 2 % der eingesetzten Stärkemenge betrug. Als Emulgator wurden sowohl Natriumoleat als auch Natriumcholat verwendet. Da im Rahmen dieser Messungen lediglich der generelle Einfluß von Mono- und Diglyceriden miteinander verglichen werden sollte, wurden nicht die hochreinen Verbindungen aus den vorhergehenden Untersuchungen eingesetzt, sondern Glyceride, die durch eine Umesterungsreaktion von nativem Sonnenblumenöl und Glycerin gewonnen wurden (s. auch Kap. 2.8). Die Lipidemulsionen wurden vor Beginn der Messungen bei Raumtemperatur zu den Stärkesuspensionen zugegeben. Um ausschließlich den Einfluß der Glyceride auf das Viskositätsprofil zu erfassen, enthielten die entsprechenden Vergleichsproben ohne Zusatz von Glyceriden ebenfalls die selbe Menge Natriumoleat bzw. Natriumcholat.

Die wichtigsten Meßdaten sind in Tabelle 19 zusammengefaßt. Als Verkleisterungstemperatur ist diejenige Temperatur angegeben, an der die Viskosität mehr als 10 Brabender-Einheiten über den Ausgangswert steigt. Das Viskositätsmaximum ist definiert als die höchste Viskosität während der Aufheizphase. Der Wert der Gelviskosität entspricht der Viskosität am Ende der abschließenden Halteperiode bei 50 °C.

648mlze	Lipid	Emulgator	Verkleisterungs-	Viskositätsmaximum		Gelviskosität
Starke			temperatur (°C)	(°C)	(BE)	(BE)
Kartoffel		Na-Cholat	60,0	67,0	2278	1524
		Na-Oleat	60,3	78,4	2234	1687
	MG	Na-Cholat	61,3	86,6	1860	1309
		Na-Oleat	60,8	87,5	1979	1512
	DG	Na-Cholat	59,7	67,6	2222	1586
		Na-Oleat	60,2	72,0	2093	1531
Tapioca		Na-Cholat	67,5	77,1	1123	1013
		Na-Oleat	65,4	81,9	976	1011
	MG	Na-Cholat	74,2	87,5	870	864
		Na-Oleat	67,7	85,1	920	721
	DG	Na-Cholat	67,4	76,6	1135	988
		Na-Oleat	64,5	74,1	1128	924
Palerbse		Na-Cholat	66,0	95,3	379	676
		Na-Oleat	66,1	95,1	378	636
	MG	Na-Cholat	82,2	94,9	420	876
		Na-Oleat	67,9	94,7	394	630
	DG	Na-Cholat	66,0	95,0	380	679
		Na-Oleat	65,2	94,9	366	638

Tab. 19: Viskographische Kenngrößen der untersuchten Stärke-Lipid-Systeme

Wie man an den Viskositätsprofilen und den jeweiligen viskographischen Kenngrößen aus Tabelle 19 erkennt, hat lediglich der Zusatz der Monoglyceride einen Einfluß auf die Viskositätsverhalten der Stärkesuspensionen. Überraschenderweise führt die Zugabe von 1,3-Diglyceriden in keinem der Fälle zu einer eindeutigen Veränderung des Kurvenverlaufs. Unabhängig sowohl von der verwendeten Stärke als auch vom eingesetzten Emulgator läßt sich weder eine Erhöhung der jeweiligen Verkleisterungstemperatur, noch eine Verschiebung des Viskositätsmaximums oder ein deutlicher Anstieg der Gelviskosität während der Kühlphase beobachten. Die Viskositätsprofile unterscheiden sich nicht von denen der Vergleichssysteme, denen kein Lipid zugesetzt worden ist. Es finden sich demnach keine Anzeichen für eine Stabilisierung der Stärkekörner oder die Formation eines intergranularen Netzwerkes durch die Bildung von Inklusionskomplexen zwischen der Amylose und den 1,3-Diglyceriden.

Dagegen erkennt man bei der Zugabe der Monoglyceride deutlich die zu erwartenden Effekte. Allerdings ergeben sich bei den entsprechenden Viskositätsprofilen der drei verwendeten Stärkesorten teilweise große Unterschiede, und auch die Wahl des Emulgators hat darauf einen Einfluß. Im Fall der Kartoffelstärke ergibt sich eine durchschnittliche Erhöhung der Verkleisterungstemperatur um ca. 1 °C und eine Verschiebung des Viskositätsmaximums um 15 – 20 °C. Sowohl die Peakviskosität als auch die Gelviskosität ist etwas geringer als in den Systemen, die keine Monoglyceride enthalten. Der Verlauf der einzelnen Viskositätsprofile ist aber speziell in der Hochtemperatur- und der Kühlphase im Gegensatz zur Tapiocastärke und zur Palerbsenstärke bei allen Kurven unabhängig von der Lipidzugabe sehr ähnlich. Bei der Tapiocastärke läßt sich bei der Zugabe der Monoglyceride als Natriumcholat-Liposomen ein deutlich verändertes Viskositätsverhalten beobachten. So verschiebt sich die Verkleisterungstemperatur und das Viskositätsmaximum um 10 bzw. 15 °C. In der Abkühlperiode steigt die Viskosität im Bereich um 70 °C sprunghaft an, die Gelviskosität bei 50 °C liegt aber dennoch unterhalb der der Vergleichsprobe. Der Zusatz der Monoglyceride als Natriumoleat-Emulsion bewirkt im Vergleich dazu lediglich eine geringe Verzögerung der Verkleisterung, sichtbar an dem leicht verschobenen Viskositätsmaximum. Die Palerbsenstärke zeigt generell ein Viskositätsprofil, das sich deutlich von den anderen beiden Stärkesorten unterscheidet. Es läßt sich selbst während der fünfminütigen Hochtemperaturphase kein Viskositätsabfall innerhalb der Suspensionen beobachten, so daß kein wirkliches Viskositätsmaximum auftritt. Die Viskosität bleibt innerhalb der Halteperiode nahezu konstant und steigt anschließend beim Abkühlen weiter an. Es findet selbst bei 95 °C keine Desintegration statt, sondern die gequollenen Stärkekörner bleiben intakt. Speziell bei Verwendung von Natriumcholat als Emulgator bewirkt der Zusatz von Monoglyceriden eine erhebliche Veränderung des Viskositätsverhaltens (s. Abb. 47).



Abb. 47: Viskogramme von Palerbsenstärke bei Zusatz von Mono- (unten) und Diglyceriden (oben)

Wie man deutlich sieht, steigt die Verkleisterungstemperatur um nahezu 20 °C. Weiterhin findet beim Abkühlen bei ca. 75 °C ein enormer Viskositätsanstieg um etwa 600 BE auf mehr als das doppelte des Ausgangswertes statt. Dies ist ein deutliches Anzeichen für die Bildung von Inklusionskomplexen zwischen den Monoglyceriden und den aus den Stärkekörnern ausgetreten Amylosemolekülen, die zur Formation eines intergranularen Netzes (s. Abb. 46) führt. Im Fall der Kartoffel- und der Tapiocastärke ist dies aufgrund der weitgehenden Zerstörung der Stärkekörner nicht möglich. Die Verwendung von Natriumoleat als Emulgator führt dagegen, wie schon bei der Tapiocastärke zu einer weitaus geringeren Wechselwirkung zwischen Monoglyceriden und Amylose.

Es zeigt sich also, daß es im Gegensatz zu den Monoglyceriden im Fall der 1,3-Diglyceride leider nicht möglich ist, die optimierten Komplexierungsbedingungen von den verdünnten Stärkelösungen auf die konzentrierten Systeme zu übertragen. Die bei einer Komplexierung zu erwartenden Veränderungen der rheologischen Eigenschaften lassen sich demzufolge nicht beobachten.

2.8 Extrusionskomplexe

Neben der Darstellung von Inklusionskomplexen aus verdünnten Stärkelösungen stellt die Extrusion eine zweite wichtige Methode dar, um eine Einlagerung von Lipiden in die Amylosehelix zu erreichen.^[71, 72, 112, 134, 135] Der wichtigste Unterschied dieser beiden Varianten ist der Wassergehalt der Mischungen, der bei der Extrusion lediglich ca. 20 - 25 % beträgt. Innerhalb des Extruders erfolgt durch die mechanische und thermische Behandlung eine Gelierung der Stärke, bei der die Stärkekörner aufquellen und die darin enthaltene Amylose gelöst wird. Analog zu den Vorgängen in wäßrigen Amyloselösungen kann bei Anwesenheit von komplexierungsfähigen Substanzen, speziell langkettigen Lipiden, die durch Einlagerung in Amylosehelices die Bildung von Inklusionskomplexen erfolgen. Gerade für industrielle Anwendungen ist die Extrusionsmethode interessant, da sie

aufgrund der direkten Komplexierung weitaus weniger zeitaufwendig ist als die Darstellung aus Lösung. Dazu trägt auch der geringe Wassergehalt der Extrudate bei, durch den eine anschließende Gefriertrocknung unnötig wird. Ein großer Nachteil der durch Extrusion hergestellten Amylose-Lipidkomplexe besteht allerdings darin, daß ihre Analytik, speziell die Bestimmung der Gastgehalte, außerordentlich schwierig ist. Die Extrudate besitzen bedingt durch die großen mechanischen Kräfte innerhalb des Extruders eine sehr hohe Dichte. Selbst nach gründlichem Mahlen ist ihre Schüttdichte um ein Vielfaches höher als die der pulverigen Fällungskomplexe. Aufgrund der geringen Oberfläche ist eine vollständige Entfernung der nicht komplexierten Lipidanteile, die lediglich adsorbiert sind oder sich in den Zwischenräumen der Amylosematrix befinden, mit Hilfe eines unpolaren Lösungsmittels nahezu ausgeschlossen; und somit ist eine exakte Bestimmung der inkludierten Anteile durch GC- oder NMR-Messungen nicht möglich. Viele Arbeiten in der Literatur beschränken sich daher vielfach auf eine Untersuchung des Einflusses der Lipidzugabe auf die physikalischen Eigenschaften der Extrudate wie Wasserlöslichkeit, Quellungsvermögen oder dem Verkleisterungsverhalten.^[72, 113, 136-138] Eine Möglichkeit, um zumindest qualitative Aussagen über eine Komplexbildung zu erhalten, besteht jedoch in der Messung des Iodbindevermögens bzw. des Blauwertes der Extrudate. Beobachtet man bei lipidhaltigen Stärkeextrudaten eine Verringerung des Blauwertes im Vergleich zu dem der extrudierten nativen Stärke, so läßt sich daraus auf eine Einlagerung von Lipidmolekülen schließen.^[71, 112] Weiterhin lassen sich für die Untersuchung von Inklusionskomplexen bei Extrudaten DSC^[113, 139] und Röntgendiffraktometrie^[71, 72, 134] einsetzen. Auf diese Weise konnte die Bildung von Inklusionskomplexen durch Extrusion mit Fettsäuren^[134] und Monoglyceriden^[72] eindeutig bewiesen werden. Die Einlagerung von Triglyceriden ist dagegen umstritten. Während Mercier^[72], Bhatnagar^[113] und Nestl^[140] keine Komplexierung von Fetten beobachten konnten und dies mit dem sterischen Anspruch der Gäste begründen, beschreibt Meuser die Formation von Triglyceridkomplexen durch Extrusion mit einem Gastgehalt von ca. 1 %. Entsprechende Arbeiten über Diglyceride existieren nicht. Weiterhin werden in den Untersuchungen über die Komplexierung von Lipiden durch Extrusion ausschließlich gesättigte Verbindungen verwendet. Die meines Wissens einzige Arbeit die sich in diesem Zusammenhang mit ungesättigten Fettsäuren und Fetten und deren Stabili-sierung beschäftigt, stammt von Yoshii.^[62] Allerdings wurden hier die Substanzen nicht mit Stärke extrudiert, sondern in einer Doppelschnecken-Knetmaschine bei einem Wassergehalt von 30 % bei 60 °C 30 Minuten mit α -Cyclodextrin vermengt. Der Autor stellte in den pulverigen Produkten eine deutliche Verringerung der Autoxidationsempfindlichkeit der Fettsäuren DHA, EPA und eines DHA-reichen Öls im Vergleich zu den reinen flüssigen Substanzen fest.

