



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

«Οξειδωτική υποβάθμιση και μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης  
ελαιολάδου»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία  
Της  
ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ ΤΣΑΓΚΑΡΗ

Που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων  
απόκτησης Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Τεχνολογία και Ποιότητα  
Επιτραπέζιας Ελιάς και Ελαιολάδου» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας  
Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Καλαμάτα  
Φεβρουάριος 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

«Οξειδωτική υποβάθμιση και μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης  
ελαιολάδου»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Της

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ ΤΣΑΓΚΑΡΗ

Που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων  
απόκτησης Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Τεχνολογία και Ποιότητα  
Επιτραπέζιας Ελιάς και Ελαιολάδου» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας  
Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Επιβλέπων: ΙΩΑΚΕΙΜ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Καλαμάτα  
Φεβρουάριος 2021



UNIVERSITY OF PELOPONNESE  
SCHOOL OF AGRICULTURE AND FOOD  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

MASTER OF SCIENCE (M.SC.) IN  
TECHNOLOGY AND QUALITY OF TABLE OLIVES AND OLIVE OIL

Master Thesis

«Oxidative degradation and methods for the determination of oxidation of  
olive oil»

By

STAYROULA TSAGKARI

Submitted to the faculty for the partial fulfillment of the obligations to obtain a  
Postgraduate Diploma in "Technology and Quality of Table Olive and Olive Oil" of the  
Department of Food Science and Technology of the University of Peloponnese

Supervisor :IOAKEIM SPILIOPOULOS Associate Professor

Kalamata  
February 2021

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Οξειδωτική υποβάθμιση και μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης ελαιολάδου** » που παρουσιάστηκε από την **Σταυρούλα Τσαγκάρη** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis title “**Oxidative degradation and methods for determination of oxidation of olive oil** ” presented by Stavroula Tsagkari and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 1<sup>st</sup> Commission Member):**

Ιωακείμ Σπηλιόπουλος  
Ioakeim Spiliopoulos

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):**

Ιωάννης Καπόλος  
Ioannis Karolos

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):**

Γεώργιος Ζακυνθινός  
Georgios Zakynthinos

Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author there of (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication there of by University of Peloponnese will not infringe any third party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου  
(Surname and first name of the candidate):**

Σταυρούλα Τσαγκάρη  
Stavroula Tsagkari

Πνευματική ιδιοκτησία © 2021 Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου  
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2021 University of Peloponnese  
All rights reserved

**Copyright ©Σταυρούλα Τσαγκάρη, 2021**

**Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος. All rights reserved.**

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τη συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Γεωπονίας και Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου.

*Αφιέρωση*

Αφιερώνω την διατριβή αυτή στη μνήμη του αγαπημένου μου πατέρα

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θέλω να ευχαριστήσω πολύ τον καθηγητή μου κ. Ιωακείμ Σπηλιόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του στη συγγραφή αυτής της διατριβής .

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον σύζυγο μου Δημήτριο Τσιλιάνο και τα παιδιά μου Γιώργο και Μαρικαίτη για την βοήθεια που μου προσέφεραν στη συγγραφή, αλλά και την χαρά που μου προσφέρουν καθημερινά στη ζωή μου, με την ύπαρξή τους.





## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT .....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	10
1.1 Σαπωνοποιήσιμα συστατικά ελαιολάδου.....	11
1.1.1 Φωσφολιπίδια .....	11
1.1.2 Τριγλυκερίδια .....	11
1.2 .Μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά ελαιολάδου .....	13
1.2.1 Υδρογονάνθρακες .....	13
1.2.2. Λιπαρά Οξέα .....	14
1.2.3 Τοκοφερόλες .....	16
1.2.4 Στερόλες .....	17
1.2.5 Τριτερπενικά Οξέα .....	19
1.3 Χρωστικές .....	20
1.4 Φαινολικές Ενώσεις .....	21
1.5 Πτητικές και Αρωματικές Ενώσεις .....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ .....	24
2.1 Αυτοοξειδωση Λιπιδίων .....	25
2.2 Φωτοοξειδωση .....	30
2.3 Οξειδωση που καταλύεται από Σίδηρο .....	34
2.4 Ενζυμική Οξειδωση .....	39
2.5 Θερμοοξειδωση –Τηγάνισμα .....	42

2.6 Ολιγομερισμός .....	48
2.6.1.Αποικοδόμηση των συστατικών του λαδιού .....	49
2.7.Αντιοξειδωτικά .....	50
2.8 Κινητική και προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων .....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ .....</b>	<b>58</b>
3.1 Μέθοδοι μέτρησης οξείδωσης.....	58
3.1.1 Κατανάλωση Οξυγόνου .....	58
3.1.2 Συζυγή Διένια και Τριένια .....	58
3.1.3 Αριθμός Υπεροξειδίου .....	59
3.1.4 Φασματοφωτομετρική μέθοδος Θειοκυανικού Σιδήρου .....	61
3.2 Προϊόντα Δευτερεύουσας Αποσύνθεσης .....	63
3.2.1 Δοκιμή Θειοβαρβιτουρικού Οξέος .....	63
3.2.2 Μέθοδος Kreis (δοκιμή) .....	64
3.2.3 Τιμή Ανισιδίνης (AV) .....	65
3.2.4 Ανάλυση Πτητικών με αέρια χρωματογραφία .....	66
3.3 Δοκιμασίες Επιταχυνόμενης Οξείδωσης και Αποθήκευσης .....	67
3.3.1 Δοκιμή Αντοχής στην Οξειδωμένη Σταθερότητα .....	67
3.3.2 Μέθοδος Ενεργού Οξυγόνου .....	67
3.3.3 Δοκιμές Απορρόφησης Οξυγόνου .....	67
3.3.4 Δοκιμές Αγωγιμότητας .....	67
3.3.5 Δοκιμές Ταχείας Αποθήκευσης .....	68
3.3.6 Δοκιμές Αποθήκευσης Περιβάλλοντος .....	69
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- Συζήτηση και Συμπεράσματα .....</b>	<b>70</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>74</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξείδωση είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα ποιοτικής υποβάθμισης του ελαιολάδου. Η οξείδωση μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως είναι η έκθεση του ελαιολάδου στο φως, στη παρουσία μετάλλων, στην αυξημένη θερμοκρασία αποθήκευσης, αλλά και σε ενδογενής παράγοντες όπως η δράση των ενζύμων, οι οποίοι αφορούν, την χημική σύσταση του ελαιολάδου (αυτοοξείδωση).

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετά την διαδικασία -μηχανισμούς με την οποία πραγματοποιείται η οξείδωση. Αναλύει τους παράγοντες οι οποίοι επιταχύνουν την οξείδωση, αλλά και αυτούς οι οποίοι την επιβραδύνουν.

Η οξείδωση του ελαιολάδου (οξείδωση λιπιδίων) συνεπάγεται τον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων, ως πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης, οι οποίες ακολουθούνται από περαιτέρω αντιδράσεις, δίνοντας δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης. Εξετάζονται οι κύριες τεχνικές για την ανάλυση τόσο των πρωτογενών προϊόντων όσο και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Τέλος προτείνονται κάποια προληπτικά μέτρα προστασίας του ελαιολάδου από την οξείδωση.

**Λέξεις Κλειδιά: Φωτοοξείδωση, Ενζυμική Οξείδωση, Αυτοοξείδωση.**

## **ABSTRACT**

Oxidation is one of the most important problems of quality degradation of olive oil. Oxidation can be due to external factors, such as exposure of olive oil to light, the presence of metals, increased storage temperature, but also to endogenous factors such as the action of enzymes which concern the chemical composition of olive oil (autooxidation).

This dissertation studies the process-mechanisms by which oxidation takes place. It analyzes the factors that accelerate oxidation, but also those that slow it down.

