

Utjecaj temperature na kemijske promjene tijekom postupka ekstruzije

KUI 27/2003
Prispjelo 6. svibnja 2003.
Prihvaćeno 10. lipnja 2003.

D. Kovaček, A. Ninčević, I. Miljević, D. Vikić-Topić*, M. Brnčić,
D. Ćurić, B. Tripalo, D. Ježek, D. Karlović i M. Fegeš

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, HR-10 000 Zagreb, Hrvatska

*Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, HR-10 000 Zagreb, Hrvatska

Tijekom procesa ekstruzije dolazi do kemijskih promjena u sirovini, izazvanih toplinskom i mehaničkom energijom u ekstruderu.

Pod utjecajem visoke temperature dolazi do unakrsnog povezivanja aminokiselinskih ostataka u proteinima, što ima za posljedicu promjene proteinske strukture te nastanak novih izopeptidnih veza.

Budući da nastanak novih izopeptidnih veza pridonosi najvećim dijelom promjenama nutritivnih svojstava gotovog, ekstrudiranog proizvoda, naša istraživanja bila su usmjerena na proučavanje i interpretaciju njihovog nastanka primjenom metoda molekularnog modeliranja i FT-IR spektroskopije.

Ključne riječi: Ekstruzija, izopeptidne veze, molekularno modeliranje, FT-IR spektroskopija

Uvod

Šezdesetih godina prošlog stoljeća započela je primjena postupka ekstruzije u prehrambenoj industriji. Tijekom samog procesa uzorak se prisilno podvrgava jednoj ili više tehnoloških operacija: miješanju, stlačivanju mase, grijanju, smicanju te, konačno, ekspanziranju kroz prikladno formiranu sapnicu.

Tom je tehnologijom moguće proizvesti široku paletu novih proizvoda i unaprijediti one koji već postoje na tržištu. Proizvodi kao što su žitarice za doručak (breakfast cereals), "ready-to-eat" hrana, ravni kruhovi, modificirana brašna i škrob te hrana za kućne ljubimce čine samo dio velike palete proizvoda koje je moguće proizvesti tehnologijom ekstrudiranja.¹

Kemijske promjene tijekom procesa ekstruzije

Za vrijeme postupka ekstruzije uočena je pojava unakrsnog povezivanja aminokiselina i proteina koje nastaje zbog djelovanja visokih temperatura i tlaka na uzorak. Reakcije unakrsnog povezivanja proteina mogu se podijeliti na dvije osnovne skupine: reakcije disulfidnog tipa i reakcije nedisulfidnog tipa.

Prema nekim istraživanjima² pokazalo se da reakcije disulfidnog tipa utječu na strukturalna svojstva ekstrudiranih proizvoda. Također je uočeno da je količina nastalih disulfidnih veza vrlo niska jer sam postupak ekstruzije proteina potiče nastanak sulfhidrilnih grupa iz disulfidnih veza.

U drugu, nešto veću skupinu reakcija unakrsnog povezivanja proteina tijekom procesa ekstruzije ulaze reakcije nedisulfidnog tipa.³ Toj skupini pripadaju reakcije:

- intermolekularnog unakrsnog vezanja lizin-alaninske vrste (eng. lysinoalanine type, LAL-type) i lizin-alanin-tioninske vrste (eng. lanthionine type, LAT-type)
- Maillardovi produkti
- izopeptidne veze.

Normalne peptidne veze: Normal peptide bonds:	$P-CH_2-CO-NH-CHR_2-P$
Intermolekularno unakrsno vezivanje Intermolecular cross-linking bonds	
LAL vrsta: LAL type:	$P-CH_2-NH-CHR-P$
LAT vrsta: LAT type:	$P-CH_2-S-CHR-P$
Maillardovi proizvodi: Maillard's products:	$P-CH_2-NH-CH_2-CO-R---P$
Izopeptidne veze: Izopeptide bonds:	$P-CHR_1-CO-NH-CHR_2-P$

Slika 1 – Kemijske veze nedisulfidnog tipa formirane u reakcijama unakrsnog vezanja proteina za vrijeme procesa ekstruzije

Fig. 1 – Chemical bonds of non-disulphide type formed in reactions of cross-linking of proteins during process of extrusion cooking