Es stellte sich deshalb im vorliegenden Fall die Frage, ob durch Extrusion mit Stärke eine vergleichbare oder sogar bessere Stabilisierung der gleichen ungesättigten Glyceriden, die für die Darstellung der Fällungskomplexe benutzt wurden, erreicht werden kann. Dabei sollte jedoch lediglich die Komplexierungsfähigkeit und Stabilisierung der einzelnen Substanzklassen miteinander verglichen werden; für eine weitergehende Untersuchung des Einflußes der Ungesättigtheit der Fettsäurereste stehen, wie oben beschrieben, keine genügend genauen Analysemethoden zur Verfügung. Zudem benötigt man für die Darstellung von Extrusionskomplexen, bedingt durch die Kapazität des Extruders, ein Vielfaches der Menge an Stärke und somit auch an Lipiden im Vergleich zu den Ansatzgrößen der Fällungskomplexe. Die Herstellung der erforderlichen Mengen an hochreinen Glyceriden würde nach den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden einen enormen synthetischen Aufwand erfordern. Daher wurden technisch reine Mono- und Diglyceriden für die Extrusionsversuche eingesetzt, die einfach durch Erhitzen eines Gemisches aus natürlichen Triglyceriden (Fette oder Öle) und Glycerin unter Zusatz eines basischen Katalysators erhalten werden können. Als natives Öl wurde ein Sonnenblumenöl verwendet, das besonders reich an der zweifach ungesättigten Linolsäure ist und daher eine hohe Oxidationsempfindlichkeit besitzt. Die genaue Fettsäurezusammensetzung lautet: 7 % C16:0, 4 % C18:0, 28 % C18:1, 61 % C18:2. Durch die Umesterung erhält man ein Produktgemisch, dessen Zusammensetzung abhängig ist von dem eingesetzten Verhältnis an Triglycerid und Glycerin.



Abb. 48: Theoretische Produktverteilung bei der Reaktion von Triglyceriden und Glycerin in Abhängigkeit des Eduktverhältnisses^[141]

Die in Abbildung 48 dargestellte Produktverteilung beruht auf einer theoretischen Berechnung, die von einer vollkommen zufälligen Verteilung der Fettsäurereste ausgeht. Um den Anteil der Triglyceride im Reaktionsgemisch so niedrig wie möglich zu halten, bzw. die Ausbeuten an Mono- und Diglyceriden zu erhöhen, wurde die Synthese unter Zusatz von 30 % Glycerin durchgeführt, was einem Verhältnis der Hydroxyl- zu den Estergruppen von ca. 3,0 entspricht. Nach säulenchromatographischer Trennung ergab sich ein Produktverhältnis von 52 % Monoglyceriden, 33 % 1,3-Diglyceriden und 15 % 1,2-Diglyceriden. Der Anteil der nicht umgesetzten Triglyceride lag laut DC-Analyse bei wenigen Prozent.

Für die Herstellung der Extrudate wurde ein Einschneckenextruder von Brabender mit einem Gehäusedurchmesser von 1,8 cm und einer Länge von 50 cm verwendet. Die Schnecke besaß ein Kompressionsverhältnis von 1 : 1 und der Düsendurchmesser betrug 2 mm. Entlang des Schneckengehäuses befinden sich vier unabhängige Heizzonen, so daß auch ein Temperaturgradient eingestellt werden konnte.
Von Bhatnagar stammt eine systematische Untersuchung über den Einfluß verschiedener apparativer Größen auf die Iodbindekapazität der Extrudate eines Maisstärke-Stearinsäure-Gemisches.^[135] Bei einem konstanten Lipidanteil von 4 % fand er ein Maximum an gebundener Fettsäure im Fall einer Extrudertemperatur von 110 °C, einer Schraubengeschwindigkeit von 140 min⁻¹ und einem Wassergehalt des Ausgangsgemisches von 19 %. Es stellte sich jedoch heraus, daß eine direkte Übertragung dieser optimierten Werte auf den vorliegenden Fall nicht möglich war, da Gehäusetemperaturen von über 100 °C zu einer Braunfärbung der Extrudate führten. Möglicherweise ist dies auf eine beginnende Zersetzung der empfindlichen ungesättigten Glyceride zurückzuführen. Voraussetzung für eine Komplexbildung während des Extrusionsvorganges ist die vollständige Gelatinisierung der Stärke, die bei Maisstärke bei 62 – 80 °C erfolgt.^[142] Demnach stellt dies die Mindesttemperatur dar, die im Extruder vorherrschen muß. Daher wurde folgendes Temperaturprofil am Extruder von der Dosierzone bis zur Düse gewählt: 70 - 80 - 90 - 90 °C. Die Produkttemperatur liegt infolge des mechanischen Energieeintrages speziell im Bereich der Düse sehr wahrscheinlich höher als die Gehäusetemperatur. Sämtliche Extrudate wurden mit entfetteter, nativer AM70-Stärke unter Zusatz von 20 % destilliertem Wasser bei einer konstanten Schnecken-geschwindigkeit von 50 min⁻¹ hergestellt. Der Massenanteil der Glyceride in den Gemischen wurde dabei zwischen 0 und 8 % variiert.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob während des Extrusionsvorganges Inklusionskomplexe gebildet worden sind, wurde eine Blauwertbestimmung der Extrudate durchgeführt. Eine Einlagerung der Glyceride in die Amylosehelices hätte eine Abnahme des Blauwertes, d. h. eine Verringerung des Iodbindevermögens der Amylose zur Folge. In Anlehnung an den von Krog^[99] eingeführten Amylose-Komplex-Index (s. Kap. 2.3.3) wurde aus den Blauwerten der Stärke-Lipid-Extrudate und dem Wert für die reine extrudierte Highamylomaisstärke ein "relativer Komplexierungsindex" ermittelt.

rel. Komplexierungsindex =
$$\frac{BV_{\text{reine extr. Stärke}} - BV_{\text{Stärke-Lipid-Extrudat}}}{BV_{\text{reine extr. Stärke}}} \cdot 100$$

Der Komplexierungsindex kann Werte von 0 bis 100 annehmen. Vorausgesetzt, der Blauwert verhält sich proportional zum unkomplexierten Anteil der Amylose, entspricht der relative Komplexierungsindex theoretisch der prozentualen Belegung der Helix mit Lipid. Abbildung 49 enthält die graphische Darstellung der Ergebnisse, die sich für die AM70-Extrudate bei Zugabe von Mono-, Di- und Triglyceriden ergeben haben; das Diglycerid-Extrudat mit einem Lipidanteil von 8 % war nicht extrudierbar.



Abb. 49: relative Komplexierungsindices der AM70-Glycerid-Extrudate

Die Abnahme der Iodkonzentration infolge einer möglichen Addition des Iods an die Doppelbindungen der unkomplexierten Glyceride ist aufgrund des hohen Überschußes an Iod (20 – 150 fach, je nach Lipidanteil) nur minimal. Eine damit verbundene meßbare Verringerung des Blauwertes kann daher ausgeschlossen werden. Wie man sieht, hat im wesentlichen nur die Zugabe der Monoglyceride einen signifikanten Einfluß auf den Blauwert der Extrudate. Mit steigender Lipidzugabe beobachtet man eine Zunahme des relativen Komplexierungsindex bis auf einen Wert von über 30 bei einem Monoglyceridanteil von 8 %. Die Blauwerte der Di- und Triglycerid-Extrudate zeigen dagegen nahezu keine Veränderung. Ein Problem dieser Analysemethode ist jedoch, daß die Extrudate für die Bestimmung des Blauwertes in einem DMSO/Wasser-Gemisch gelöst werden müssen. Während des Lösungsvorganges und auch danach in der Lösung kann es zu einer Dissoziation der Komplexe kommen. Weiterhin ist das zugegebene Iod in der Lage, sich nicht nur in die unkomplexierten Amylosehelices einzulagern, sondern auch inkludierte Glyceride zu verdrängen. Dabei handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die von den Dissoziationskonstanten der jeweiligen Komplexe abhängig ist. Insofern deuten zwar die relativen Komplexierungsindices der Monoglyceride auf die Bildung von Inklusionskomplexen hin, im Fall der Di- und Triglyceride stellen die beobachteten Ergebnisse allerdings noch keinen Beweis für ein Ausbleiben einer Komplexierung dar.

Die Pulverdiffraktometrie bietet die Möglichkeit, die Bildung von kristallinen V-Amylose-Strukturen, die bei einer Einlagerung von Gastmolekülen in die Helices entstehen, anhand ihrer charakteristischen Reflexionssignale nachzuweisen. Diese Methode hat gegenüber der Blauwertbestimmung den Vorteil, daß eine Dissoziation der Komplexe bei der Probenvorbereitung ausgeschlossen ist. Die Extrudate werden lediglich zermahlen. Allerdings ist die Qualität der Spektren abhängig von der Teilchengröße der Substanz. Je grobkörniger die Substanz ist, desto geringer ist die Anzahl der Teilchen, die sich innerhalb des Probenfensters befinden. Statistisch sinkt dadurch die Zahl der detektierten Reflexionen, und somit nimmt auch die Auflösung bzw. die Qualität der Spektren ab. Auf der anderen Seite besteht die Gefahr, durch zu feines Mahlen die kristallinen Strukturen zu zerstören. Für die Aufnahme der Röntgendiffraktogramme wurden die Extrudate daher zunächst grob gemörsert und anschließend weiter in einer Kugelmühle zerkleinert. Die Messungen erfolgten in einem Winkelbereich von $2\theta = 4 - 28^{\circ}$. Abbildung 50 zeigt die Diffraktogramme der Mono-, Di- und Triglycerid-Extrudate mit einem Lipidgehalt von 5 % und als Vergleich die Aufnahmen der nativen AM70-Stärke vor und nach der Extrusion. Zusätzlich sind die Röntgensignale des Trägermaterials dargestellt, bei dem es sich um eine dünne goldbeschichtete Kunststoffolie handelt.



Abb. 50: Röntgendiffraktogramme der AM70-Extrudate 5 % Monoglycerid (a), 5 % 1,3-Diglycerid (b), 5 % Triglycerid (c), ohne Lipidzusatz (d), nativ, nicht extrudiert (e), Trägermaterial (f)

Das Diffraktogramm des Monoglycerid-Extrudates enthält ausgeprägte Signale bei 12,7 und 19,8 20, die der kristallinenV-Form der Amylose zugeordnet werden können.^[71, 124] Dies beweist zweifelsfrei die Bildung von Inklusionskomplexen. Ein dritter charakteristischer Peak befindet sich noch unter einem Winkel von 7,3 20, der aber teilweise von einem benachbarten Signal des Trägermaterials überdeckt wird. Zwar findet man die Signale der V-Amylose auch bei den Extrudaten, denen Dioder Triglyceride zugesetzt worden sind, allerdings mit weitaus geringer Intensität. Selbst ohne Zusatz von Lipiden lassen sich im Röntgendiffraktogramm der reinen extrudierten AM70-Stärke in geringem Maße V-Amylose-Strukturen nachweisen. Auch der alleinige Extrusionsvorgang bewirkt eine Veränderung des Diffraktionsmusters der Stärke.

Die Ergebnisse der Messungen decken sich demnach mit denen der Blauwertbestimmungen. Bei der Extrusion eines Monoglycerid-Stärke-Gemisches wird ein Teil der Lipide in die Amylosehelices eingelagert, während die Bildung entsprechender Komplexe mit Di- oder Triglyceriden aufgrund der sehr schwachen Signale nicht eindeutig ist.

Abschließend wurde untersucht, inwieweit die ungesättigten Glyceride in den Extrudaten vor einer Oxidation geschützt sind. Zumindest die Oxidationsempfindlichkeit der Monoglyceride sollte aufgrund der nachgewiesenen Komplexierung vermindert sein. Analog zu den Stabilitätsuntersuchungen der Fällungskomplexe wurden AM70-Extrudate der drei Glyceridderivate mit einem Lipidanteil von 5 % bei 40 °C über einen Zeitraum von 100 Tagen gelagert. Aufgrund der bereits erwähnten schlechten Extrahierbarkeit der Extrudate, ist die Bestimmung der Gastgehalte über die Gaschromatographie nicht möglich. Eine Alternative bietet die NMR-Spektroskopie, mit der man zumindest den relativen Verlauf der Autoxidation verfolgt kann. Da beim oxidativen Abbau die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäurereste angegriffen werden, stellt das Verhältnis der Signalflächen der Doppelbindungsprotonen und der Protonen der Anhydroglucoseeinheiten ein Maß für die Stabilität der Lipide dar. Für die graphische Darstellung der Meßkurven in Abbildung 51 wurden die Werte in Relation zum ersten Meßwert auf 1 normiert, so daß auf der Ordinate der relative Anteil der stabilisierten Doppelbindungen aufgetragen ist. Schwankungen in den Meßwerten sind unter anderem auf eine ungleichmäßige Verteilung der Glyceride in den Extrudaten zurückzuführen.



Abb. 51: Stabilitäten der AM70-Extrudate bei 40 °C

Sowohl die Monoglyceride als auch die Di- und Triglyceride weisen in den Extrudaten eine unerwartet hohe Stabilität auf. Im Rahmen der Meßgenauigkeit dieser Methode bleibt der Anteil der nicht oxidierten Doppelbindungen bis zum Testende nahezu konstant. Ein ranziger Geruch, der normalerweise bereits bei geringen Konzentrationen an Abbauprodukten auftritt, ist bei keinen der drei Proben bemerkbar. Dies ist insofern erstaunlich, da gezeigt werden konnte, daß nur die Monoglyceride während des Extrusionsvorganges Inklusionskomplexe mit Amylose bilden. Trotzdem werden auch die Di- und Triglyceride innerhalb der Stärkeextrudate vor einem oxidativen Angriff geschützt. Eine Erklärung dafür ist möglicherweise die hohe Dichte und die geringe Oberfläche der Extrudate, durch die eine Diffusion des Luftsauerstoffes in und durch die Stärkematrix stark behindert ist. Es konnte somit erstmalig gezeigt werden, daß mit Hilfe der Extrusionstechnik ungesättigte Lipide signifikant vor einem oxidativen Abbau geschützt werden.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Einschlußverbindungen von Stärke mit verschiedenen ungesättigten Lipiden synthetisiert. Ziel der Arbeit war die Stabilisierung der Gastmoleküle gegen einen oxidativen Abbau, der durch den Angriff von Luftsauerstoff hervorgerufen wird. Durch eine umfangreiche Charakterisierung der Produkte wurde ihre Eignung für den industriellen Einsatz als Nahrungsmittelzusatz geprüft.