The oxidation of olive oil (lipid oxidation) involves the formation of hydroperoxides, as primary oxidation products, which are followed by further reactions giving secondary oxidation products. The main techniques for the analysis of both primary and secondary oxidation products are examined. Finally, some preventive measures are proposed to protect olive oil from oxidation.

**Keywords :Photooxidation,Enzymatic Oxidation,Autooxidation.**

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

*Πίνακας 1.1* Εκατοστιαία περιεκτικότητα ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα.

Πίνακας1.2 Κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Πίνακας1.3 Ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 2.1 Οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 2.2 Περιεκτικότητα σε λάδι τηγανιτών προϊόντων.

Πίνακας 3.1 Κατηγορίες ελαιολάδου σύμφωνα με K<sub>232</sub>, K<sub>268</sub> και ΔΚ.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Συντακτική Δομή Φωσφολιπιδίων .

Σχήμα 1.2 Συντακτική Δομή Τριγλυκεριδίου.

Σχήμα 1.3 Συντακτική Δομή απλού και μικτού Τριγλυκεριδίου.

Σχήμα 1.4 Συντακτική Δομή Σκουαλένιου.

Σχήμα 1.5 Συντακτική Δομή Λινολενικού και Λνελαϊκού οξέος.

Σχήμα 1.6 Συντακτική Δομή Τοκοφερολών.

Σχήμα 1.7 Συντακτική Δομή Στερολών.

Σχήμα 1.8 Συντακτική Δομή Ελεανολικού οξέος .

Σχήμα 1.9 Συντακτική Δομή α,b Καροτένιο, α ,β Χλωροφύλλης.

Σχήμα 1.10 Συντακτική Δομή Φαινολών.

Σχήμα2.1 Μηχανισμός οξείδωσης Ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Σχήμα2.2 Αλλαγή Κρεσμένων και Ακόρεστων λιπαρών οξέων .

Σχήμα2.3 Διαδικασία σχηματισμού Υδροϋπεροξειδίων.

Σχήμα2.4 Μηχανισμός καταστροφής της Χλωροφύλλης .

Σχήμα2.5 Επίδραση σκότους, άμεσου ηλιακού φωτός και διάχυτου φωτός στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Σχήμα2.6 Έναρξη της οξείδωσης των Λιπιδίων μέσω σιδήρου.

Σχήμα 2.7 Ενζυμική οξείδωση Ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Σχήμα 2.8 Χρωματογράμματα πτητικών ενώσεων άθικτων και κομμένων καρπών ελιάς.

Σχήμα 2.9 Στάδια Οξείδωσης κατά την θέρμανση –τηγάνισμα του ελαιολάδου.

Σχήμα 2.10 Αποικοδόμηση Λιπαρών οξέων και σχηματισμός προϊόντων κατά το τηγάνισμα.

Σχήμα 2.11 Τα στάδια Οξείδωσης .

Σχήμα 2.12 Σταθερότητα των Υδροϋπεροξειδίων σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Σχήμα 2.13 Θεωρητική ανάπτυξη πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης σε συνάρτηση του χρόνου.

Σχήμα 2.14 Σχηματισμός πιθανών δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης από την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων .

Σχήμα 3.1 Αντίδραση Θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και Μηλονικής αλδεΐδης (MDA).

Σχήμα 3.2 Αντίδραση λιπαρής ουσίας με Φλωρογλουκινόλη.

Σχήμα 3.3 Προτεινόμενη αντίδραση ρ-Ανισιδίνης και Μηλονικής αλδεΐδης.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ελαιόλαδο είναι το έλαιο που παράγεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς (**Olea europaea**) (Aragicio, 2002) και το μοναδικό λάδι που εκχυλίζεται με εντελώς φυσικό τρόπο, χωρίς κανένα μέσο εκχυλισμού, παρά μόνο με μηχανική έκθλιψη, μάλαξη και πίεση ή φυγοκέντρωση της ελαιομάζας.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εξετάζεται η χημική δραστηριότητα του ελαιολάδου και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό αρχίζει να οξειδώνεται, ο τρόπος με τον οποίο το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο υποβαθμίζεται, καθώς και οι μέθοδοι με τις οποίες προσδιορίζεται αυτή η οξείδωση.

Τι είναι όμως η οξείδωση; Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γραφτεί πολλές αναλυτικές κριτικές σχετικά με τον μηχανισμό της οξείδωσης των λιπιδίων. Οξειδώνεται το λάδι όταν έρθει σε επαφή με το οξυγόνο. Και αυτό γιατί το οξυγόνο συμμετέχει σε αντιδράσεις οι οποίες στη συνέχεια δημιουργούν αλυσιδωτά προϊόντα οξείδωσης, τα οποία επιδρούν αρνητικά τόσο στη γεύση και το άρωμα του ελαιολάδου όσο και στις χημικές του ιδιότητες. Έτσι όταν το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με ακόρεστα λιπίδια σχηματίζονται λιποειδή υδροϋπεροξειδία και έχουμε την έναρξη (initiation) της οξείδωσης του ελαιολάδου (Frankel, 2005).

Τα τελευταία χρόνια διερευνάται όλο και περισσότερο η πιθανή σχέση μεταξύ της οξείδωσης των λιπιδίων και της γήρανσης, του καρκίνου, καθώς και άλλων σημαντικών ασθενειών. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να βρεθούν τρόποι οι οποίοι να διασφαλίζουν το ελαιόλαδο, από τις επικίνδυνες για την υγεία, παραγόμενες χημικές ενώσεις λόγω οξείδωσης (Dobarganes et al., 2002).

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι αφενός η διερεύνηση των παραγόντων που επιδρούν στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου, αφετέρου η παρουσίαση των μεθόδων προσδιορισμού της οξείδωσης, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο αυτή βρίσκεται.

Αντικειμενικός στόχος της μελέτης αυτής, είναι η προστασία του ελαιολάδου από τους παράγοντες που δημιουργούν οξείδωση, ώστε η διατροφική αξία του να είναι η βέλτιστη.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DHA Δεκοσαεξαενοϊκό οξύ

ΔΣΕ Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου

FFA Ελεύθερα λιπαρά οξέα

HPLC Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

LC-MS Φασματομετρία μάζας - υγρή χρωματογραφία

LH Ακόρεστα λιπίδια

Ln Λινολενικό οξύ

LOOH Υπεροξειδίο των λιπιδίων

MDA Μηλονική αλδεύδη

NMR Φασματοσκοπία Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

PE Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη

PG Γαλλικός προπυλεστερας

PUFA Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

PV Αριθμός Υπεροξειδίων

ROOH Υδροϋπεροξειδίο

SFA Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα

TBA Θειοβαρβιτουρικό οξύ

TBARS Χημικές ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό

TLC Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

UFA Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Το παρθένο ελαιόλαδο, είναι ένα από τα λίγα έλαια που καταναλώνονται χωρίς χημική επεξεργασία, έχει υψηλή αντοχή στην οξειδωτική φθορά, κυρίως λόγω δύο παραμέτρων. Πρώτον, η σύνθεση λιπαρών οξέων χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία μονοακόρεστων λιπαρών οξέων προς πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και δεύτερον περιέχει μια ομάδα μικρών ενώσεων ισχυρώς αντιοξειδωτικής δράσης μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν οι πολυφαινόλες (Dobarganes and Velasco, 2002).

Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις απομακρύνονται ή μειώνονται δραστικά κατά την διαδικασία δύλισης και κατά συνέπεια είναι σε πολύ χαμηλότερες ποσότητες σε βρώσιμα εξευγενισμένα έλαια απ' ότι στα παρθένα έλαια (Dobarganes et al., 2002).

Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη κι αν το παρθένο ελαιόλαδο έχει γενικά υψηλή αντίσταση στην οξείδωση, λόγω της σύστασής του (τοκοφερόλες, φαινόλες, σχέση μονοακόρεστων προς πολυακόρεστα λιπαρά οξέα) διάφοροι άλλοι λόγοι (φως, μέταλλα, θερμοκρασία κ.λ.π) θα συμβάλλουν στην υψηλή μεταβλητότητα της οξειδωτικής σταθερότητας του παρθένου ελαιολάδου (Velasco and Dobarganes, 2002).

Παρά την πολυπλοκότητα της διαδικασίας οξείδωσης, οι κύριες αντιδράσεις και οι μεταβλητές που εμπλέκονται στην αυτοοξείδωση, φωτοοξείδωση και την ενζυμική οξείδωση είναι πολύ γνωστές και τεκμηριωμένες (Morales and Przybylski, 2013).

### 1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

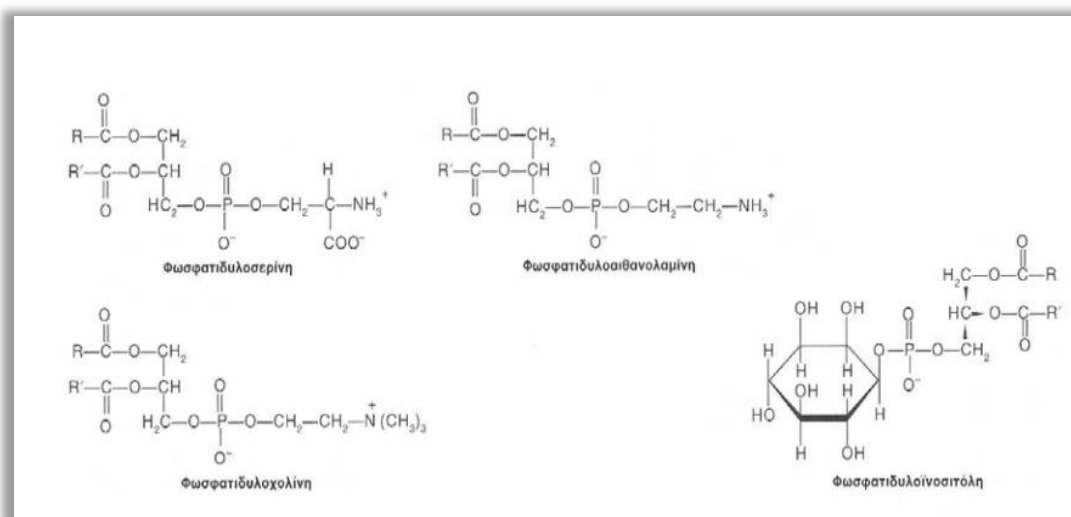
Τα συστατικά του ελαιολάδου διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Στο σαπωνοποιήσιμο κλάσμα, το οποίο περιλαμβάνει τις ακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιπίδια και αποτελούν το 98-99% των συστατικών του ελαιολάδου. Η δεύτερη κατηγορία, η οποία αποτελεί μόλις το 1-2% των συστατικών του ελαιολάδου είναι το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα και εδώ ανήκουν τα λιπαρά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, οι αλειφατικές αλκοόλες, οι στερόλες, οι φαινόλες. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά πολύ μικρότερο, τα συστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό ρόλο (Boskou et al., 2006).

## 1.1 ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

### 1.1.1 ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ

Φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη αναφέρθηκαν ότι είναι τα κύρια φωσφολιπίδια που υπάρχουν στην ελιά (Alter and Gutfinger, 1982). Το επίπεδο των φωσφολιπιδίων μπορεί να είναι σημαντικό επειδή αυτές οι ενώσεις έχουν αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τους Rokomy and Korczak (2001), αυτά τα λιπίδια μπορεί να δράσουν ως καθαριστές των μετάλλων ή να βοηθήσουν την δράση των αντιοξειδωτικών. Σε υψηλά επίπεδα ωστόσο, τα φωσφολιπίδια μπορεί να προκαλέσουν αφρισμό ή να χρωματίσουν σκούρο το ελαιόλαδο κατά το τηγάνισμα.

Κατά τον Κυριτσάκη (2007), η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 35 έως 45 mg/Kg και αυτή η ποσότητα προέρχεται κυρίως από τον πυρήνα του καρπού της ελιάς. Το ελαϊκό είναι το κύριο λιπαρό οξύ το οποίο συνθέτει το μόριο των φωσφολιπιδίων.



Σχήμα 1.1 Συντακτική Δομή Φωσφολιπιδίων (Κυριτσάκης, 2007).

### 1.1.2 ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ

Το τριγλυκερίδιο είναι το αποτέλεσμα της ένωσης ενός μορίου γλυκερόλης με τρία λιπαρά οξέα (Ramirez-Tortosa et al., 2006).

Το τριγλυκερίδιο μπορεί να αποτελείται από το ίδιο λιπαρό οξύ οπότε ονομάζεται απλό τριγλυκερίδιο ή από διαφορετικά λιπαρά οξέα οπότε ονομάζεται μικτό

τριγλυκερίδιο. Τα μονο- και δι- γλυκερίδια είναι προϊόντα της λιπόλυσης και της βιοσύνθεσης των τριγλυκεριδίων (Σπηλιόπουλος, 2015).

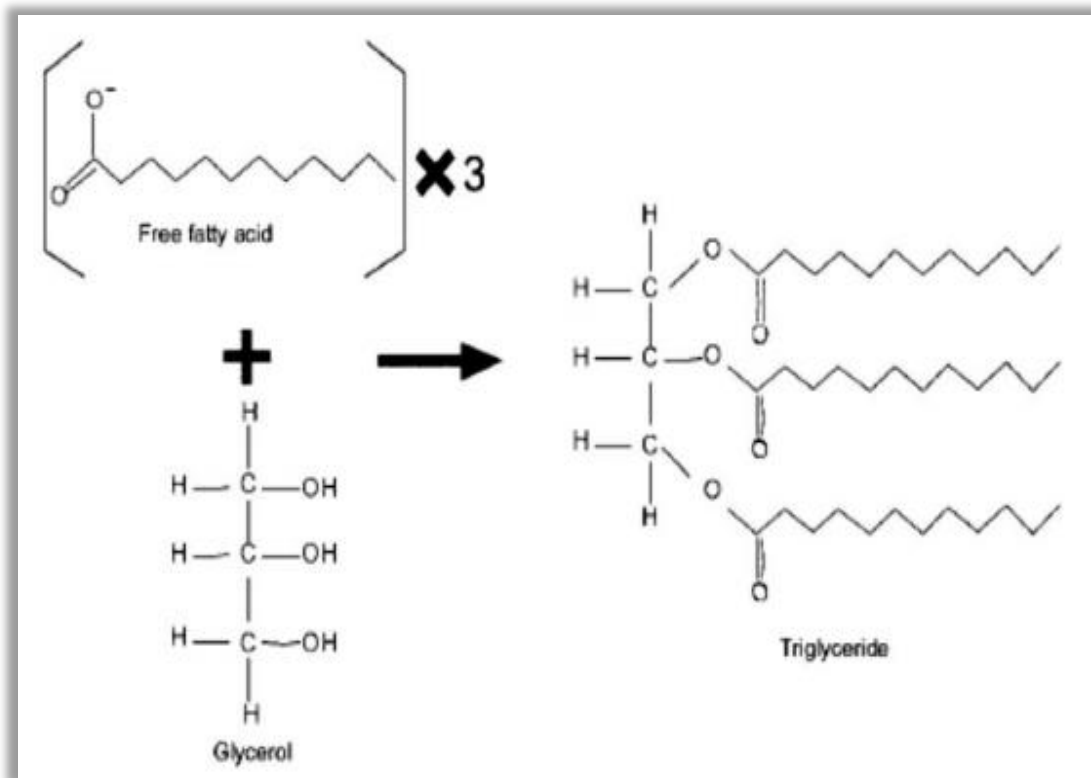
Οι τριακυλογλυκερόλες συμβολίζονται ως TAG και υπάρχουν τρεις κατηγορίες:

Απλό TAG με ένα λιπαρό οξύ (LLL,PPP )

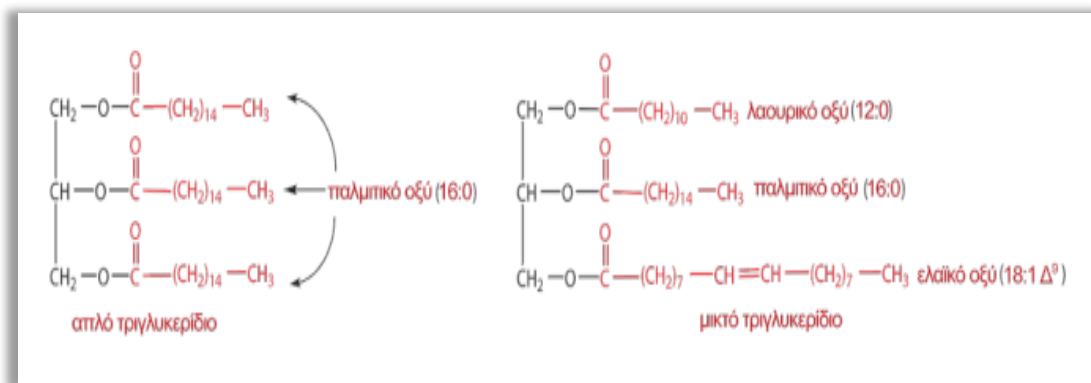
Μικτό TAG με δύο λιπαρά οξέα (PPL,P LL)

Μικτό TAG με τρία λιπαρά οξέα (OLLn, PLLn, P OLn,PPLn)

Όπου P παλμιτικό οξύ , O ελαϊκό οξύ , S στεατικό οξύ, L λινελαϊκό οξύ , Ln λινολενικό οξύ



**Σχήμα 1.2** Συντακτική δομή τριγλυκεριδίου (Ramirez-Tortozza et al., 2006).



**Σχήμα 1.3** Συντακτική Δομή απλού και μικτού τριγλυκεριδίου (Σπηλιόπουλος, 2015).

Οι τριακυλογλυκερόλες βρέθηκαν σε σημαντικές αναλογίες στο ελαιόλαδο και είναι OOO(40-59%), POO(12-20%), OOL(12,5-20%), POL(5,5-7%), SOO(3-7%) (Boskou, 1996).

Η παρουσία μονο-και δι-γλυκεριδίων στο ελαιόλαδο οφείλεται σε ελλιπή βιοσύνθεση τριακυλογλυκεριδίων ή υδρολυτικών αντιδράσεων. Στο παρθένο ελαιόλαδο, η συγκέντρωση διακυλογλυκερολών, κυμαίνεται από 1 έως 2,8% (Frega et al., 1999).

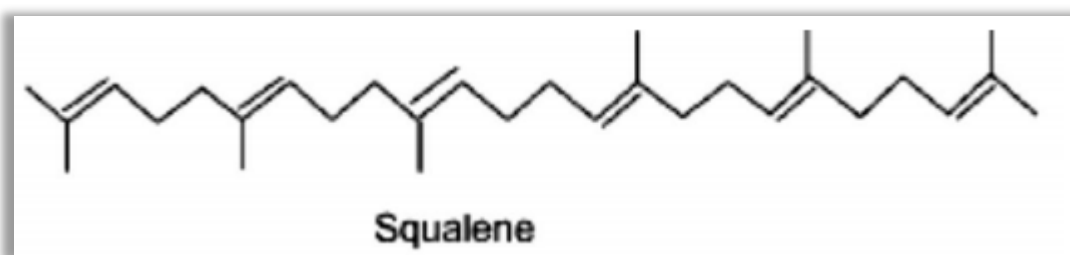
Οι μονοακυλογλυκερόλες υπάρχουν σε πολύ μικρότερες ποσότητες (λιγότερο από 0.25%), ενώ τα 1-μονογλυκερίδια είναι σημαντικά υψηλότερα από τα 2-μονογλυκερίδια. Η αναλογία τους εξαρτάται από την οξύτητα του λαδιού (Paganuzzi, 1999).

Οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν την κατανομή των ακυλογλυκερολών. Οι γλυκερόλες που υπάρχουν στο φρέσκο έλαιο, τείνουν να ισομερίζονται προς τις 1,3 διακυλογλυκερόλες. Αυτή η αναδιάταξη παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ηλικία του λαδιού και τις συνθήκες αποθήκευσης. Η αναλογία 1,3/1,2-DG θεωρείται χρήσιμο κριτήριο για την παρακολούθηση της ποιότητας (Perez-Camino et al., 2001).

## 1.2 ΜΗ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

### 1.2.1.ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ

Οι κύριοι υδρογονάνθρακες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι δύο, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Η συντακτική δομή του σκουαλένιου φαίνεται στο Σχήμα 1.4



**Σχήμα 1.4** Συντακτική Δομή σκουαλένιου (Ramirez-Tortosa et al., 2006).

Είναι από τα συστατικά του ελαιολάδου που έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου και ιδιαίτερα στην πρόληψη ορισμένων μορφών καρκίνου. Ανήκει στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου και αντιστοιχεί σε 90% του κλάσματος των υδρογονανθράκων. Η συγκέντρωση του σκουαλένιου κυμαίνεται από 200-7500 mg/Kg ελαιολάδου και έχουν αναφερθεί και υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων, όπως 12000 mg/Kg ελαιολάδου. Η περιεκτικότητα σε σκουαλένιο εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, την τεχνολογία εκχύλισης του ελαιολάδου και μειώνεται δραματικά κατά την διαδικασία εξευγενισμού του ελαιολάδου (Boskou, 2007).

### 1.2.2 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς και κατά δεύτερο λόγο από τις κλιματολογικές συνθήκες, το υψόμετρο, και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Boskou et al., 2007).

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό, το παλμιτελαϊκό, το ελαϊκό, το στεατικό, το λινελαϊκό και το λινολενικό.

Η εκατοστιαία περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) δίνεται στον πίνακα 1.1

**Πίνακας 1.1** Εκατοστιαία περιεκτικότητας ελαιόλαδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίζεται με αέρια χρωματογραφία. (%m/m μεθυλεστέρες) (IOC 2013c).

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα %
Μυριστικό (C14:0)	<0,03
Παλμιτικό (C16:0)	7,5-20
Παλμιτελαϊκό (C16:1)	0,03-3,5
Δεκαεπτανικό ( C17:0)	<0,30
Δεκαεπτενικό ( C17:1)	<0,30
Στεατικό ( C18:0)	0,05-5,0
Ελαϊκό C(18:1)	55-83
Λινελαϊκό ( C18:2)	3,5-21
Λινολενικό (C18: 3)	<1
Αραχιδικό (C20:0)	<0,6
Εικοσενικό (C20:1)	<0,4
Βεχενικό (C22:0)	<0,2
Λιγνοκηρικό (C24:0)	<0,2

Κάποια από αυτά είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα και αυτό σημαίνει ότι τα άτομα άνθρακα συνδέονται με απλούς δεσμούς, ενώ κάποια άλλα φέρουν στην αλυσίδα τους διπλούς δεσμούς και ονομάζονται ακόρεστα λιπαρά οξέα (Σπηλιόπουλος, 2015).