Intramolekularno unakrsno povezivanje tipa LAL i LAN

Stvaranju unakrsnog povezivanja tipa LAL i LAN pogoduje obrada hrane lužinama i visokim temperaturama. Takav tip povezivanja pojavljuje se u prerađenoj hrani.^{4,5,6,7}

Za bolje razumijevanje njihovog djelovanja važno je poznavanje mehanizma stvaranja, koji se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju hidroksid ion katalizira eliminacijske reakcije serina, cisteina i treonina i potiče stvaranje intermedijera dehidroalanina. U drugom stupnju dehidroalaninski ostatak koji sadrži ugljik-ugljik dvostruku vezu stupa u reakciju s ϵ -amino skupinom lizina i stvara lizinoalanin unakrsnu vezu. Nakon što su susjedna mjesta u proteinu reagirala, nove unakrsne veze se teže stvaraju.

Svaki protein ima ograničen broj mjesta koja mogu sudjelovati u stvaranju ovih veza. Broj tih mjesta ovisi o veličini proteina, sastavu i redoslijedu aminokiselina, konformaciji i još mnogim drugim čimbenicima.

Dva su moguća načina LAL-unakrsnog povezivanja, unutarmolekularno, koje ne dovodi do bitnih promjena u masi proteina i međumolekularno, kod kojeg se masa proteina povećava proporcionalno s brojem stvorenih veza.

Maillardove reakcije

Ovaj tip reakcija također nastaje u namirnici tijekom njenog izlaganja visokim temperaturama i visokom tlaku.⁸ One utječu na različita svojstva gotovog proizvoda kao što su: topljivost, tekstura, boja, aroma i nutritivna vrijednost. Ovisno o vrsti proizvoda, odvijanje toga tipa reakcija može biti poželjno ili nepoželjno.

Izopeptidne veze

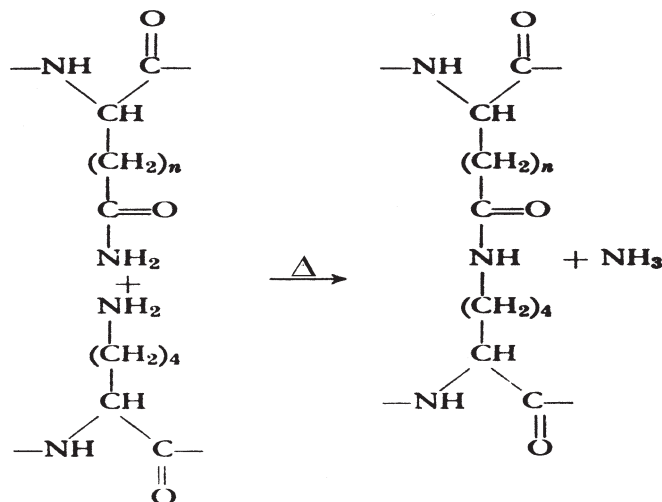
Od svih vrsta nekovalentnih reakcija visoka temperatura najviše pogoduje stvaranju izopeptidnih veza.^{3,9} Pokazalo se da su izopeptidne veze koje sudjeluju u unakrsnom povezivanju aminokiselina i proteina jako stabilne. To je osobito uočljivo kod povišenih temperatura gdje ne dolazi do njihova pucanja i transformiranja.⁴

Kako je lizin aminokiselina koja najlakše tvori spomenute izopeptidne veze,³ provedena su brojna istraživanja o nutritivnoj vrijednosti takvih proteina. Ta su istraživanja pokazala da je lizin iz izopeptidnih veza nedostupan organizmu za iskorištavanje, što ima za posljedicu degradaciju nutritivne vrijednosti proteina.³

Ovisno o vrsti aminokiselina i njihovom stupnju interakcije, razlikujemo nekoliko mehanizama nastanka izopeptidnih veza: esterska, tioesterska, imidna, fosfodieterska i amidna.