Als Komplexanden dienten die Glyceridderivate der Ölsäure (C18:1), sowie der Linolsäure (C18:2) und der Linolensäure (C18:3), die als essentielle Fettsäuren eine wichtige Rolle in der Ernährungsphysiologie besitzen. Durch die Synthese der jeweiligen 1-Monoglyceride, der 1,3-Diglyceride und der Triglyceride standen insgesamt neun Verbindungen für Komplexierungsuntersuchungen zur Verfügung, die sich in Struktur und dem Grad der Ungesättigtheit unterschieden. Die für die Darstellung benötigten hochreinen Fettsäuren wurden mit Hilfe von speziellen Reinigungsverfahren aus nativen Ölen gewonnen.

Die Synthesen der Stärkekomplexe erfolgte durch Zugabe der Glyceride in Form von wäßrigen Emulsionen zu verdünnten Amylose- bzw. Stärkelösungen. Durch systematische Variation der Versuchsparameter wurden die Produkte in Bezug auf Ausbeute und Gastgehalt optimiert. Die erhaltenen Inklusionskomplexe wurden anschließend hinsichtlich ihrer thermischen und oxidativen Stabilität charakterisiert.

Die Monoglyceride zeigen eine ausgesprochen hohe Komplexierungsneigung. Unter optimierten Versuchsbedingungen lassen sich Gastgehalte von 100 – 110 mg/g Komplex erzielen. Anhand von stöchiometrischen Berechnungen konnte gezeigt werden, daß dieser Wert nahezu der größtmöglichen theoretischen Aufnahmekapazität der Amylosehelix entspricht. Der Grad der Ungesättigtheit des Fettsäurerestes hat dabei nur einen geringen Einfluß auf die Gastgehalte der Monoglycerid-Komplexe, obwohl mit steigender Anzahl der cis-konfigurierten Doppelbindungen das Einnehmen einer linearen Konformation, die für das Eindringen der Fettsäure in die Amylosehelix notwendig ist, immer unwahrscheinlicher wird. Zwar beobachtet man - wie erwartet - bei den Komplexen des zweifach ungesättigten Monolinolats und des dreifach ungesättigten Monolinolenats insgesamt etwas niedrigere Gastgehalte; der größere sterische Anspruch der mehrfach ungesättigten Fettsäurereste hat jedoch eine Aufweitung der Amylosehelix von 6 auf 7 Anhydroglucoseeinheiten pro Windung zur Folge. Die damit verbundene Zunahme der für die Komplexierung eines Gastmoleküls benötigten Menge Amylose korreliert exakt mit der scheinbaren Abnahme des Gastgehaltes.

Die erzielten Gastgehalte bei den 1,3-Diglyceriden liegen erwartungsgemäß niedriger als die der entsprechenden Monoglyceridkomplexe, da für eine vollständige Komplexierung die lineare Anordnung beider Fettsäureketten erfolgen muß. Überraschenderweise läßt sich bei den höher ungesättigten Verbindungen tendentiell ein Anstieg der Komplexierungsneigung beobachten. Vom Dioleat konnten maximal 35 mg/g Komplex inkludiert werden, im Fall des Dilinolenats dagegen bis zu 46 mg/g. Dieser Wert stellt den größten, jemals gemessenen Gastgehalt eines Amylose-Diglyceridkomplexes dar. Er übertrifft den höchsten in der Literatur erwähnten Wert von 3,2 % um mehr als 40 %. Bei der systematischen Optimierung der Reaktionsbedingungen stellte sich heraus, daß speziell die Verwendung von reiner Kartoffelamylose in Zusammenhang mit dem Einsatz von Natriumoleat als Emulgator zu hohen Komplexgehalten führt. Der Gebrauch einer nativen Stärke oder eines anderen Emulgators hatte deutlich niedrigere Gastgehalte zur Folge. Es konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei um einen Synergieeffekt der Reaktionspartner handelt. Zum einen besitzt die Kartoffelamylose aufgrund ihrer Gewinnung bereits vororientierte helikale Bereiche, die eine Komplexierung erleichtern. Des weiteren induziert die Einlagerung einiger Natriumoleat-Moleküle die Ausbildung weiterer helikaler Bereiche und somit die Komplexierung der Diglyceride.

Die Darstellung von Triglyceridkomplexen gelang nicht. In keinem der Fälle konnte eine Einlagerung von Triglyceriden in die Amylosehelix beobachtet oder nachgewiesen werden. Selbst für eine teilweise Komplexierung einer oder mehrerer Fettsäureketten durch Amylosemoleküle fanden sich keine Anhaltspunkte. Die Vermutung, daß die mangelnde Komplexierungsfähigkeit der Triglyceride in einer sterischen Hinderung der drei Fettsäurereste begründet liegt, konnte durch nachfolgende Untersuchungen als Hauptursache ausgeschlossen werden. Dabei wurden 1,3-Dibutyroyl-triglyceride als Komplexanden verwendet, die lediglich in der 2-Position eine C18-Fettsäure besaßen. Die Komplexierung des langkettigen Restes in eine Amylosehelix sollte durch die kürzeren Butylreste sterisch kaum beeinflußt werden. Allerdings bildeten auch diese Modellsubstanzen keine nachweisbaren Einlagerungskomplexe. Offensichtlich scheitert die Komplexierung vielmehr am Phasenverhalten der Triglyceride. Die Fette befinden sich innerhalb der durch die Emulgatoren gebildeten Micellen in einem Zustand, der eine Einlagerung in die Amylosehelix verhindert. Eine genaue Aufklärung dieses Phänomens war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

Um zu ermitteln, inwieweit die molekulare Verkapselung der ungesättigten Mono- und Diglyceride in der Amylosehelix zu einem Schutz gegenüber einem oxidativen Abbau beiträgt, wurden die Komplexe 100 Tage bei erhöhter Temperatur gelagert. Im Verlauf dieser Zeit wurde die Stabilität der oxidationsempfindlichen Lipide durch fortwährende Bestimmung der Gastgehalte mithilfe quantitativer gaschromatographischer Messungen verfolgt. Verglichen mit entsprechenden Glyceriden, die nicht inkludiert, sondern lediglich auf einer Stärkematrix adsorbiert waren, zeigten die verkapselten Lipide eine enorme Oxidationsstabilität. Während die ungeschützten Verbindungen in den Adsorbaten ausnahmslos innerhalb weniger Tage vollständig durch Autoxidation abgebaut wurden, konnte bei den Monoglyceridkomplexen des Öl- und Linolsäuerderivates selbst nach über dreimonatiger Lagerung keine Zersetzung der Fettsäuren in den Komplexen beobachtet werden. Lediglich im Fall des dreifach ungesättigten Monolinolenats zeigte sich eine langsame Abnahme des Gastgehaltes um etwa 10 %. Im Vergleich dazu betrugen die Gastgehalte der Diglyceridkomplexe am Ende der Langzeitmessung 70 % (C18:2) bzw. 90 % (C18:3) des Ausgangswertes. Für den teilweisen Abbau der Diglyceride sind hier diejenigen Moleküle verantwortlich, bei denen nur eine der beiden Fettsäuren in der Amylosehelix inkludiert ist. Der Abbau der ungeschützten Fettsäurereste macht sich innerhalb der ersten Tage in einer sprunghaften Abnahme der Komplexgehalte bemerkbar; danach bleiben die Werte nahezu konstant.

Weiterhin erfolgte die Charakterisierung der Inklusionskomplexe durch DSC-Messungen. Die genaue Kenntnis des thermischen Verhaltens ist gerade für die Verarbeitung und den industriellen Einsatz der Produkte von Bedeutung. Es zeigte sich, daß die Desintegration der Komplexe erst im Bereich von 90 – 120 °C stattfindet, wobei die Dissoziationstemperatur mit steigendem Grad der Ungesättigtheit der Glyceride leicht sinkt. Gerade die Einschlußverbindungen der Diglyceride weisen entgegen der geringeren Komplexierungsneigung der Gastmoleküle eine erstaunlich hohe thermische Stabilität auf. Sowohl die Dissoziationstemperaturen der Diglyceridkomplexe als auch ihre auf den Gastgehalt normierten Umwandlungsenthalpien liegen höher als die der entsprechenden Monoglyceridkomplexe.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Mono- und Diglyceriden auf das rheologische Verhalten von konzentrierten Stärkesuspensionen untersucht. Während der Zusatz von Monoglyceriden aufgrund der Bildung von Inklusionskomplexen zu einem deutlichen Anstieg der Verkleisterungstemperatur und der Gelviskosität durch die Bildung eines intergranularen Netzwerkes führte, ließen sich bei Zugabe von Diglyceriden keine Veränderungen der Viskositätsprofile der Stärken beobachten. Die Übertragung der optimierten Reaktionsbedingungen für die Komplexbildung in verdünnten Lösungen auf konzentrierte Systeme ist demzufolge so einfach nicht möglich.

Abschließend wurde geprüft, inwieweit die gemeinsame Extrusion von Stärke und Glyceriden wurde zu einer Komplexierung bzw. zu einer Stabilisierung der ungesättigten Lipide führt. Durch Bestimmung des Iodbindevermögens der Extrudate und mit Hilfe von Röntgendiffraktometermessungen konnte nur im Fall der Monoglyceride die Bildung von Inklusionskomplexen eindeutig nachgewiesen werden. Nachfolgende Lagerversuche bei erhöhten Temperaturen ergaben allerdings erstmalig, daß der oxidative Abbau aller ungesättigten Glyceridderivate - selbst der Triglyceride - aufgrund der umgebenden Stärkematrix innerhalb der Extrudate minimal ist. Die Lipidgehalte sämtlicher Extrudate blieben über einen Zeitraum von 100 Tagen nahezu konstant. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stellen insgesamt eine wichtige Grundlage für eine mögliche industrielle Anwendung von in Stärke verkapselten ungesättigten Lipiden dar. Durch die mit der Verkapselung verbundene signifikante Reduktion der oxidativ bedingten Zersetzung ist eine Verwendung als Nahrungsmittelzusatz durchaus denkbar.

4 Experimenteller Teil

4.1 Apparatives

Autoklav:	Berghof Autokla Innenrührer BRS	av 400 ml mit Teflon-Einsatz, S 856, Heizmantel BTR 841
¹ H-NMR-Spektroskopie:	Varian VXR 300	0 (300 MHz)
	Bruker DRX 50	0 (500 MHz)
Elementaranalysen:	Institut für Phar	mazeutische Chemie
	Heinrich-Heine-	Universität Düsseldorf
Schmelzpunktbestimmung:	BÜCHI 510	
Gaschromatographie:	Carlo Erba HRC	GC 5160
	Kapillarsäule: B	PX 70; 50 m; 0,2 mm ID, (SGE)
	Detektor: FID Datenauswertun	g: Watrex Data Monitor 2000
UV-Spektroskopie:	PERKIN-ELME	ER Spektralphotometer 554
Massenspektroskopie:	Varian MAT CH	I 50
DSC:	Mettler 821e	
GPC:	Pumpe:	Waters 510
	Lösungmittel:	H ₂ O (entgast)
	Laufmittel:	H ₂ O (entgast)
	Fluß:	1 ml/min
	Temperatur:	60 °C
	Säule:	Shodex KS 804 + KS 802
	Detektor:	Waters RI 410
	Integrator:	Shimadzu C-R6A

Pulverdiffraktometer:	Huber G600 mit Quarzmonochromator
Gefriertrocknung:	Leybold Heraeus LS20
Zentrifuge:	Sigma 6-10, Rotor 12256, 6 x 250 ml
Viskograph:	Brabender Micro-Visco-Amylograph

4.2 Chemikalien

Acros:	Brom, Harnstoff, n-Propanol
Aldrich:	tert-Butyldiphenylsilylchlorid,4-Dimethylamino- pyridin, 1,3-Dibrom-2-propanol, Natriumbutyrat, Trimethylsulfoniumiodid, p-Toluolsulfonsäure Hydrat
Caesar & Loretz:	Kaliumiodid
Cerestar:	Highamylomaisstärke AM70, Kartoffelstärke
Fluka:	Benzaldehyd, Celite 577, Deuteriumchlorid 37 %, Heptadecansäure, Maisamylopektin, Montmorillonit K10, Tetrabutylammoniumfluorid, Zinkstaub
Grüssing:	Cyclohexanon
Henkel KG:	Sonnenblumenöl
Bernd Kraft GmbH:	Natronlauge (1N), Phosphatpuffer (pH 7), Pyridin, Salzsäure (1N)

Merck:	Iod doppelt sublimiert, Natriumcholat, tri-Natrium phosphat Dodecahydrat, Silber(I)oxid
Nattermann GmbH:	Phospholipon 90H
Riedel-de-Haën:	Dicyclohexylcarbodiimid
Roth:	Glycerin, High-Oleat-Sonnenblumenöl, Leinöl, Molekularsieb 4 Å
Sigma:	Baumwollsamenöl

Lösungsmittel

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und, falls erforderlich, nach den üblichen Methoden getrocknet.