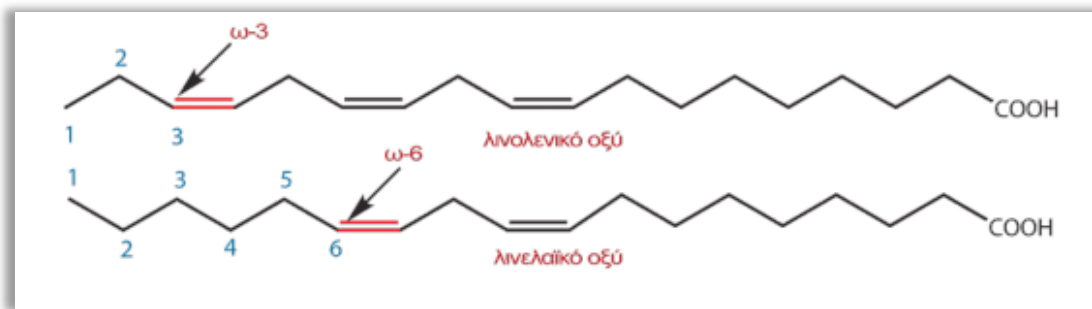
**Πίνακας 1.2- Κορεσμένα λιπαρά οξέα (Σπηλιόπουλος, 2015)**

Όνομα	Κωδικοποίηση (αριθμός C:αριθμός διπλών δεσμών)	Συντακτικός τύπος	Σημείο Τήξεως(°C)
Λαουρικό οξύ	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44
Μυριστικό οξύ	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	58
Παλμιτικό οξύ	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63
Στεατικό οξύ	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69
Αραχιδικό οξύ	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	77

**Πίνακας 1.3 Ακόρεστα λιπαρά οξέα (Σπηλιόπουλος, 2015)**

Όνομα	Κωδικοποίηση (αριθμός C : αριθμός διπλών δεσμών )	Συντακτικός τύπος	Σημείο Τήξεως (°C)
Παλμιτολικό οξύ	16:1 Δ <sup>9</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	1
Ελαιικό οξύ	18:1 Δ <sup>9</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13
Λινελαϊκό οξύ	18:2 Δ <sup>9,12</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	-5
Λινολενικό οξύ	18:3 Δ <sup>9,12,15</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-11
Αραχιδονικό οξύ	20:4 Δ <sup>5,8,11,14</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_3)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-49

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με έναν διπλό δεσμό ονομάζονται μονοακόρεστα, ενώ όσα έχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς ονομάζονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Μια άλλη μορφή έκφρασης της θέσης του διπλού δεσμού είναι η χρήση του όρου -ω-. Έτσι πιο κάτω παρουσιάζονται οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων οξέων του ελαιολάδου (Σπηλιόπουλος, 2015) .



**Σχήμα 1.5** Συντακτική Δομή λινολενικού και λινελαϊκού οξέος (Σπηλιόπουλος, 2015)

Το ΙΟΟ ορίζει όρια για trans λιπαρά οξέα σε κάθε εμπορική κατηγορία. Για βρώσιμο παρθένο ελαιόλαδο κατηγοριοποιεί τα επίπεδα για C18:1t και για άθροισμα C18:2t και C18:3t. Τα ισομερή είναι εξαιρετικά χαμηλά <0,05% σε κάθε περίπτωση. Το ελαιόλαδο έχει υψηλή συγκέντρωση ελαϊκού οξέος και χαμηλή συγκέντρωση παλμιτικού (<2%) και στεατικού οξέος στην θέση-2-της τριακυλογλυκερόλης.

### 1.2.3 ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ

Έρευνα έδειξε σχετικά με την εμφάνιση και τα επίπεδα τοκοφερολών στα παρθένα ελαιόλαδα, ότι από τις οκτώ βιταμίνες E, η α-τοκοφερόλη αποτελεί το 90% της συνολικής περιεκτικότητας σε τοκοφερόλη. Η α-τοκοφερόλη βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή. Τα επίπεδα που αναφέρονται υπέδειξαν ένα ευρύ φάσμα χιλιοστογραμμάρων α-τοκοφερόλης ανά κιλό ελαιολάδου, που εξαρτάται από την καλλιέργεια και τεχνολογικούς παράγοντες. Τα επίπεδα που βρέθηκαν σήμερα είναι πολύ υψηλότερα από την μέση τιμή 100 mg/Kg που αποδόθηκαν στο ελαιόλαδο στο παρελθόν (Guston et al., 1994, Belitz et al., 2004).

Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό λαμβάνοντας υπόψη τις in vivo αντιοξειδωτικές ιδιότητες της α-τοκοφερόλης (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996).

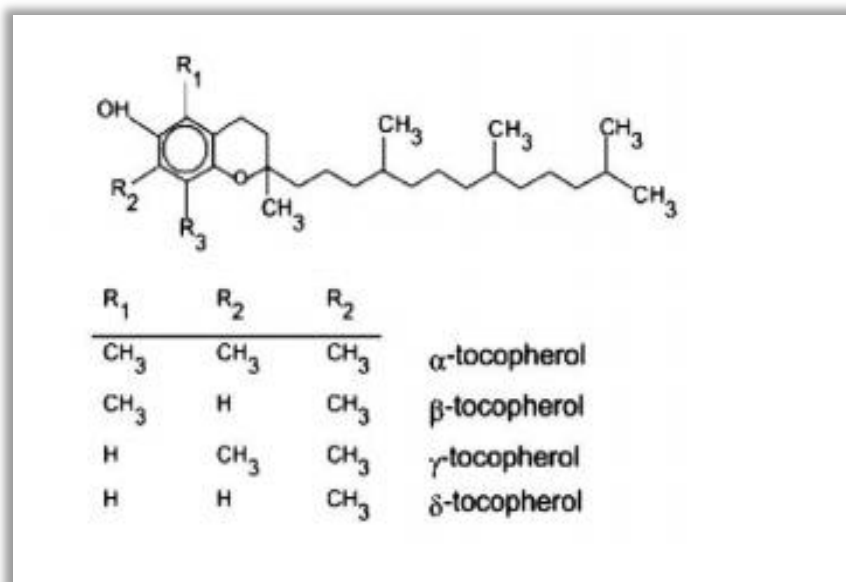
Τα στοιχεία για τα ιταλικά και ισπανικά λάδια δείχνουν ένα ευρύ εύρος για επίπεδα τοκοφερόλης. Σε σύγκριση με αυτά, τα ελληνικά λάδια έχουν υψηλότερα επίπεδα α-τοκοφερόλης π.χ 127-370 mg/Kg για το 1994-95, 98-333 mg/Kg για το 1995-96, και 100-365 mg/Kg για τις περιόδους καλλιέργειας 1996-1997 (Ψωμιάδου κ.α., 2000).

Οι τοκοφερόλες αύξησαν την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου κατά την διάρκεια αποθήκευσης με φως και όταν υπήρχε χλωροφύλλη (Jung and Min, 1991).



Φαίνεται ότι η συγκέντρωση τοκοφερόλης τείνει να μειωθεί στα ώριμα φρούτα. Απώλεια τοκοφερολών συμβαίνει συνήθως σε επεμβάσεις εξευγενισμού ή υδρογόνωσης μειονεκτικών ελαιολάδων (Andrikoroylos et al., 1989).

Η Συντακτική Δομή των τοκοφερολών α,β, γ, δ, φαίνεται στο σχήμα 1.6



Σχήμα 1.6 Συντακτική Δομή τοκοφερολών ( Ramirez-Tortosa et al., 2006).