Amidna izopeptidna veza može nastati između amino skupine jedne aminokiseline (lizin) i amino skupine druge aminokiseline (asparagin, glutamin). Međutim, amidna izopeptidna veza može također nastati i između amino skupine lizina i karboksilne skupine asparaginske ili glutaminske kiseline. Takvi primjeri nađeni su ne samo u proteinima koji čine ekstrudirani proizvod već i kod proteina, odnosno enzima prisutnih u kvascima.¹⁰

Budući da su izopeptidne veze kao vrsta kovalentnog, unakrsnog povezivanja aminokiselina različite vrste interakcija među aminokiselinama, istraživanja su bila usmjerena na razvoj teorijskog modela putem kojeg je istraženo stvaranje izopeptidne veze amidnog tipa između amino skupine lizina i amino skupine asparagina odnosno glutamina (slika 2).



Slika 2 – Stvaranje izopeptidne veze reakcijom ϵ -amino skupine lizina s aminoskupinom asparagina ($n=1$) ili glutamina ($n=2$)

Fig. 2 – Formation of isopeptide bond by reaction of ϵ -amino group of lysine with amide group of asparagine ($n=1$) or glutamine ($n=2$)

Provedenim istraživanjima željelo se provjeriti da li primijenjeni model, koji je bio temeljen na ekstrudiranom uzorku soje, može poslužiti u interpretaciji strukture i svojstava različitih drugih ekstrudiranih proizvoda, u našem slučaju pšenične krupice.³

Eksperimentalni dio

Topljivost

$$WSI = \frac{m_{\text{supernatanta}}}{m_{\text{suhe tvari uzorka}}} \cdot 100$$

Indeks topljivosti u vodi (WSI-Water solubility index)¹¹ određen je za ekstrudat dobiven pri temperaturama ekstruzije od 120 °C i 170 °C, promjeri čestica oko 600 μ m. Rezultati su dobiveni i izračunati prethodno opisanim postupkom.

Koeficijent WSI zamjetno se povećava s povećanjem temperature. WSI je obrnuto proporcionalan s indeksom vezanja vode (WAI).

Dvopužni ekstruder

Ekstruder je bioreaktor u kojem se pri visokoj temperaturi, kratkom vremenu zadržavanja, visokim tlakovima i jakim silama smicanja obrađuju različite vrste prehrambenih sirovina s različitim udjelom vlage i različitom viskoznošću.¹²

Proces ekstruzije je zapravo postupak HTST (high temperature-short time; visoka temperatura-kratko vrijeme zagrijavanja). Sirovini se tijekom transporta kroz ekstruder dovodi mehanička energija okretanjem puža. Mehanička energija se prevodi u toplinsku energiju, pri čemu dolazi do znatnog povišenja temperature sirovine. U takvim uvjetima polimeri, kao sastojak u sirovinama, podliježu denaturaciji i plastifikaciji.¹³

U proizvodnji hrane najčešće se upotrebljavaju dvopužni ekstruderi s istosmjernom vrtnjom pužnica, u odijeljenim zonama u kojima se samostalno mogu odvijati procesi uz primjenu različitih tlakova i temperatura, time se postiže i veća preradljivost.^{14,15,16}

U našim ispitivanjima rabili smo dvopužni ekstruder. Ekstruzija je provedena pri sljedećim uvjetima ekstruzije: količini dobave suhe tvari (30 kg h⁻¹), maseni udjel vode u ekstruderu (30 % s.t.), brzina vrtnje pužnica (150 o/min) i temperaturi od 120 °C i 170 °C.

Metode

Rad je temeljen na primjeni modelnog sistema pogodnog za praćenje kemijskih promjena tijekom postupka ekstruzije.¹⁷ Pri tome su se primjenjivale moderne metode molekularnog modeliranja temeljene na klasičnoj i kvantnoj mehanici te razlikovna FT-IR spektroskopija.

Rezultati

Model

S ciljem proučavanja nastanka izopeptidnih veza za vrijeme procesa ekstruzije razvijen je model³ koji bi mogao pridonijeti razumijevanju povezanosti sastava, strukture i funkcije izopeptidnih veza na ekstrudirani proizvod. Modelni sustav razvijen je na temelju rezultata FT-IR spektroskopije ekstrudiranog uzorka soje.¹⁷

Kako hranu možemo smatrati kemijski vrlo kompleksnim uzorkom, za interpretaciju dobivenih spektara poslužile su tehnike molekularnog modeliranja temeljene na kvantno mehaničkom *ab initio* HF/6-31G* postupku. Metodama molekularnog modeliranja napravljena je molekula diipeptida te su uspoređeni valni brojevi za amidni tip vibracija prisutnih u modelnim molekulama s razlikovnim FTIR spektrom s ekstrudatima soje.¹⁸