4.3 Reinigung der Ausgangsstoffe

4.3.1 Entfetten von Stärke^[143]

Die zu entfettende Stärke wird in n-Propanol : Wasser = 3 : 1 suspendiert, wobei die Stärkekonzentration 20 % nicht überschreiten sollte. Die Suspension wird für zwei Stunden bei 80 °C gerührt und filtriert; diese Prozedur wird noch zweimal wiederholt. Das entfettete Produkt wirdanschließend bei 60 °C im Vakuum getrocknet.

4.3.2 Fraktionierung von Kartoffelamylose

72 g NaOH werden in 1700 ml gelöst, mehrfach entgast und mit Stickstoff belüftet. Zu dieser Lösung gibt man unter kräftigem Rühren 45 g Kartoffelstärke, die vorher in 80 ml H₂O suspendiert wurde. Der Reaktionsansatz wird noch zweimal entgast und mit Stickstoff belüftet. Man schüttelt für 2 Stunden, verdünnt die Lösung mit 1800 ml H₂O und neutralisiert mit konz. HCl. Anschließend erhitzt man zum Sieden, kontrolliert nochmals den pH-Wert und filtriert heiß. Das Filtrat wird in der Siedehitze mit 60 ml Cyclohexanon versetzt und noch weitere 20 min gekocht. Man läßt über Nacht abkühlen und zentrifugiert den gebildeten Amylose-Cyclohexanon-Komplex ab. Der Niederschlag wird zweimal in 800 ml Ethanol gerührt, abfiltriert und im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird die umgefällte Amylose nach der gleichen Vorschrift ein zweites Mal fraktioniert.

Ausbeute: 7,6 – 9,9 g (17 – 22 %) Blauwert: 12,2 (Bestimmung s. 4.6.1.1)

4.3.3 Verseifen von nativen Ölen

In einem 4 1 Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer werden 1000 g Öl in 900 ml Ethanol gelöst. Man erwärmt unter Rühren auf 60 °C, entfernt die Heizquelle und tropft 800 ml 6,5 N NaOH so zu, daß die Temperatur der Lösung konstant bleibt. Nach beendeter Zugabe wird noch 30 min lang bei 60 °C gerührt. Der Ansatz wird mit 800 ml 6,5 N H₂SO₄ bei 60 – 80 °C angesäuert und so lange gerührt, bis sich eine klare Ölschicht abscheidet. Die überstehende Ölphase wird im Scheidetrichter abgetrennt und fünfmal mit heißem destilliertem Wasser gewaschen. Nach Zugabe von 400 ml Ether wird das Rohprodukt über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und der Ether im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 930 g

4.3.4 Tieftemperatur-Umkristallisation von Fettsäuren

150 g eines Fettsäuregemisches werden in 1500 ml Aceton gelöst. Man kühlt die Lösung langsam auf -25 °C ab und bewahrt sie über Nacht bei dieser Temperatur auf. Die auskristallisierten gesättigten Fettsäuren werden über eine vorgekühlte Fritte abgenutscht, so daß sich im Filtrat die ungesättigten Fettsäuren anreichern. Je nach verwendetem Öl erhält man folgende Anreicherung (die Werte in Klammern geben die jeweiligen Anteile der Fettsäuren vor der Umkristallisation an):

ä	Zusammensetzung des Fettsäuregemisches (%)					Ausbeute (g)	
UI	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	(Filtrat)	
Sonnanblumon	1	<1	94	4	<1	1 / /	
Sonnendlumen	(4)	(5)	(81)	(8)	(2)	144	
Daumanallaaman	2	1	27	70	0	00	
Baumwonsamen	(21)	(3)	(18)	(56)	(<1)	90	
Lain	0	1	20	19	60	105	
Lein	(6)	(4)	(18)	(17)	(53)	125	

Tab. 20: Fettsäurezusammensetzung der Filtrate nach der Tieftemperatur-Umkristallisation von nativen Ölen bei –25 °C

4.3.5 Reinigung der Fettsäuren durch Harnstoffkomplexierung

120 g eines Fettsäuregemisches werden in 700 ml Methanol gelöst. Man gibt 150 g Harnstoff hinzu, erhitzt zum Sieden und läßt die Lösung über Nacht langsam unter Rühren im Heizpilz abkühlen. Der gebildete Harnstoffkomplex wird abfiltriert und mit wenig Methanol gewaschen. Da sich im Präzipitat die weniger ungesättigten Fettsäuren angereichert haben, wird jenachdem, welche Fettsäure gereinigt werden soll, entweder das Filtrat (C18:2, C18:3) oder die Fällung (C18:1) aufgearbeitet; die Vorgehensweise ist die gleiche. Man löst den Komplex bzw. die zur Trockne eingeengte methanolische Lösung bei 60 °C in 250 ml H₂O und extrahiert anschließend mehrfach mit Ether. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Ether wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Tabelle 21 enthält den Gehalt der angereicherten Gemische an der jeweils relevanten Fettsäure, sowie die erzielten Ausbeuten.

	prozentualer	Aughouto			
Fettsäure	Tieftemp	1. Harnstoff-	2.Harnstoff-	3. Harnstoff-	(g)
	Kristallisation	komplex	komplex	komplex	(g)
C18:1	03.8	07.0			28
(Sonnenblumenöl)	93,8	97,0			20
C18:2	69.6	86.0	Q/ Q	97.6	32
(Baumwollsamenöl)	07,0	00,0	74,7	77,0	52
C18:3	50.6	60.0	76 5	76.0	54
(Leinöl)	59,0	09,0	70,5	70,9	54

Tab. 21: Reinheit und Ausbeuten der angereicherten Fettsäuren nach derHarnstoffkomplexierung

4.3.6 Reinigung von Linolensäure

4.3.6.1 Bromierung der Fettsäuren des Leinöls^[80]

300 g der Fettsäuremischung werden in 3 1 Ether gelöst und im 4 1 Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer auf 0 – 5 °C (Eisbad) gekühlt. 110 ml Brom werden langsam unter Rühren zugetropft, so daß die Temperatur 5 °C nicht überschreitet. Die tiefrote Lösung stellt man über Nacht bei 4 °C in den Kühlschrank. Der Bromüberschuß wird durch Zugabe von 1-Hexen entfernt und die ausgefallene Hexabromstearinsäure abfiltriert. Das Rohprodukt wird nach gründlichem Waschen mit Diethylether zweimal aus 1000 ml Dioxan umkristallisiert. Man wäscht erneut mit Ether und trocknet die reine Hexabromstearinsäure bei Raumtemperatur im Vakuum.

Ausbeute: 164 g Smp: 181 °C (Lit.: 181,5 – 181,9 °C)^[144]

4.3.6.2 Debromierung der Hexastearinsäure^[81]

230 g (0,30 mol) Hexabromstearinsäure werden in 700 ml Pyridin gelöst und unter Stickstoffatmosphäre bei 50 °C gelöst. Anschließend gibt man 60 g (0,92 mol) Zink portionsweise hinzu und erhitzt 1 Stunde unter Rückfluß. Die abgekühlte Reaktionslösung wird unter Eiskühlung in 4 l verd. HCl gegeben. Man filtriert den überschüssigen Zinkschlamm ab und schüttelt die Lösung mehrmals mit Ether aus. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Der Ether wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute:70 g (83 %)Reinheit (GC):87 % cis-cis-cis-Produkt (Analyse als Methylester)13 % Stereoisomere

Durch eine anschließende Harnstoffkomplexierung (s. 4.3.5) konnte die Reinheit der cis-cis-cis-Linolensäure noch auf 90,8 % erhöht werden.

4.4 Synthesen

4.4.1 Natrium-Oleat

7,1 g (0,025 mol) reiner Ölsäure (97,0 %) werden in einer äquimolaren Menge 1 N-NaOH erwärmt und das entstehende Natriumsalz durch Eingeben in 1 l Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und anschließend aus 500 ml Wasser umkristallisiert. Das Produkt wird bei 0 °C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,7 g (75 %) Reinheit (GC): Die Reinheit entspricht der der eingesetzten Ölsäure (97,0 %) (Bestimmung als Methylester)

4.4.2 Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)-Lösung

1,3 g Trimethylsulfoniumiodid (6,3 mmol) werden in einem warmen Gemisch aus Methanol und Wasser (25 : 0,1 ml) gelöst. Unter Rühren werden 0,9 g (3,9 mmol) Silber(I)oxid zugegeben. Gelegentlich werden einige Tropfen der überstehenden Lösung abgenommen und mit einer Silbernitratlösung auf restliches Iodid untersucht. Nach Vervollständigung der Reaktion (ca. 1 Stunde) filtriert man die Reaktionslösung und füllt exakt auf 25 ml auf. Die Konzentration des Trimethylsulfoniumhydroxids in Lösung wird durch Titration mit einer 0,1 N HCl-Lösung bestimmt.

Ausbeute:92 %Konzentration der Lösung:0,23 M

4.4.3 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-methanol (Acetonglycerin)^[145]

Eine Lösung von 18,4 g Glycerin (0,2 mol) wird unter Zusatz von 1,0 g (5,3 mmol) p-Toluolsulfonsäure in 200 abs. Aceton in einer Soxhlet-Apparatur mit Molekularsieb 4 Å unter Rückfluß 4 Stunden lang erhitzt. Man läßt die Lösung abkühlen, fügt 2 g festes Kaliumcarbonat hinzu und läßt 5 min rühren. Die Acetonlösung wird filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird im Wasserstrahlvakuum über eine Vigreuxkolonne fraktioniert destilliert.

Ausbeute:	20,6 g (78 %)
Sdp.:	80 °C (22 mbar) (Lit.: 76 °C; 10 mbar) ^[146]
¹ HNMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 4,24 (m, 1H); 4,04 (dd, 1H); 3,78 (dd, 1H); 3,65
	(m, 2H); 2,63 (t, OH); 2,25 (d, 6H)

4.4.4 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 1-Acyl-2,3-*O*isopropylidenglycerin^[108]

Zu einer unter Stickstoffatmosphäre gerührten Lösung von 4,0 g (30 mmol) Acetonglycerin, 0,37 g (3 mmol) DMAP und 33 mmol der jeweiligen Fettsäure in 90 ml trockenem CCl₄ wird eine Lösung von 6,8 g DCC in 60 ml trockenem CCl₄ gegeben. Bereits nach kurzer Zeit ist eine Trübung der Lösung durch den ausfallenden Harnstoff zu beobachten. Die Lösung wird 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend im Eisbad abgekühlt und über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 5 : 1).

Ausbeute: 83 % (Lit.: 90 %)^[108] R_f-Wert: 0,42 (Hexan/Essigester = 5 : 1) 4.4.4.1 1-Oleoyl-2,3-O-isopropylidenglycerin

¹HNMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,34 (m, 2H); 4,32 (m, 1H); 4,13 (m, 3H); 3,74 (dd, 1H); 2,34 (t, 2H); 2,01 (m, 4H); 1,62 (m, 2H); 1,40 (d, 6H); 1,27 (m, 20H); 0,88 (t, 3H)

4.4.4.2 1-Linoloyl-2,3-*O*-isopropylidenglycerin

¹HNMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,35 (m, 4H); 4,32 (m, 1H); 4,12 (m, 3H); 3,74 (dd, 1H), 2,77 (m, 2H); 2,34 (t, 2H); 2,05 (m, 4H); 1,63 (m, 2H); 1,40 (d, 6H); 1,29 (m, 14H); 0,89 (t, 3H)

4.4.4.3 1-Linolenoyl-2,3-O-isopropylidenglycerin

¹HNMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,37 (m, 6H); 4,32 (m, 1H); 4,13 (m, 3H); 3,74 (dd, 1H), 2,81 (m, 4H); 2,35 (t, 2H); 2,07 (m, 4H); 1,63 (m, 2H); 1,40 (d, 6H); 1,31 (m, 8H); 0,98 (t, 3H)

4.4.5 Allgemeine Vorschrift zur Entschützung von 1-Acyl-2,3-*O*isopropylidenglycerin^[86]

Eine Mischung aus 1 mmol isopropylidengeschützten Monoglycerid, 300 mg Montmorillonit K10 und einem Tropfen Wasser (0,05 ml) in 20 ml THF wird 5 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist,trennt man den Katalysator durch Filtration über eine Kieselgelschicht ab und zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 1 : 2).