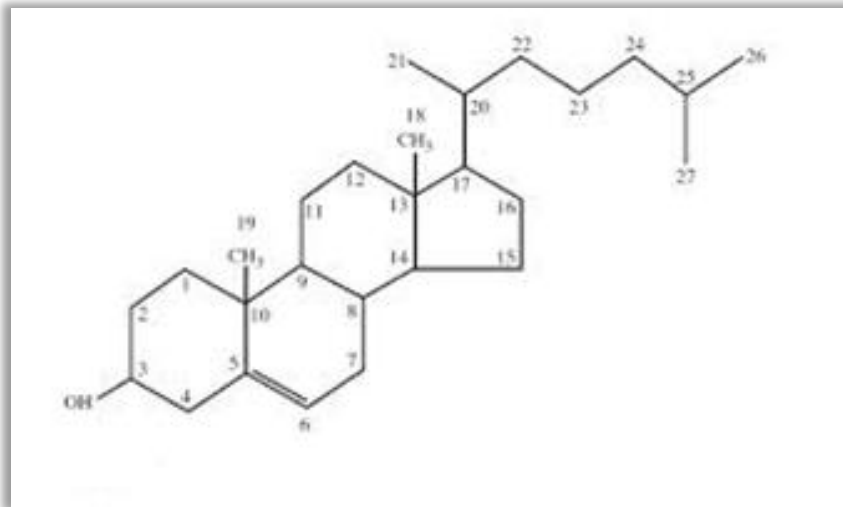
#### 1.2.4 ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι στερόλες είναι σημαντικά λιπίδια που σχετίζονται με την ποιότητα του λαδιού και χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο γνησιότητάς του. Τέσσερις κατηγορίες στερολών εμφανίζονται στο ελαιόλαδο.

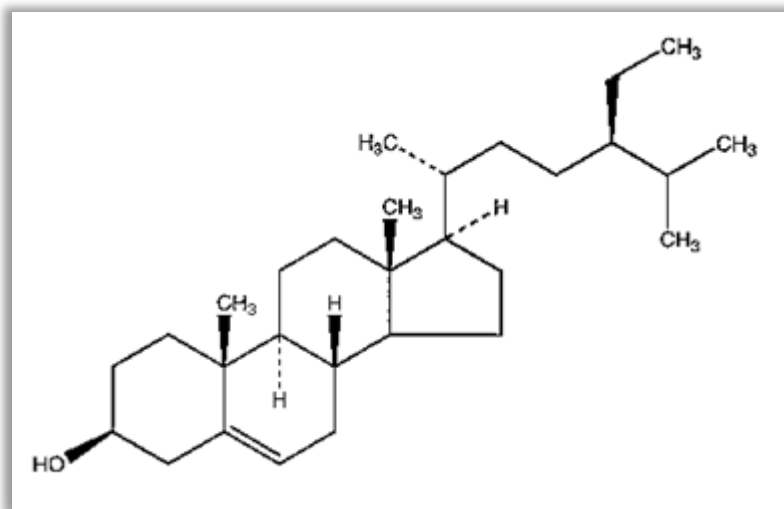
- A. Κοινές στερόλες (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη)
- B. Τριτερπενικές αλκοόλες (4,4-διμεθυλοστερόλες)
- Γ. 4<sup>α</sup>-μεθυλοστερόλες
- Δ. Τριτερπενικές διαλκοόλες (ερυθροδιόλη, ουβαόλη)

Το ελαιόλαδο περιέχει κοινές στερόλες, κυρίως σε ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή (Grob et al., 1990). Το κύριο συστατικό αυτού του κλάσματος στερολών είναι

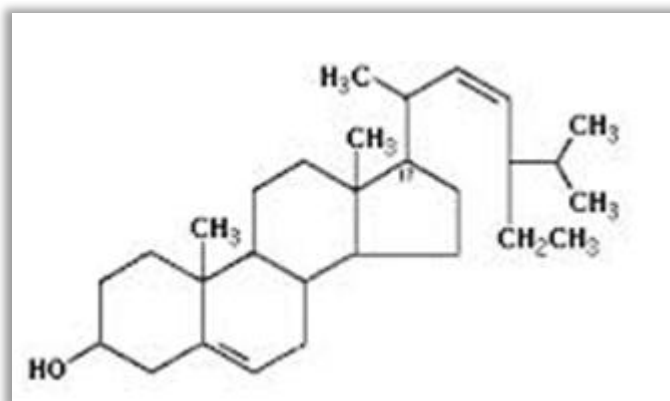
η β-σιτοστερόλη, η Δ5-αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη ( Boskou and Morton, 1975, Kornfeldt, 1981). Άλλες στερόλες σε μικρότερες ποσότητες ή σε ίχνη είναι: σιγμαστερόλη, χοληστερόλη, σιτοστανόλη, 2,4-μεθυλενο-χοληστερόλη (Itoh et al.,1980).



α



β



γ

Σχήμα 1.7 Συντακτική Δομή : α) χοληστερόλη, β) β-σιτοστερόλη, γ) σιγμαστερόλη

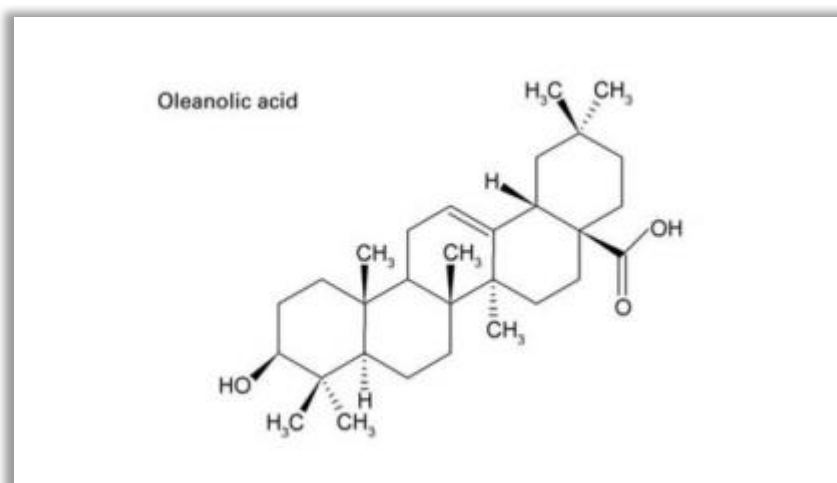
Η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλη παρθένων ελαιολάδων κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 1000 mg/Kg η οποία είναι το κατώτερο όριο που έχει καθοριστεί από την Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Κανονισμός ΕΚ 2568, 1991) και 2000 mg/Kg (Morchio et al., 1987, Aparicio and Luna, 2002). Τα λαμπάντε ελαιόλαδα, περιέχουν υψηλότερες ποσότητες ολικών στερολών (Morchio et al., 1987).

Η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλη των εκχυλισμένων με διαλύτη ελαιολάδων είναι έως και τρεις φορές υψηλότερη από αυτή των παρθένων ελαιολάδων (Morchio et al., 1987).

Μελέτες για την σύνθεση στερολών ελαιολάδου δείχνουν, ότι η β-σιτεστερόλη αποτελεί το 75-90% του συνολικού κλάσματος στερόλης, ενώ η Δ5-βενβεστερόλη κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 5-20% (Itoh et al., 1981, Calaraj et al., 1993). Ποσοστά Δ5-βενβεστερόλης έως 36% έχουν αναφερθεί για ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα (Boskou et al., 2006).

### 1.2.5 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Το πιο ενδιαφέρον τριτερπενικό οξύ το οποίο έχει άμεση σχέση με την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου είναι το ελεανολικό οξύ. Το ελεανολικό οξύ (oleanolic acid) ανήκει στη σειρά της α-αμυρίνης και βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φύλλα από ότι στον ελαιόκαρπο (Κυριτσάκης, 2007).