Pri razvoju modelnog sistema odabrane su one aminokiseline koje međusobnim interakcijama stvaraju izopeptidnu vezu, a čine ih lizin, asparagin i glutamin. Razvijeni model uključivao je stvaranje diipeptida s izopeptidnom vezom u kojemu ε-amino skupina lizina reagira s amino skupinom jedne od dikarboksilnih aminokiselina, uz istodobno oslobađanje amonijaka (slika 2).³

Pokazalo se da je amidni tip vibracija istovjetan kao i u uzorcima ekstrudirane soje. Dobiveni razlikovni FT-IR spektar pokazao je neznatnu redukciju pri valnom broju absorbancije od 1654 i 1540 cm⁻¹, što upućuje na stvaranje novih, kovalentnih izopeptidnih veza.¹⁸

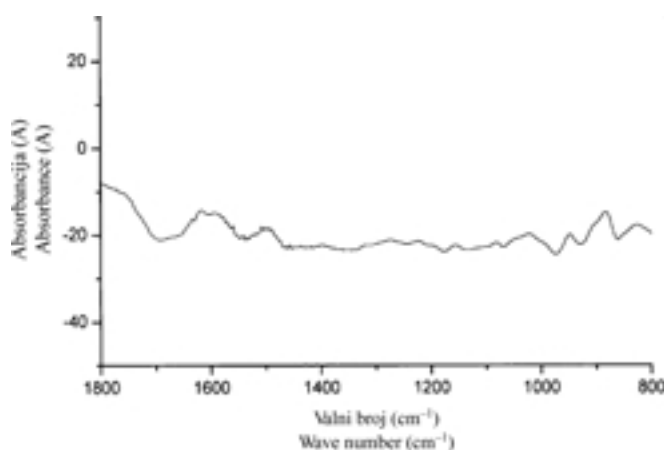
Takav model primijenjen je u ovom radu za istraživanje nastanka izopeptidne veze u uzorcima ekstrudirane pšenične krupice.

FT-IR spektroskopija

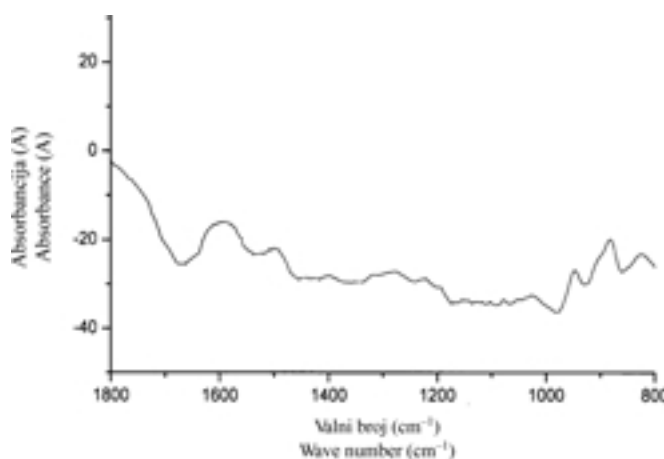
FT-IR spektroskopijom uočavamo konformacijske promjene na proteinima.¹⁹ Utjecaj procesnih veličina (temperatura, tlaka, brzine vrtnje pužnica, udjela vlage i udjela suhe tvari) na stvaranje izopeptidnih veza između aminokiselina

analiziran je uz pomoć Perkin Elmer FT-IR spektrofotometra, tehnikom KBr pastila.

Razlikovna spektroskopija najčešće se primjenjuje za mjerenje razlike dvaju spektara koje dobivamo različitim stajanjima proteinskih reakcija ili promjenama u konformacijama. Rezultati razlikovne spektroskopije dobivaju se oduzimanjem krajnjeg i početnog spektra. Metoda je točna za tvari u kojima ima manje konformacijskih promjena koje uključuju minimum 2–3 % od ukupnih veza. Primjena razlikovne spektroskopije odnosi se na proučavanje absorpcijskog cijepanja veza proteina. Odnosi se na proučavanje razlike između dvaju spektara u dvije različite reakcije proteina ili kao konformacijska proba.²⁰



Slika 3 – IR – spektar ekstrudata pšenične krupice na 120 °C
Fig. 3 – IR-spectra of wheat semolina extrudate at 120 °C



Slika 4 – IR – spektar ekstrudata pšenične krupice na 170 °C
Fig. 4 – IR-spectra of wheat semolina extrudate at 170 °C

Proces ekstruzije proveden je pri konstantnim uvjetima količine dobave suhe tvari (30 kg h⁻¹), količine vode u ekstruderu (30 % suhe tvari) i brzine vrtnje pužnica ekstrudera (150 o/min) pri temperaturama ekstruzije od 120 °C i 170 °C.