Ausbeute: 82 - 87 %R_f-Wert: 0,20 (Hexan/Essigester = 1 : 2)

4.4.5.1	1-Oleoylglycerin

¹ HNMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 5,35 (m, 2H); 4,15 (m, 2H); 3,96 – 3,55 (m, 3H);
	3,33 (s, OH); 3,01 (s, OH); 2,35 (t, 2H); 1,99 (m, 4H);
	1,61 (m, 2H); 1,29 (m, 20H); 0,88 (t, 3H)

- C, H, N: ber.: C 70,74 % H 11,31 % $(C_{21}H_{40}O_4)$
 - gef.: C 70,75 % H 11,18 % (356,54)
- MS: $(200 \,^{\circ}\text{C}) \,^{\text{M}^+} + \text{NH}_4^+ : 374 \, (100 \,\%)$

4.4.5.2 1-Linoloylglycerin

- ¹HNMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,36 (m, 4H); 4,15 (m, 2H); 3,95 3,55 (m, 3H); 3,27 (s, OH); 2,95 (s, OH); 2,77 (m, 2H); 2,35 (t, 2H); 2,05 (m, 4H); 1,61 (m, 2H); 1,31 (m, 14H); 0,89 (t, 3H)
- C, H, N: ber.: C 71,15 % H 10,80 % $(C_{21}H_{38}O_4)$ gef.: C 70,11 % H 10,89 % (354,53) MS: (200 °C) M⁺ +NH₄⁺ : 372 (100 %)
- 4.4.5.3 1-Linolenoylglycerin
- ¹HNMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,37 (m, 6H); 4,15 (m, 2H); 3,94 3,58 (m, 3H); 3,17 (s, OH); 2,81 (m, 4H + OH); 2,35 (t, 2H); 2,08 (m, 4H); 1,62 (m, 2H); 1,31 (m, 8H); 0,98 (t, 3H)
- C, H, N: Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit konnte die Substanz nicht analysenrein erhalten werden.

MS: $(200 \,^{\circ}\text{C})$ M⁺ +NH₄⁺: 370 (100 %)

4.4.6 1,3-Benzylidenglycerin

Eine Lösung von 36,8 g (0,4 mol) Glycerin und 47.8 g (0,45 mol) Benzaldehyd in 400 ml abs. Toluol werden unter Zusatz von 1,0 g (5,3 mmol) p-Toluol-

sulfonsäure in einer Soxhlet-Apparatur mit Molsieb 4 Å 8 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird zweimal mit 100 ml 1 %iger Kaliumcarbonatlösung gewaschen. Man trocknet über Na₂SO₄ und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wird im Vakuum fraktioniert destilliert. In den Kolben mit dem öliges Produkt leitet man HCl-Gas ein, verschließt ihn und stellt ihn für 48 Stunden in den Kühlschrank. Das vollständig kristallisierte Produkt wird anschließend in 300 ml Toluol gelöst. Man wäscht zweimal mit 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung, trocknet über Na₂SO₄ und engt die Lösung im Vakuum auf ca. 100 ml ein. Durch Zugabe von 150 ml Petrolether wird das 1,3-Benzylidenglycerin ausgefällt, abfiltriert und nochmals aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch umkristallisiert.

Ausbeute: 23,0 g (32 %) Smp.: 81 °C (Lit.: 82,5 – 83,5 °C)^[147] ¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 7,51 – 7,34 (m, 5H); 5,52 (s, 1H); 4,11 (m, 4H); 3,58 (m, 1H); 3,25 (d, OH) C, H, N: ber.: C 66,65 % H 6,71 % (C₁₀H₁₂O₃) gef.: C 66,49 % H 6,58 % (180,20)

4.4.7 1,3-Benzyliden-2-O-tert-butyldiphenylsilylglycerin

5,0 g (28 mmol) 1,3-Benzylidenglycerin, 8,1g (30 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid und 1,7 g (14 mmol) DMAP werden in 100 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gerührt. 9,6 ml (69 mmol) Triethylamin werden langsam zugetropft, und man läßt über Nacht bei RT rühren. Anschließend wird die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase wird noch zweimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Man trocknet die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der ölige Rückstand wird mit Hexan : Essigester = 1 : 1 über eine Kieselgelschicht filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man ein Öl, das ohne Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 11,5 g (99 %)

4.4.8 2-O-tert-Butyldiphenylsilylglycerin

10.0 g 1,3-Benzyliden-2-*O-tert*-butyldiphenylsilylglycerin werden in 200 ml Methanol unter Zusatz von 200 mg Paladium auf Aktivkohle (10 %) über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt. Man filtriert den Katalysator über Celite ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 1 : 1).

Ausbeute:	4,4 g (56 %)			
R _f -Wert:	0,35 (Hexan : Essigs	sester $= 1 : 1$)	
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 7,69	9 – 7,25 (m,	10H); 3,82 (m, 11	H); 3,60 (t, 4H);
	2,10 (t, 2 OH); 1,08	(s, 9H)		
C, H, N:	ber.: C 69,05 %	H 7,93 %	$(C_{19}H_{26}O_{3}Si)$	
	gef.: C 68,87 %	H 7,88 %	(330,50)	

4.4.9 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 1,3-Diacyl-2-*O-tert*butyldiphenylsilylglycerin

Zu einer unter Stickstoffatmosphäre gerührten Lösung von 4,3 g (13 mmol) 1,3-Benzyliden-2-*O-tert*-butyldiphenylsilylglycerin, 0,33 g (2.7 mmol) DMAP und 27 mmol der jeweiligen Fettsäure in 90 ml trockenem CCl₄ wird eine Lösung von 5,6 g DCC (27 mmol) in 60 ml trockenem CCl₄ gegeben. Bereits nach kurzer Zeit ist eine Trübung der Lösung durch den ausfallenden Harnstoff zu beobachten. Die Lösung wird 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend im Eisbad abgekühlt und über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 5 : 1).

 R_{f} -Wert: 0,65 (Hexan/Essigester = 5 : 1)

4.4.9.1 1,3-Dioleoyl-2-O-tert-butyldiphenylsilylglycerin

Ausbeute: 10,4 g (91 %)

¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 7,69 – 7,34 (m, 10H); 5,35 (m, 4H); 4,06 (m, 5H); 2,13 (t, 4H); 2,00 (m, 8H); 1,53 (m, 4H); 1,26 (m, 40H); 1,05 (s, 9H); 0,88 (t, 6H)

4.4.9.2 1,3-Dilinoloyl-2-O-tert-butyldiphenylsilylglycerin

Ausbeute: 8,2 g (74 %)

¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 7,67 – 7,35 (m, 10H); 5,36 (m, 8H); 4,14 (m, 5H); 2,77 (m, 4H); 2,18 (t, 4H); 2,01 (m, 8H); 1,55 (m, 4H); 1,29 (m, 28H); 1,05 (s, 9H); 0,89 (t, 6H)

4.4.9.3 1,3-Dilinolenoyl-2-*O-tert*-butyldiphenylsilylglycerin

Ausbeute: 7,2 g (64 %)

¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 7,70 – 7,38 (m, 10H); 5,37 (m, 12H); 4,15 (m, 5H); 2,78 (m, 8H); 2,17 (t, 4H); 1,99 (m, 8H); 1,56 (m, 4H); 1,29 (m, 16H); 1,04 (s, 9H); 0,99 (t, 6H)

4.4.10 Allgemeine Vorschrift zur Entschützung von 1,3-Diacyl-2-*O-tert*butyldiphenylsilylglycerin

Das geschützte 1,3-Diglycerid wird in einer 1 M Lösung von Tertrabutylammoniumfluorid in THF (2 Äquivalente) 3 Stunden unter Stickstoffatmosphäre bei RT gerührt. Die Lösung wird zur Trockne im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Es wird dreimal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt, indem zunächst mit reinem Methylenchlorid als Laufmittel die abgespaltene Schutzgruppe sowie alle Nebenprodukte abgetrennt werden, und anschließend mit Hexan : Essigester = 3 : 1 das Diglycerid eluiert wird.

Ausbeute:	38 - 50 %
R _f -Wert:	0,41 (Hexan : Essigsester = 3 : 1); 1,2-Isomer: 0,31

4.4.10.1 1,3-Dioleoylglycerin

¹ H-NMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 5,34 (m, 4H); 4,22 – 4,06 (m, 5H);
	2,35 (t, 4H); 2,01 (m, 8H); 1,62 (m, 4H); 1,27 (m, 40H);
	0,88 (t, 6H)

- C, H, N: ber.: C 75,43 % H 11,69 % $(C_{39}H_{72}O_5)$ gef.: C 75,14 % H 11,74 % (620,99)
- MS: (200 °C) M⁺ +NH₄⁺: 638 (100 %) 358 (37 %), 374 (28 %)

4.4.10.2 1,3-Dilinoloylglycerin

¹ H-NMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 5,36 (m, 8H); 4,20 – 4,07 (m, 5H);
	2,77 (m, 4H); 2,35 (t, 4H); 2,05 (m, 8H); 1,63 (m, 4H);
	1,31 (m, 28H); 0,89 (t, 6H)

- C, H, N: ber.: C 75,93 % H 11,11 % (C₃₉H₆₈O₅) gef.: C 75,72 % H 11,37 % (616,96)
- MS: $(200 \ ^{\circ}C)$ $M^{+} + NH_{4}^{+} : 634 \ (100 \ \%)$

4.4.10.3 1,3-Dilinolenoylglycerin

¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,37 (m, 12H); 4,31 – 4,10 (m, 5H); 2,81 (m, 8H); 2,35 (t, 4H); 2,08 (m, 8H); 1,62 (m, 4H); 1,31 (m, 16H); 0,98 (t, 6H) C, H, N: Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit konnte die Substanz nicht analysenrein erhalten werden.
MS: (200 °C) M⁺ +NH₄⁺: 630 (100 %)

4.4.11 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von symmetrischen 1,2,3-Triacylglyceriden

Zu einer unter Stickstoffatmosphäre gerührten Lösung von 0,46 g (5 mmol) Glycerin, 0,18 g (1,5 mmol) DMAP und 17 mmol der jeweiligen Fettsäure in 60 ml trockenem THF wird eine Lösung von 3,5 g DCC (17 mmol) in 40 ml trockenem THF gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend im Eisbad abgekühlt und über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 5 : 1).

Ausbeute: 12 - 17 %R_f-Wert: 0,69 (Hexan : Essigester = 5 : 1)

4.4.11.1 1,2,3-Trioleoylglycerin

¹ H-NMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 5,34 (m, 6H); 5,26 (m, 1H); 4,29 (dd, 2H);
	4,14 (dd, 2H); 2,31 (m, 6H); 2,01 (m, 12H); 1,59 (m, 6H);
	1,28 (m, 60H); 0,88 (t, 9H)
C, H, N:	ber.: C 77,32 % H 11,84 % $(C_{57}H_{104}O_6)$
	gef.: C 77,30 % H 11,89 % (885,45)
MS:	(200 °C) M ⁺ +NH ₄ ⁺ : 902 (100 %) 657 (13 %), 410

4.4.11.2 1,2,3-Trilinoloylglycerin

- ¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,35 (m, 12H + 1H); 4,29 (dd, 2H); 4,14 (dd, 2H); 2,77 (m, 6H); 2,32 (m, 6H); 2,05 (m, 12H); 1,60 (m, 6H); 1,30 (m, 42H); 0,89 (t, 9H)
- C, H, N: ber.: C 77,85 % H 11,23 % (C₅₇H₉₈O₆)
 - gef.: C 77,38 % H 11,32 % (879,40)
- MS: (200 °C) M⁺ +NH₄⁺ : 896 (100 %) 391 (92 %), 312 (67 %), 447
- 4.4.11.3 1,2,3-Trilinolenoylglycerin
- ¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,36 (m, 18H + 1H); 4,25 (dd, 2H); 4,14 (dd, 2H); 2,81 (m, 12H); 2,32 (m, 6H); 2,07 (m, 12H); 1,60 (m, 12H); 1,31 (m, 24H); 0,98 (t, 9H)
- C, H, N: Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit konnte die Substanz nicht analysenrein erhalten werden.
- MS: (200 °C) M⁺ +NH₄⁺ : 890 (90 %) 391 (100 %), 464

4.4.12 1,3-Dibutyroylglycerin^[148]

10,9 g (50 mmol) 1,3-Dibrom-2-propanol werden mit 11,0 g Natriumbutyrat (100 mmol) vermengt und 4 Stunden auf 110 °C erhitzt. Nach ca. 1 Stunde verflüssigt sich die Masse und Natriumbromid scheidet sich ab. Man läßt auf Raumtemperatur abkühlen und gibt 200 ml Ether hinzu. Es wird vom unlöslichen Salz abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird anschließend im Vakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 7,5 g (65 %) Sdp.: $103 - 105 \ ^{\circ}C (0,5 \text{ mbar}) (\text{Lit.: } 173 - 176 \ ^{\circ}C; 25 \text{ mbar})^{[148]}$ ¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 4,33 – 4,04 (m, 5H); 2,90 (s, OH); 2,31 (t, 4H); 1,64 (m, 4H); 0,93 (t, 6H)

4.4.13 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 1,3-Dibutyroyl-2acylglycerin

Zu einer unter Stickstoffatmosphäre gerührten Lösung von 1,74 g (7,5 mmol) 1,3-Dibutyroylglycerin, 0,10 g (0,8 mmol) DMAP und 8 mmol der jeweiligen Fettsäure in 30 ml trockenem CCl₄ wird eine Lösung von 1,65 g DCC (8 mmol) in 20 ml trockenem CCl₄ gegeben. Die Lösung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend im Eisbad abgekühlt und über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Hexan : Essigester = 5 : 1).