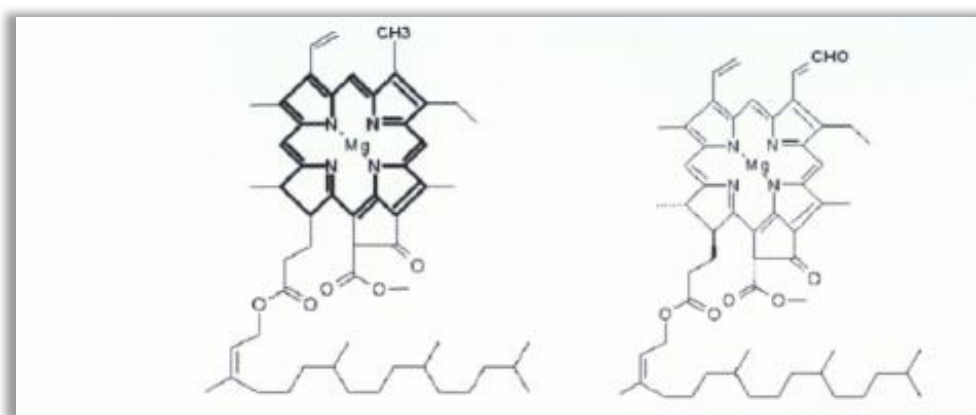
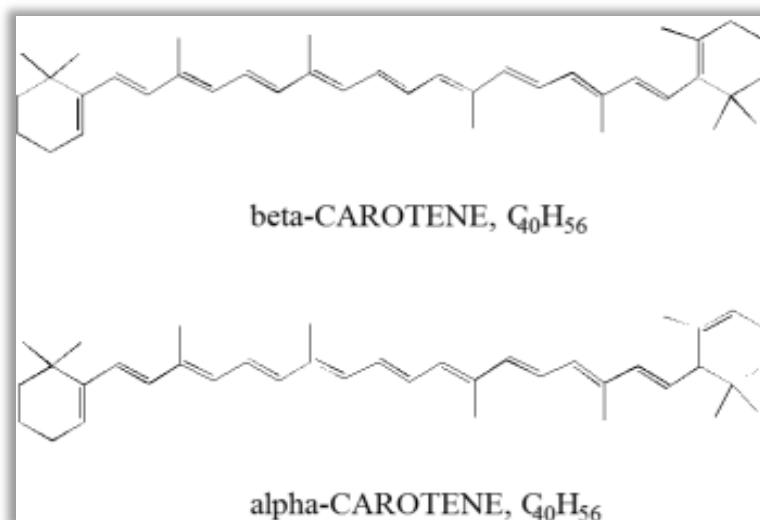
**Σχήμα 1.8** Συντακτική δομή ελεανολικού οξέος (Κυριτσάκης, 2007).

### 1.3 ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Η χημική ένωση στην παρουσία της οποίας οφείλεται το πράσινο χρώμα του ελαιολάδου είναι η χλωροφύλλη. Το πράσινο χρώμα που έχει η χλωροφύλλη θεωρείται για κάποιους ως ένδειξη ποιότητας, παρόλο που δεν έχει ιδιαίτερη θερμική αξία και μάλιστα όταν το λάδι εκτεθεί στο φως η ύπαρξη της το οδηγεί σε τάγγισμα (Μπαλατσούρας, 1997). Οι χλωροφύλλες α και β καθώς και τα προϊόντα οξειδωσής τους, φαιοφυτίνες α και β αντίστοιχα, βρίσκονται στο ελαιόλαδο ως φυσικά συστατικά και η περιεκτικότητά τους εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες (Cichelli and Pertesana, 2004). Ορισμένοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητά του ελαιολάδου σε χλωροφύλλη είναι η ποικιλία της ελιάς, ο βαθμός ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, η μέθοδος εκχύλισης του ελαιολάδου καθώς και άλλοι βιολογικοί και τεχνικοί παράγοντες. Στο παρθένο ελαιόλαδο που προέρχεται από ώριμες ελιές, τα επίπεδα της χλωροφύλλης κυμαίνονται από 1 έως 10mg/Kg (Ramirez –Tortosa et al., 2006).

Το κίτρινο χρώμα του ελαιολάδου οφείλεται στην ύπαρξη μιας άλλης κατηγορίας χρωστικών που ονομάζονται καροτενοειδή. Η περιεκτικότητά του ελαίου σε καροτενοειδή σχετίζεται με την παρουσία των χλωροφυλλών και επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες. Στο κλάσμα των καροτενοειδών συμπεριλαμβάνονται και οι ξανθοφύλλες (Boskou et al., 2007).

Η λουτεΐνη  $C_{40}H_{56}O$  ανήκει στις ξανθοφύλλες και είναι το κατ' εξοχήν καροτενοειδές του ελαιολάδου. Ακόμη άλλα καροτενοειδή είναι τα καροτένια (α, β, γ) με μοριακό τύπο  $C_{40}H_{56}$  από τα οποία αυτό που έχει το υψηλότερο ποσοστό (85%) είναι το β-καροτένιο (Κυριτσάκης, 2007). Έχει βρεθεί ότι το β-καροτένιο, η α-τοκοφερόλη και οι χηλικές ενώσεις του νικελίου αποσβένουν το  $O_2$  με αποτέλεσμα να περιορίζεται η αλλοίωση του ελαιολάδου κατά την φωτοοξείδωση (Kiritsakis and Dygan, 1985).



Χλωροφύλλη-α ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) Χλωροφύλλη-β ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ )

**Σχήμα 1.9** Συντακτική Δομή: *a, b* Καροτένιο, *α, β* Χλωροφύλλη (Κυριτσάκης, 2007).

#### **1.4 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Οι φαινολικές ενώσεις σχετίζονται με την σταθερότητα του ελαιολάδου και με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Πολλές φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο λάδι, κυρίως η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη καθώς και τα παράγωγά τους, έχουν διερευνηθεί διεξοδικά, με σκοπό να συσχετιστούν οι διατροφολογικές προσλήψεις με τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων ή καρκίνου (Boskou et al., 2007).

Οι τρέχουσες και ολοκληρωμένες μελέτες σε αυτόν τον τομέα, συνδέουν αυτές τις φαινόλες με τον ευεργετικό ρόλο του ελαιολάδου στον άνθρωπο. Οι φαινολικές ενώσεις παρθένου ελαιολάδου ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες:

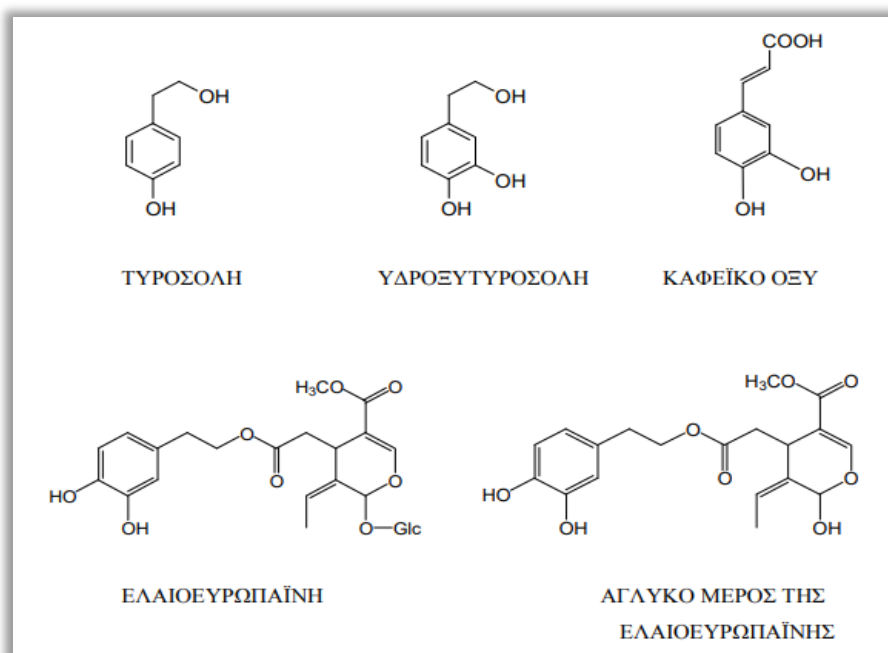
- A. Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά τους.
- B. Παράγωγα των: 4-υδροξυβενζοϊκών, 4-υδροξυφαινολυξικών και 4-υδροξυκινναμικών οξέων.
- Γ. Λιγνίνες.
- Δ. Φλαβονοειδή (Boskou et al., 2007).