Navedene temperature utjecale su na nastajanje izopeptidnih veza u uzorcima ekstrudata pšenične krupice.

Nakon pažljivih analiza utvrđeno je da nastanak izopeptidnih veza odgovara vibracijskim frekvencijama između

1600 i 1650 cm^{-1} . Tako dobiveni spektri uspoređeni su s FT-IR spektrima soje.¹⁷

Analiza uzoraka ekstrudata pšenične krupice razlikovnom FT-IR spektroskopijom potvrdila je pretpostavke o nastajanju izopeptidnih veza. Dobiveni spektar pokazao je malu redukciju pri valnom broju oko 1650 cm^{-1} , iz čega se može zaključiti da se radi o maloj količini nastalih veza. To se moglo i očekivati s obzirom da se analizirane aminokiseline u pšeničnoj krupici pojavljuju također u maloj količini.

Usporedba dobivenih spektara pokazala je razliku u intenzitetu absorpcije i u valnoj duljini kod navedenih uzoraka.

Uzorak dobiven na temperaturi od 120 °C pokazuje slab absorpcijski vršak pri 1681,8 cm^{-1} (–13,2), dok uzorak dobiven na temperaturi od 170 °C pokazuje slab absorpcijski vršak pri 1674,0 cm^{-1} (–24,1).

Tablica 1 – Vrijednosti valnih brojeva i absorpcije

Table 1 – Values of absorbance with corresponding bands position

$T/^\circ\text{C}$	Valni broj/ cm^{-1} Wave number/ cm^{-1}	Absorbancija/A Absorbance/A
120 °C	1681,8	–13,2
170 °C	1674,0	–24,1

Navedeni rezultati upućuju na zaključak da viša temperatura pogoduje nastanku izopeptidne veze, čime topljivost pada.

Zbog viših temperatura u ekstruderu dolazi i do povećanja tlaka, čime dolazi do kemijskih promjena uzorka.² Unutar strukture proteina pojavljuje se vibracija amid I veza. Vibracije dolaze od C=O rastezanja i malog doprinosa N-H vezanja, a javljaju se u rasponu valnih duljina od 1600 do 1700 cm^{-1} . Atom vodika vezan je vodikovom vezom za atom kisika i drugi dio polipeptidnog lanca, što rezultira nestabilnom konformacijom proteina. Dodatnim povećanjem temperatura došlo je do dodatnog povećanja tlaka, što je rezultiralo nastankom novih vodikovih veza koje usporavaju amidnu vibraciju i bilježe pomak prema kraćim valnim brojevima.^{8,19}

Budući da jedinstvenost infracrvenog spektra pruža izniman stupanj specifičnosti kojim nadilazi relativno mali broj drugih instrumentalnih tehnika, IR spektroskopija pokazala se specifičnom metodom pri identifikaciji različitih složenih, heterogenih sustava, kao što je hrana, odnosno prehrambenih proizvoda.

Zaključci

Prethodno razvijeni teorijski model temeljen na kvantno mehaničkim proračunima pokazao je izvanredno slaganje s rezultatima FT-IR spektroskopije na ekstrudiranom uzor-

ku soje¹⁷ i pšenične krupice. Istraživanje je pokazalo kako temperatura ekstruzije utječe na topljivost uzorka. Utvrđeno je da povećanjem temperature dolazi do nastanka izopeptidnih veza koje smanjuju topljivost uzorka.

Također, ovim pristupom željela se utvrditi mogućnost primjene teorijskih kvantnomehaničkih proračuna i razlikovne FT-IR spektroskopije u interpretaciji nastanka izopeptidnih veza i kod drugih uzoraka podvrgnutih postupku ekstruzije.