Ausbeute:	46 %
R _f -Wert:	0,36 (Hexan : Essigsester = 5 : 1); 1,2-Isomer: 0,45

4.4.13.1 1,3-Dibutyroyl-2-oleoylglycerin

¹ H-NMR:	(CDCl ₃ /TMS) δ 5,34 (m, 2H); 5,28 (m, 1H); 4,31 (dd, 2H);
	4,15 (dd, 2H); 2,31 (m, 6H); 2,00 (m, 4H); 1,66 (m, 6H);
	1,29 (m, 20H); 0,95 (m, 9H)
C, H, N:	ber.: C 70,12 % H 10,55 % $(C_{29}H_{52}O_6)$
	gef.: C 70,14 % H 10,50 % (496,73)
MS:	$(200 \ ^{\circ}\text{C}) \qquad \text{M}^{+} + \text{NH}_{4}^{+} : 514 \ (100 \ \%)$
	408, 390

4.4.13.2 1,3-Dibutyroyl-2-linoloylglycerin

¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,35 (m, 4H); 5,28 (m, 1H); 4,31 (dd, 2H); 4,15 (dd, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,30 (m, 6H); 2,05 (m, 4H); 1,64 (m, 6H); 1,31 (m, 14H); 0,95 (m, 9H)

C, H, N:	ber.: C 70,41 %	H 10,19 %	$(C_{29}H_{50}O_6)$
	gef.: C 70,48 %	H 10,35 %	(494,71)
MS:	(200 °C) $M^+ + N^-$	${\rm H}_4^+:512~(100)$	0%)

4.4.13.3 1,3-Dibutyroyl-2-linolenoylglycerin

- ¹H-NMR: (CDCl₃/TMS) δ 5,36 (m, 6H); 5,28 (m, 1H); 4,31 (dd, 2H); 4,15 (dd, 2H); 2,81 (t, 4H); 2,30 (m, 6H); 2,08 (m, 4H); 1,64 (m, 6H); 1,31 (m, 8H); 0,95 (m, 9H)
- C, H, N: Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit konnte die Substanz nicht analysenrein erhalten werden.
- MS: $(200 \ ^{\circ}\text{C})$ M⁺ +NH₄⁺ : 510 (100 %) 492

4.4.14 Darstellung technisch reiner Mono- und Diglyceride durch Umesterung von nativen Triglyceriden mit Glycerin^[149]

Eine Mischung aus 30 g raffineriertem Sonnenblumenöl, 10 g wasserfreiem Glycerin und 0,2 g Trinatriumphosphat wird unter Stickstoffatmosphäre 2 Stunden lang auf 225 °C erhitzt. Nach ca. 1 Stunde bildet sich eine einheitliche Phase. Nach dem Abkühlen gibt man 100 ml Ether hinzu und stellt die Reaktionslösung über Nacht in den Kühlschrank. Am nächsten Morgen filtriert bzw. dekantiert man vom Katalysator und vom überschüssigen Glycerin ab. Es wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene Produktgemisch aus Mono- und Diglyceriden wird säulenchromatographisch getrennt. Dazu werden zunächst die Diglyceride mit Hexan : Essigester = 3 : 1 eluiert, anschließend stellt man für die Gewinnung der Monoglyceride das Laufmittel auf Hexan : Essigester = 1 : 2 um.

Ausbeute 13,0 g Monoglyceride 8,2 g 1,3-Diglyceride 3,6 g 1,2-Diglyceride Produktverteilung: (52 % : 33 % : 15 %)

4.5 Darstellung der Stärke-Glycerid-Komplexe

4.5.1 Lösen von Stärke und Amylose im Autoklaven

8 g entfettete Amylose werden fein gemörsert und in etwa 80 ml Ethanol suspendiert. Die Suspension wird unter kräftigem Rühren in 550 ml Wasser gegeben. Zur Entfernung des Alkohols werden unter Stickstoffatmosphäre 220 ml des Lösungsmittels abdestilliert. Bei Verwendung von nativer Stärke suspendiert man 8 g entfetteter Stärke direkt in 400 ml Wasser und kocht unter Stickstoffatmosphäre kurz auf. Die heiße Stärkesuspension wird in den vorgeheizten Autoklaven (Manteltemperatur 120 °C) gegeben. Man erhöht die Temperatur auf 190 °C und rührt bei 400 U/min. Nach 1½ – 2 Stunden ist eine Innentemperatur von 140 °C erreicht. Der Autoklav wird aus dem Heizmantel genommen und an der Luft auf 100 °C abgekühlt. Nach dem Öffnen wird die heiße Amyloselösung durch dicht gepreßte Filterwatte gesaugt und mit kochendem, deoxigeniertem Wasser auf 800 ml aufgefüllt, so daß man eine 1 % ige Lösung erhält. Um einer vorzeitigen Retrogradation zu vermeiden, wird die Stärkelösung bis zur weiteren Umsetzung bei 100 °C verwahrt.

4.5.2 Darstellung von Stärke-Glycerid-Komplexen durch Ausfällen aus einer wäßrigen Amyloselösung

Die entfettete Stärke bzw. Amylose wird wie beschrieben im Autoklaven gelöst. Je Gramm Amylose werden 50 – 200 mg des entsprechenden Glycerids in ein separates Gefäß eingewogen und mit der in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Menge Emulgatorlösung versetzt.

Emulgator	Gewichtsanteile			
Emulgator	Emulgator	Glycerid	Wasser	
Natriumcholat	1	5	100	
Phospholipon 90H	1	5	100	
Natriumoleat	1	25	1000	

Tab. 22: Zusammensetzung der Glyceridemulsionen

Die Gefäße werden dicht verschlossen und für ca. 30 - 60 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C behandelt, bis sich im Fall der Monoglyceride klare, durchsichtige Dispersionen, oder bei der Emulgierung von Di- und Triglyceriden stabile, milchig-weiße Suspensionen gebildet haben. Dabei wird häufiger von Hand umgeschüttelt. Währenddessen wird die Stärkelösung auf die gewählte Komplexierungstemperatur abgekühlt und die Glyceridemulsionen anschließend unter kräftigem Rühren zugegeben. Man läßt den Komplexierungsansatz langsam unter Rühren über Nacht im Heizpilz auf Raumtemperatur abkühlen. Der gebildete Komplex wird abzentrifugiert (20 min bei 7000 U/min), mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Zur Entfernung anhaftender Lipide wird der getrocknete Komplex gründlich gemörsert und dreimal je 30 Minuten mit Methylenchlorid gewaschen. Man trocknet im Vakuum bei Raumtemperatur und bewahrt den Amylosekomplex bis zur weiteren Analyse bei –24 °C im Tiefkühlfach auf.

4.5.3 Darstellung von Stärke-Glycerid-Extrudaten

Eine Mischung aus 12 g nativer, entfetteter Stärke und 3 g Wasser werden unter Zusatz von 0 - 8 % (0 - 1, 2 g) Mono-, Di- oder Triglyceriden in einem Mörser gründlich miteinander vermengt und anschließend bei folgenden Bedingungen extrudiert:

Temperaturprofil: $70 - 80 - 90 - 90 \,^{\circ}\mathrm{C}$ Schneckengeschwindigkeit: $50 \,^{-1}$ Kompressionsverhältnis:1:1Düsendurchmesser: $2 \,\mathrm{mm}$

Die erhaltenen Extrudate werden im Vakuum über P_2O_5 getrocknet und bis zur weiteren Analyse im Tiefkühlfach bei -24 °C aufbewahrt.

4.5.4 Darstellung von Stärke-Glycerid-Adsorbaten für die Stabilitätsuntersuchungen

4 g Stärke, Amylose oder Amylopektin werden unter Zusatz von 3 - 10 % (120 – 400 mg) Glycerid in 100 ml Methylenchlorid 30 Minuten bei RT gerührt. Die Lipidmenge sollte dabei mit dem Gastgehalt der entsprechenden Amylose-komplexe vergleichbar sein. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und die Adsorbate anschließend im Vakuum bei RT getrocknet.

4.6. Analytik

4.6.1 UV-Spektroskopie

4.6.1.1 Blauwertbestimmung von Stärken

Etwa 100 mg Stärke werden genau in einen 100 ml Meßkolben eingewogen und nach Zugabe von 10 ml 1N Natronlauge im Wasserstrahlvakuum gelöst. Man neutralisiert mit 10 ml 1N Salzsäure, versetzt mit 5 ml Phosphatpuffer (pH 7) und füllt mit dest. Wasser bis zur Markierung auf. 1 ml dieser Lösung wird in einen weiteren 100 ml Meßkolben pipettiert, mit 90 ml Wasser sowie 1 ml einer 0,2 %igen Iodlösung versetzt und bis zur Markierung mit dest. Wasser aufgefüllt. Nach 20 Minuten bestimmt man die Extinktion dieser Lösung bei 680 nm, wobei als Referenz die reine Iodlösung dient (1 ml der 0,2 %igen Iodlösung in 100 ml Wasser). Der Blauwert errechnet sich dann zu:

$$B.V. = \frac{4 \cdot E}{c}$$

E : Extinktion der Lösung bei 680 nm

c : Konzentration in mg Amylose/100 ml Lösung

0,2 %ige Iodlösung: 2,00 g Iod und 20,0 g Kaliumiodid in 1000 ml dest. Wasser

4.6.1.2 Blauwertbestimmung der Extrudate

Etwa 100 mg des Extrudates werden genau in einen 100 ml Meßkolben eingewogen und in 10 ml DMSO unter Erwärmen gelöst. Anschließend füllt man mit dest. Wasser bis zur Markierung auf. 1 ml dieser Lösung wird in einen neuen 100 Meßkolben pipettiert; das weitere Vorgehen entspricht exakt dem unter 4.6.1 beschriebenen Verfahren.

4.6.2 Gelpermeationschromatographie

4.6.2.1 Kalibrierung

Das GPC-System wird mit Hilfe von Pullulan-Standards ($M_n = 5.400 - 1.400.000$) kalibriert. Man erhält folgende Eichkurve:



Abb. 52: Eichkurve des GPC-Systems

4.6.2.2 Bestimmung der Molgewichtsverteilung von Stärken

10 mg einer entfetteten Stärke werden in ein dicht verschließbares Schraubdeckelgefäß eingewogen und nach Zusatz von 5 ml dest. Wasser 15 min unter Rühren bei 150 °C erhitzt. Die Stärkelösung wird membranfiltriert und direkt analysiert.

4.6.3 Gaschromatographie

Sämtliche GC-Analysen werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule:	BPX 70; 50 m; 0,2 mm ID
Injektor:	250 °C
Split:40 ml/minTemperaturprog.:180 °C (23 min), 5 °C/min, 240 °C (10 min)Detektor:FID, 260 °CTrägergas:Helium, 120 kPa

4.6.3.1 GC-Analyse der Fettsäuregemische während der Aufreinigung

30 mg eines Fettsäuregemisches werden in ein dicht verschließbares Schraubdeckelgefäß eingewogen und mit 1ml einer 0,2 M methanolischen TMSH-Lösung versetzt. Man erhitzt die Lösung für 20 Minuten im Wasserbad auf 100 °C und gibt anschließend 1 ml Toluol hinzu. Die Reaktionslösung wird ohne weitere Aufarbeitung direkt gaschromatographisch analysiert.

4.6.3.2 Bestimmung der Methodenfaktoren für die quantitative Analyse

Die Methodenfaktoren der Mono-, Di- und Triglyceride werden getrennt bestimmt. Dazu werden je 10 – 20 mg des jeweiligen Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäurederivates zusammen mit etwa 20 mg Heptadecansäure exakt in ein dicht verschließbares Schraubdeckelgefäß eingewogen und mit 2 ml einer 0,2 M methanolischen TMSH-Lösung versetzt. Die Mischung wird für 20 Minuten im Wasserbad auf 100 °C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 1 ml Toluol versetzt. Es werden jeweils drei dieser Kalibrierlösungen hergestellt und mehrfach gaschromatographisch analysiert. Aus den prozentualen Flächenintegralen der einzelnen Peaks im Chromatogramm und den Einwaagen der Glyceride bzw. des internen Standards lassen sich die jeweiligen Methodenfaktoren nach folgender Formel ermitteln:

$$f_{_{M}} = \frac{m_{_{Glycerid}} \cdot \%_{_{int.Standard}}}{m_{_{int.Standard}} \cdot \%_{_{Glycerid}}}$$

m = Einwaage in mg% = prozentualer Anteil im GC

	Methodenfaktor f _M				
	C18:1	C18:2	C18:3		
Monoglyceride	1,2507	1,2731	1,6353		
Diglyceride	1,1022	1,1502	1,4651		
symm. Triglyceride	1,1564	1,2103	1,9548		
Dibutyroyltriglyceride	1,8171	1,8690	2,3095		

Für die verschiedenen Glyceride wurden folgende Methodenfaktoren bestimmt:

Tab. 23: Methodenfaktoren der Glyceride

4.6.3.3 Gehaltsbestimmung von Stärke-Glycerid-Komplexen

In ein dicht verschließbares Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß werden etwa 100 mg des trockenen Komplexes sowie 5 – 10 mg Heptadecansäure genau eingewogen. Man gibt 1 ml Methanol hinzu und erhitzt die Mischung für 15 Minuten im kochenden Wasserbad. Während der Extraktion der Glyceride muß die Suspension gut gerührt werden. Man gibt 1 ml Toluol hinzu und zentrifugiert von der unlöslichen Amylose ab. Von der überstehenden Lösung pipettiert man 0,5 ml in ein weiteres Schraubdeckelgefäß, versetzt mit 0,5 ml TMSH-Lösung und erhitzt die Mischung zur Umesterung der Glyceride in die entsprechenden Methylester weitere 20 Minuten im Wasserbad auf 100 °C. Die Lösung wird filtriert und direkt gaschromatographisch analysiert. Der genaue Gastgehalt des Komplexes ergibt sich aus den Einwaagen und den bekannten Methodenfaktoren nach folgender Formel:

$$m_{Glycerid} = f_{M} \cdot \frac{m_{int.Standard} (mg) \cdot \%_{Lipid}}{\%_{int.Standard} \cdot m_{Komplex}(g)}$$
 in mg Glycerid/g Komplex

4.6.4 NMR-Spektroskopie

4.6.4.1 Gehaltsbestimmung von Stärke-Glycerid-Komplexen

Es werden etwa 40 mg des trockenen Komplexes in ein kleines Schraubdeckelgefäß eingewogen und mit 0,8 ml einer Mischung aus d₆-DMSO : DCl (37 %ig) = 15 : 1 versetzt. Das Gefäß wird dicht verschlossen und für ca. 1 Stunde im Trockenschrank auf 70 °C temperiert. Im Fall von Triglyceridkomplexen werden aufgrund der geringen Löslichkeit der Triglyceride in DMSO anschließend noch 0,4 ml CDCl₃ zugesetzt. Die so erhaltene Komplexlösung wird ¹H-NMR-spektroskopisch vermessen.



Abb. 53: ¹H-NMR-Spektrum eines Amylose-Monolinolat-Komplexes

Die Komplexstöchiometrie des Komplexes läßt sich aus dem Integral der 7 AHG-Protonen in Relation zu dem Integral der Methylenprotonen (b) des Gastes ermitteln. Alternativ kann die Berechnung auch mit Hilfe des Signals der Doppelbindungsprotonen (d) erfolgen. Unter Berücksichtigung der Protonen am Glycerinrest (h), deren Signale im Bereich der AHG-Protonen liegen, ergibt sich folgende allgemeine Formel:

Gastgehalt in mg/g Amylose =
$$\frac{x \cdot Int_{b/d}}{Int_{AHG} - y \cdot Int_{b/d}}$$

 $Int_{b/d}: Integral der Methylen- (b) bzw. Doppelbindungsprotonen (d) des Gastes Int_{AHG}: Intergal der AHG-Protonen (5,3 – 2,9 ppm)$

Die nachfolgende Tabelle enthält die Werte für die Vorfaktoren x und y in Abhängigkeit des Gastmoleküles:

Gastmolekül		Х		у	
		Int _b	Int _d	Int _b	Int _d
	C18:1	769,64	5/20	7696,37	5/2
Monoglyceride	C18:2	1093,28	5/14	3826,49	5/4
	C18:3	1902,35	5/8	2536,46	5/6
	C18:1	670,24	5/40	6702,43	5/4
Diglyceride	C18:2	951,27	5/28	3329,47	5/8
	C18:3	1653,86	5/16	2205,15	5/12
	C18:1	637,12	5/60	6371,19	5/6
symm. Triglyceride	C18:2	903,95	5/42	3163,83	5/12
	C18:3	1571,01	5/24	2094,68	5/18
	C18:1	1072,26	5/20	10722,55	5/2
Dibutyroyltriglyceride	C18:2	1525,56	5/14	5339,48	5/4
	C18:3	2658,84	5/8	3545,12	5/6

Tab. 24: Werte der Korrekturfaktoren x und y zur Berechnung der Gastgehalte

4.6.5 DSC-Messungen

Für die DSC-Messungen werden etwa 25 mg eines gefriergetrockneten Komplexes in einen druckdichten Edelstahltiegel mit einem Fassungsvermögen von 150 µl genau eingewogen. Man gibt 100 µl destilliertes Wasser hinzu und verrührt die Mischung mit einer Nadel zu einer Suspension. Der Tiegel wird verschlossen und gegen einen Vergleichstiegel, der 125 µl Wasser enthält, nach Temperierung auf Raumtemperatur mit 5 °C/min linear auf 150 °C aufgeheizt. Die Temperatur- und Enthalpieeichung erfolgte über die Schmelzkurven hochreiner Standards.

4.6.6 Röntgendiffrakometrie

Die Stärkeextrudate werden zunächst in einem Achatmörser und anschließend mit Hilfe einer Kugelmühle fein zermahlen. Die Proben werden ungesiebt mit Hilfe von Silikonschliffett auf einer goldbeschichteten Trägerfolie aufgebracht und direkt vermessen. Die Aufnahme der Röntgendiffraktogramme erfolgt in einem Winkelbereich von $2\theta = 4 - 28$ ° mit $\Delta \theta = 0,004$ ° und $\Delta t = 20$ s.

Wellenlänge: $\lambda = 1,54051$ Å (Cu K_{$\alpha 1$})

4.6.7 Viskositätsmessungen

Für die Aufnahme der Viskositätsprofile werden je 105 g einer 5,5 % igen (w/w) Stärkesuspension (pH = 5,5) in einen Brabender Micro-Visco-Amylographen gegeben und konstant bei 75 Umin⁻¹ gerührt.

Temperaturprogramm: 50 °C — 95 °C — 95 °C — 50 °C — 50 °C (3 °C/min) (5 min) (3 °C/min) (5 min)

Die Glyceride werden als wäßrige Natriumoleat- bzw. Natriumcholat-Emulsion vor Beginn der Messung zugegeben. Die Darstellung und Zusammensetzung der Emulsionen erfolgt gemäß 4.5.2. Die Lipidkonzentration beträgt dabei 2 % bezogen auf die eingesetzte Stärkemenge. Die Messungen der Vergleichsproben ohne Glyceridzusatz werden unter Zusatz der entsprechenden Mengen reiner Emulgatorlösung durchgeführt.

Gast-	Stärke	- Emulgator	Gastmenge	Temp.	Ausbeute	Gastgehalt
molekül	Starke	Emulgator	(mg/g Amylose)	(°C)	(%)	(mg/g Komplex)
MG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	30	90	90,1
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	30	68	88,1
MG C18:1	AM70		200	30	75	0,8
MG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	40	83	87,7
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	40	90	86,1
MG C18:1	AM70		200	40	66	5,1
MG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	50	81	92,9
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	50	80	89,0
MG C18:1	AM70		200	50	45	19,2
MG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	60	81	96,5
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	60	86	105,9
MG C18:1	AM70		200	60	74	35,7
MG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	70	77	98,7
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	70	89	109,5
MG C18:1	AM70		200	70	69	68,1
MG C18:2	AM70	Na-Cholat	200	70	69	93,0
MG C18:2	AM70	Na-Oleat	200	70	77	95,3
MG C18:3	AM70	Na-Cholat	200	70	63	89,8
MG C18:3	AM70	Na-Oleat	200	70	81	93,9
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	100	70	77	87,6
MG C18:2	AM70	Na-Oleat	100	70	81	88,3

4.6.8 Experimentelle Daten der Mono- und Diglyceridkomplexe

Gast-	Stärke	Emulgator	Gastmenge	Temp.	Ausbeute	Gastgehalt
motekui			(mg/g Amylose)	(°C)	(%)	(mg/g Komplex)
MG C18:3	AM70	Na-Oleat	100	70	78	77,2
MG C18:1	AM70	Na-Oleat	70	70	77	69,9
MG C18:2	AM70	Na-Oleat	70	70	75	67,5
MG C18:3	AM70	Na-Oleat	70	70	76	62,8
MG C18:1	KA	Na-Oleat	200	70	72	106,1
MG C18:2	KA	Na-Oleat	200	70	78	96,0
MG C18:3	KA	Na-Oleat	200	70	74	97,6
DG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	30	64	24,7
DG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	30	37	11,1
DG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	50	61	23,0
DG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	50	37	19,1
DG C18:1	AM70	Na-Cholat	200	70	54	21,0
DG C18:1	AM70	Na-Oleat	200	70	78	32,0
DG C18:1	AM70	Na-Cholat	100	30	85	11,7
DG C18:1	AM70	Na-Oleat	100	70	68	27,5
DG C18:1	AM70	Na-Cholat	50	30	71	5,8
DG C18:1	AM70	Na-Oleat	50	70	90	16,8
DG C18:2	AM70	Na-Cholat	200	30	64	26,4
DG C18:2	AM70	Na-Oleat	200	70	62	28,2
DG C18:3	AM70	Na-Cholat	200	30	92	29,2
DG C18:3	AM70	Na-Oleat	200	70	73	19,4
DG C18:1	KA	Na-Cholat	200	30	15	23,0
DG C18:1	KA	Na-Oleat	200	70	94	43,1
DG C18:2	KA	Na-Cholat	200	30	15	23,6
DG C18:2	KA	Na-Oleat	200	70	52	30,0
DG C18:3	KA	Na-Cholat	200	30	75	24,1
DG C18:3	KA	Na-Oleat	200	70	92	46,5

Tab. 25: Experimentelle Daten aller relevanten Stärke-Glycerid-Komplexe

5 Literatur

- [1] T. Ding, ZFL, Intern. Z. Lebensm. Technol. Verfahrenstech. 1995, 46, 14
- [2] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, 1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1992**
- [3] I. S. Newton, *INFORM* **1996**, *7*, 169
- [4] A. P. Simopoulos, Am. J. Clin. Nutr. 1991, 54, 438
- [5] A. Leaf, P. C. Weber, *The New England Journal of Medicine* **1988**, *318*, 549
- [6] B. Fitch-Haumann, *INFORM* **1997**, *8*, 428
- [7] M. Makrides, K. Simmer, M. Goggin, R. A. Gibson, *Pediatr. Res.* **1993**, *33*, 425
- [8] S. E. Carlson, S. H. Werkman, D. G. Rohdes, G. A. Todley, *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, 58, 35
- [9] C. I. Lanting, V. Fidler, M. Huisman, B. C. L. Touwen, E. R. Boersma, *Lancet* **1994**, *344*
- [10] C. Agostoni, S. Trojans, R. Bellu, M. Giovanni, *Pediatr. Res.* 1995, 38, 262
- [11] FAO/WHO, *Lipids in Early Development in Fats and Oils in Human Nutrition*, #57, 49, Rom **1994**
- [12] J. Dyerberg, H. O. Bang, N. Hjorne, Am. J. Clin. Nutr. 1975, 28, 958
- [13] D. Kromhout, E. B. Bosschieter, C. Coulander, *The New England Journal of Medicine* **1985**, *312*, 1205
- [14] A. Simopoulos, in *Nutrition and Aging*, **1990**, S. 129
- [15] R. R. Brenner, Prog. Lipid Res. 1982, 20, 41
- [16] British Nutrition Foundation, *Unsaturated fatty acids*. *Nutritional and physiological significance*., London **1992**
- [17] E. N. Frankel, J. Am. Oil Chem. Soc. 1984, 61, 1908
- [18] M. VanRollins, R. C. Murphy, J. Lipid Res. 1984, 25, 507
- [19] C. Andersen, Food Technol. Eur. 1994/1995, 104
- [20] J. Falbe, M. Regitz, 9. Aufl. (CD-ROM), Thieme-Verlag, Stuttgart, 1995.
- [21] L. F. Hood, in *Food Chemistry* (Hrsg. D. R. Lineback, G. E. Inglett), Westport, CT, 1982, S. 218
- [22] S. Hizukuri, Carbohydr. Res. 1986, 147, 342
- [23] C. T. Greenwood, *Stärke* **1960**, *12*, 169
- [24] G. Tegge, in *Encyklopädie der technischen Chemie, Band 22*, 4. Aufl. (Hrsg.: Ullmann), Verlag Chemie, Weinheim, **1982**, S. 165
- [25] D. J. Thomas, W. A. Atwell, *Starches*, American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, USA, **1999**
- [26] R. C. Hoseney, *Principles of Cereal Science and Technology*, 2. Aufl., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, **1994**
- [27] E. M. Montgomery, J. Polym. Sci. 1958, 18, 1
- [28] D. French, in *Starch: chemistry and technology* (Hrsg.: R. L. Whistler, J. N. BeMiller, E. F. Paschall), Academic Press Inc., London, **1984**, S. 183
- [29] J. V. M. Blanshard, in *Starch: Properties and Potential, Band 13* (Hrsg.: T. Galliard), **1987**, S. 16
- [30] A. Sarko, H.-C. H. Wu, Starch/Stärke 1978, 30, 73
- [31] A. Imberty, H. Chanzy, S. Peréz, A. Buléon, V. Tran, J. Mol. Biol. 1988, 201, 365
- [32] A. Imberty, S. Peréz, *Biopolymers* 1988, 27, 1205
- [33] T. l. Bluhm, P. Zugenmaier, *Carbohydr. Res.* 1981, 89, 1
- [34] G. Rappenecker, P. Zugenmaier, *Carbohydr. Res.* **1981**, 89, 11
- [35] J. Brisson, H. Chanzy, W. T. Winter, Int. J. Biol. Macromol. 1991, 13, 31