Razlikovna FT-IR spektroskopija pokazala se izvrsnom instrumentalnom metodom za praćenje kemijskih promjena tijekom postupka ekstruzije.

ZAHVALA

Zahvaljujemo Zakladi Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti na financijskoj pomoći pri realizaciji ovih istraživanja.

Literatura References

1. M. Brnčić, V. Mrkić, D. Ježek, B. Tripalo, *Kem. Ind.* **49**:3 (2000) 101.
2. D. Apichartsrangkoon, D. A. Ledward, A. E. Bell, J. G. Brennan, *Food Chem.* **63**:2 (1998) 215.
3. D. W. Stanley, Protein reactions during extrusion processing, u C. Mercier, P. Linko, J. M. Harper (ur.), *Extrusion cooking*, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, 1989, str. 321–339.
4. Z. H. Mohammed, S. E. Hill, J. R. Mitchell, *J. Food Chem.* **65** (2000) 221.
5. M. Friedman, A review. *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 3.
6. M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1295.
7. M. Friedman, C. E. Levine, A. T. Noma, *J. Food Sci.* **49** (1984) 1282.
8. K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta* **1386** (1998) 353.
9. R. R. Baladrán-Quintana i sur., *J. Food Sci.* **63** (1998) 113.
10. K. C. Park, S. K. Woo, Y. K. Yoo, A. M. Wyndham, R. T. Baker, C. Ha Chung, *Archives of Biochemistry and biophysics* **347** (1997) 78.
11. T. F. Schweizer, Wursch (1979) *J. Sci. Food Agr.* **30** (1997) 613.
12. G. H. Ryu, C. E. Walker, *Starch/Stärke* **47** (1995) 33.
13. W. Wiedmann, E. Storb, *Food Technol. Werner & Pflieger GmbH*, 1988.
14. W. Seibel, K. Seiler, G. Elsner, *Getreide Mehl und Brot.* **38** (1984) 182.
15. R. E. Tribelhorn, J. M. Harper, *Cereal foods worlds* **25** (1980) 154.
16. K. Seiler, *Schuy Gardian* **83** (5) **88–94** (6) (1983) 121.
17. J. M. Aguilera, D. W. Stanley, *Food engineering and Process Applications* **7** (1986) 131.
18. D. Kovaček, A. Ninčević, I. Miljević, *PBN Revija* **1** (2002) 8.
19. L. Smeller, K. Heremans, *Vib. Spectrosc.* **19** (1999) 375.
20. J. L. R Arondo, F. M. Goñi, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **72** (1999) 367.

SUMMARY

Temperature Influence on Chemical Changes During the Extrusion Cooking

D. Kovaček, A. Ninčević, I. Miljević, D. Vikić-Topić, M. Brnčić,
D. Ćurić, B. Tripalo, D. Ježek, D. Karlović, and M. Fegeš*

Extrusion cooking is one of many techniques used to process a variety of foods. Many studies have shown that natural compounds in foodstuff may be reduced by manipulation of extrusion operation conditions in single or twin screw extruders. It is known that combinations of processing parameters such as temperature, pressure, and screw speeds may result in physical and chemical changes in the structure of biopolymers. The consequence of these modifications are changes in the nutritional value, functionality and biological activities of the main food components.

In this research we investigated modifications of protein structure after disruption of protein body by extreme conditions of temperature and pressure in extruder. The disruption of protein body is connected with formation of new kind of covalent bonds (disulfide and nondisulfide type) that result in protein cross-link.

Here, we analysed nondisulfide cross-linking reactions using two approach. The first was based on molecular modeling, while the second one used spectroscopic analytical methods: FTIR with real samples-extrudates obtained by twin co-rotating extruder.

Given results indicate that the higher temperature has more effect on formation of isopeptide bonds.

The results of both applied methods have shown very good agreement, so we concluded that combinations of these methods can be used in analysis of protein macromolecules in complex samples such as food.

This investigation has also shown that FT-IR spectroscopy is an excellent instrumental technique for following changes that occur during extrusion cooking. It is possible to follow little changes on protein molecules in the sense of isopeptide bond formation.

*Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva 6, HR-10 000 Zagreb, Croatia
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Croatia

*Received May 6, 2003
Accepted June 10, 2003*