- [36] R. E. Rundle, J. Am. Chem. Soc. **1947**, 69, 1769
- [37] X. Yu, C. Houtman, R. H. Atalla, Carbohydr. Res. 1996, 292, 129
- [38] P. V. Bulpin, A. N. Cutler, A. Lips, *Macromolecules* 1987, 20, 44
- [39] Y. Hui, Y. Gai, Macromol. Chem. 1988, 189, 1287
- [40] S. Immel, F. W. Lichtenthaler, Starch/Stärke 2000, 52, 1
- [41] M. C. Godet, V. T. A. Buléon, P. Colonna, Carbohydr. Polym. 1993, 21, 91
- [42] M. C. Godet, V. Tran, M. M. Delange, A. Buléon, Int. J. Biol. Macromol. 1993, 15, 11
- [43] W. Banks, C. T. Greenwood, *Stärke* 1971, 23, 300
- [44] T. Kuge, S. Ono, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 1264
- [45] V. S. R. Rao, J. F. Foster, *Biopolymers* **1963**, *1*, 527
- [46] B. Pfannemüller, H. Meyerhofer, R. C. Schulz, *Biopolymers* 1971, 10, 243
- [47] Y. Muroga, *Macromolecules* **1992**, 25, 3385
- [48] M. B. Senior, E. Hamori, *Biopolymers* 1973, 12, 65
- [49] R. C. Jordan, D. A. Brant, A. Cesàro, *Biopolymers* 1978, 17, 2617
- [50] M. Yamamoto, T. Sano, T. Yasunaga, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1982, 55, 1886
- [51] T. Kuge, K. Takeo, Agr. Biol. Chem. 1968, 32, 1232
- [52] M. C. Godet, A. Buléon, H. Bizot, Carbohydr. Polym. 1995, 27, 47
- [53] G. Wulff, S. Kubik, Carbohydr. Res. 1992, 237, 1
- [54] S. Kubik, G. Wulff, Starch/Stärke 1993, 45, 220
- [55] K. Polewski, W. Maciejewska, Carbohydr. Res. 1993, 246, 243
- [56] A. Steinert, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), 1998
- [57] P. Tomasik, Y.-J. Wang, J. L. Jane, Starch/Stärke 1995, 47, 185
- [58] P. Tomasik, C. H. Schilling, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1998, 53, 263
- [59] H. Schlenk, R. T. Holman, *Science* **1950**, *112*, 19
- [60] H. Schlenk, D. M. Sand, J. A. Tillotson, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 3587
- [61] H. Yoshii, T. Furuta, K. Kawasaki, H. Hirano, Y. Morita, C. Shiina, S. Nakayama, *Oyo Toshitsu Kagaku* **1995**, *42*, 243
- [62] H. Yoshii, T. Furuta, A. Yasunishi, Y.-Y. Linko, P. Linko, in *Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrons* (Hrsg.: J. Szejtli, L. Szente), Kluwer Academic Publishers, **1996**, S. 579
- [63] J. M. López-Nicolàs, R. Bru, F. García-Carmona, J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 1144
- [64] N. Fujii, M. Hamano, K. Yuasa, Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995, 59, 1761
- [65] Y. Minemoto, S. Adachi, R. Matsuno, Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999, 63, 866
- [66] C. E. Stauffer, Cereal Foods World 2000, 45, 106
- [67] N. Krog, B. N. Jensen, J. Food Technol. 1970, 5, 77
- [68] E. M. Osman, L. J. Leith, M. Fles, Cereal Chem. 1961, 38, 449
- [69] G. Brauner, Dissertation, Westfälische-Wilhelms-Universität (Münster), 1978
- [70] F. Meuser, B. v. Lengerich, J. Stender, Getreide, Mehl Brot 1985, 39, 309
- [71] S. Bhatnagar, M. A. Hanna, Cereal Chem. 1994, 71, 582
- [72] C. Mercier, R. Charbonniere, J. Grebaut, J. F. d. l. Gueriviere, *Cereal Chem.* **1980**, *57*, 4
- [73] L. Acker, Fette, Seifen, Anstrichm. 1977, 79, 1
- [74] W. R. Morrison, D. L. Mann, W. Soon, A. M. Coventry, J. Sci. Food Agric. 1975, 26, 507
- [75] W. R. Morrison, S. L. Tan, K. D. Hargin, J. Sci. Food Agric. 1980, 31, 329
- [76] W. R. Morrison, J. Cereal Sci. 1988, 8, 1
- [77] T. Vasanthan, R. Hoover, Food Chem. 1992, 43, 19

- [78] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, in *The Lipid Handbook* (Hrsg.: F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Padley), Chapman and Hall Ltd., London, New York, **1986**, S. 171
- [79] H. Schlenk, Prog. Chem. Fats Other Lipids 1954, 2, 243
- [80] G. Y. Shinowara, J. B. Brown, J. Am. Chem. Soc. 1938, 60, 2734
- [81] M. Kaufmann, Chem. Ber. 1936, 69, 2684
- [82] J. P. Kass, W. R. Roy, G. O. Burr, Anal. Chem. 1947, 19, 21
- [83] N. L. Matthews, W. R. Brode, J. B. Brown, J. Am. Chem. Soc. 1941, 63, 1065
- [84] SGE, Chromatographie-Produkte, Katalog 1998/99
- [85] K. Yamauchi, T. Tanabe, M. Kinoshita, J. Org. Chem. 1979, 44, 638
- [86] T.-S. Li, S.-H. Li, Synth. Commun. 1997, 27, 2299
- [87] B. F. Daubert, H. H. Fricke, H. E. Longenecker, J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 2142
- [88] M. Gupta, J. Chem. Soc. 1952, 2405
- [89] J. L. Robinson, I. A. G. Weinert, J. Solms, Lebensm. Wiss. Technol. 1983, 16, 235
- [90] P. V. Bulpin, E. J. Welsh, E. R. Morris, Starch/Stärke 1982, 34, 335
- [91] T. Riisom, N. Krog, J. Eriksen, J. Cereal Sci. 1984, 2, 105
- [92] A.-C. Eliasson, N. Krog, J. Cereal Sci. 1985, 3, 239
- [93] J. Karkalas, S. Raphaelides, Carbohydr. Res. 1986, 157, 215
- [94] W. R. Morrison, A. M. Coventry, Starch/Stärke 1989, 41, 24
- [95] D. E. Hahn, L. F. Hood, Cereal Chem. 1987, 64, 81
- [96] W. T. Winter, A. Sarko, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1461
- [97] J.-L. Jane, J. F. Robyt, *Carbohydr. Res.* 1984, 132, 105
- [98] O. Höller, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), 1997
- [99] N. Krog, Stärke 1971, 23, 206
- [100] J. Holló, J. Szejtli, *Stärke* **1958**, *10*, 248
- [101] J. J. Myher, A. Kuksis, *Lipids* 1974, 9, 382
- [102] J. Szejtli, E. Bánky-Elöd, Starch/Stärke 1978, 30, 85
- [103] J. Karkalas, S. Ma, W. R. Morrison, R. A. Pethrick, Carbohydr. Res. 1995, 268, 233
- [104] G. Lehmann, H. Gottschlich, Fette, Seifen, Anstrichm. 1983, 85, 439
- [105] J. Nüssli, Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology (Zürich), 1998
- [106] H. D. Belitz, W. Grosch, in *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1992**, S. 146
- [107] K. Sato, Progr. Colloid Polym. Sci. 1998, 108, 58
- [108] S. J. Cockman, C. A. Joll, B.-C. Mortimer, T. G. Redgrave, R. V. Stick, Aust. J. Chem. 1990, 43, 2093
- [109] H. Gunz, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), 1991
- [110] Y. Yamashita, K. Monobe, J. Polym. Sci. 1971, A2, 1471
- [111] M. Tolksdorf, Dissertation, bisher unveröffentlicht, 1997
- [112] F. Meuser, B. v. Lengerich, J. Stender, Getreide, Mehl Brot 1985, 39, 205
- [113] S. Bhatnagar, M. A. Hanna, in *International Winter Meeting of the American Society* of Agriculturual Engineers, Hyatt Regency Chicago, Illinois, **1991**.
- [114] H. Liu, S. D. Arntfield, R. A. Holley, D. B. Aime, Cereal Chem. 1997, 74, 159
- [115] A. S. Navarro, M. N. Martino, N. E. Zaritzky, Lebensm. Wiss. Technol. 1996, 29, 632
- [116] K. Larsson, in *The Lipid Handbook*, 1. Aufl. (Hrsg.: F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Padley), Chapman and Hall, London, New York, **1986**, S. 321
- [117] J. Nuessli, B. Sigg, B. Conde-Petit, F. Escher, Food Hydrocolloids 1997, 11, 27
- [118] G. Becker, L. Acker, Fette, Seifen, Anstrichm. 1974, 76, 464
- [119] Y. Bayon, R. Dolmazon, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 345
- [120] R. Stute, G. Konieczny-Janda, Starch/Stärke 1983, 35, 340
- [121] S. Raphaelides, J. Karkalas, Carbohydr. Res. 1988, 172, 65

- [122] C. G. Biliaderis, C. M. Page, L. Slade, R. R. Sirett, Carbohydr. Polym. 1985, 5, 367
- [123] M. Kugimiya, J. W. Donovan, R. Y. Wong, Starch/Stärke 1980, 32, 265
- [124] C. G. Biliaderis, G. Galloway, *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 31
- [125] Y. J. Kim, R. J. Robinson, Stärke 1979, 31, 293
- [126] A.-C. Eliasson, H.-R. Kim, J. Rheol. 1995, 39, 1519
- [127] R. R. Roach, R. C. Hoseney, Cereal Chem. 1995, 72, 571
- [128] O. Harbitz, *Starch/Stärke* **1983**, *35*, 198
- [129] N. Krog, Stärke 1973, 25, 22
- [130] A.-C. Eliasson, G. Ljunger, J. Sci. Food Agric. 1988, 44, 353
- [131] N. Krog, S. K. Olesen, H. Toernaes, T. Joensson, Cereal Foods World 1989, 34, 281
- [132] P. L. Russel, J. Cereal Sci. 1983, 1, 273
- [133] B. Conde-Petit, F. Escher, J. Rheol. 1995, 39, 1497
- [134] S. Bhatnagar, M. A. Hanna, J. Food Sci. 1996, 61, 778
- [135] S. Bhatnagar, M. A. Hanna, Cereal Chem. 1994, 71, 587
- [136] N. Singh, P. Cairns, V. J. Morris, A. C. Smith, Cereal Chem. 1998, 75, 325
- [137] W. R. Mason, R. C. Hoseney, Cereal Chem. 1986, 63, 436
- [138] T. F. Schweizer, S. Reimann, J. Solms, A.-C. Eliasson, N.-G. Asp, *J. Cereal Sci.* **1986**, *4*, 249
- [139] G. I. Galloway, C. G. Biliaderis, D. W. Stanley, J. Food Sci. 1989, 54, 950
- [140] B. Nestl, W. Seibel, E. Menden, Getreide, Mehl Brot 1989, 43, 278
- [141] E. W. Eckey, M. W. Formo, J. Am. Oil Chem. Soc. 1949, 26, 207
- [142] R. L. Whistler, J. N. BeMiller, *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, **1997**
- [143] M. N. Azudin, W. R. Morrison, J. Cereal Sci. 1986, 4, 23
- [144] J. W. McCutcheon, in Organic Syntheses Collective Vol. 3, 1955, S. 531
- [145] C. J. Lacey, L. M. Loew, J. Org. Chem. 1983, 48, 5214
- [146] T. Cablewski, A. F. Faux, C. R. Strauss, J. Org. Chem. 1994, 59, 3408
- [147] P. E. Verkade, J. D. v. Roon, Bull. Soc. Chim. Fr. 1942, 831
- [148] F. Guth, Z. Biol. 1903, 78
- [149] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, K. N, in *The Lipid Handbook* (Hrsg.: F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Padley), Chapman and Hall ltd., London, New York, **1986**, S. 287

Alles hat ein Ende, nur die Wurst hat zwei.

(Stefan Remmler)