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη στις διάφορες μορφές τους αναφέρονται ως τα κύρια συστατικά των φαινολών. Το πιο πολικό μέρος του εκχυλίσματος μεθανόλης-νερού περιέχει φαινόλες και φαινολικά οξέα. Το λιγότερο πολικό μέρος περιέχει αγλυκόνες, ελαιοευρωπαϊνή, ligstroside (οι εστέρες υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης) (Boskou et al., 2007).

Την προστασία του ελαιολάδου από το τάγγισμα προσφέρουν οι φαινόλες που ανήκουν στο άπολο τμήμα του (Montedoro et al., 1990).

Η περιεκτικότητα της ελαιοζύμης σε φαινολικές ενώσεις είναι 2-5% (Montedoro et al., 1978). Από αυτό 100-900 mg/Lt κατακρατούνται από το ελαιόλαδο γιατί το υπόλοιπο φεύγει στα φυτικά υγρά (Servilli and Montedoro, 1989). Η συγκέντρωση ενός ελαιολάδου σε φαινολικές ουσίες είναι 150-300mg/Kg. Σε αυτή την περίπτωση οι φαινολικές ουσίες δρουν ως ασπίδα προστασίας απέναντι στο τάγγισμα (Poiana & Mincione, 2004).

Όταν οι φαινόλες, με την υδροξυτυροσόλη σε πλεονασμό, περιέχονται στο ελαιόλαδο σε ποσότητες 200-300mg/Lt, εξασφαλίζουν στο ελαιόλαδο φρουτώδη, πικάντικη και ελαφρώς πικρή γεύση. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις ξεπεράσουν τα 300mg/Kg και φτάσουν έως τα 900 mg/Kg, τότε το λάδι αποκτά πικρή, αποκρουστική γεύση (Μπαλατσούρας, 1997).



**Σχήμα 1.10** Συντακτικές Δομές κυριότερων Φαινολών (Μπαλατσούρας, 1997).

Οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Τα

ενδιάμεσα της φαινοξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορεί εύκολα να ξεκινήσει μια αλυσιδωτή αντίδραση (Roberfroid and Calderon, 1990).

## 1.5 ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι πτητικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο έχουν αναφερθεί από τους Morales et al. (2005). Περίπου διακόσια ογδόντα ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στο πτητικό κλάσμα παρθένων ελαιολάδων. Είναι υδρογονάνθρακες (περισσότερες από 80 ενώσεις), αλδεΐδες (44 ενώσεις), κετόνες (26 ενώσεις), οξέα (13 ενώσεις), εστέρες (55 ενώσεις), αιθέρες (5 ενώσεις), παράγωγα ουρανίου (5 ενώσεις), παράγωγα θειοφαινίου (5 ενώσεις), πυρανόνες (1 ένωση), θειόλες (1 ένωση), πυραζίνες (1 ένωση), αλκοόλες (45 ενώσεις). Από αυτόν τον μεγάλο αριθμό, μόνο 67 βρέθηκαν να είναι παρόντα σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο οσμής, που συμβάλλουν στο άρωμα του παρθένου ελαιόλαδου.

Περίπου είκοσι από αυτές τις ενώσεις συμβάλλουν στη γεύση των παρθένων ελαιολάδων με αισθητήρια ελαττώματα (Angerosa et al., 1996)..

Οι ενώσεις αυτές παράγονται με υπερβολική ωρίμανση του καρπού, σημαντική επίθεση στα φρούτα από βακτήρια, όταν αποθηκεύονται οι καρποί για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν την εκχύλιση λαδιού και σε αντίξοες συνθήκες αποθήκευσης (Angerosa, 2002).

Σύμφωνα με τους Morales et al. (2005), οι κύριες πτητικές ενώσεις οι οποίες συνεισφέρουν σε αυτό που λέγεται 'Μυρωδιά' εκτός γεύσης και που είναι χαρακτηριστικό για τα έλαια που προέρχονται από ελιές που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της ζύμωσης είναι κυρίως το βουτανοϊκό αιθύλιο, το προπανοϊκό και το βουτανοϊκό οξύ.

Υπεύθυνες για την γεύση 'υγρασία' του παρθένου ελαιόλαδου, εκτός γεύσης είναι η 1-οκτεν-3-όλη, και σε μικρότερο βαθμό η 1-οκτεν-3-όνη. Αυτό το άρωμα είναι χαρακτηριστικό για έλαια που λαμβάνονται από φρούτα που συσσωρεύονται υπό υγρές συνθήκες για αρκετές ημέρες, προκαλώντας την ανάπτυξη διαφόρων ειδών μυκήτων. Οι κύριες οσμές που συμβάλλουν στο άρωμα 'κρασί-ξύδι' είναι οξικό οξύ, 3-μεθυλοβουτάνη-1-όλη και οξικός αιθυλεστέρας (Κυριτσάκης, 2007).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Η οξείδωση ή οξειδωτική τάγγιση είναι η πιο σοβαρή αλλοίωση που μπορεί να προκληθεί στο ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο περιέχει τριγλυκερίδια τα οποία περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία οξειδώνονται εύκολα (Μπαλατσούρας, 1997).

Αρκετά προϊόντα της οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων, έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση, και αυτό έχει σαν συνέπεια να υποβαθμίζεται η ποιότητα του ελαιολάδου. Κάποια από αυτά τα προϊόντα, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, στα υψηλού βαθμού οξείδωσης ελαιόλαδα, είναι τοξικά (Κυριτσάκης, 2007).

Η οξείδωση στο ελαιόλαδο, εκτός από υποβάθμιση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών (οσμή ,γεύση) μπορεί να επιφέρει αλλαγή και σε ορισμένες φυσικές του ιδιότητες (π.χ ιξώδες). Ακόμη η οξείδωση προκαλεί μείωση στα επίπεδα των απαραίτητων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό και λινολενικό) καθώς και των λιποδιαλυτών βιταμινών και γενικότερα μειώνει την θρεπτική αξία των λιπαρών οξέων (Κυριτσάκης, 2007).

Η οξείδωση του ελαιολάδου, ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες προκαλείται διακρίνεται σε αυτοοξείδωση, φωτοοξείδωση, ενζυμική οξείδωση, οξείδωση που καταλύεται από σίδηρο, θερμοοξείδωση. Η επαφή μεταξύ προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών, βιταμινών κ.λ.π. μπορεί να οδηγήσει σε διάφορους τύπους βλάβης: μετουσίωση πρωτεϊνών, πολυμερισμός, απώλεια βιτα-μινών, αλλαγές στην υφή, χρώμα κ.λ.π. Η οξείδωση των απαραίτητων λιπαρών οξέων και αμινοξέων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της θρεπτικής αξίας των τροφίμων (Frankel, 2001).

Η τελική σύνθεση των VOO είναι το αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού μεταβλητών και επηρεάζονται από όλα τα στάδια σχηματισμού ελαίου, μέχρι την κατάσταση ελαίου στην κατανάλωση. Μερικές από αυτές τις μεταβλητές έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη συγκέντρωση ενώσεων που τροποποιούν την σταθερότητα ως προς την οξείδωση και μπορούν να διαιρεθούν ως εξής (Velasko and Dobarganes, 2002):



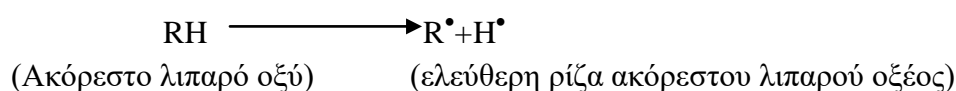
1. Μεταβλητές που δρουν πριν την εξαγωγή του λαδιού. Πολλοί παράγοντες όπως για παράδειγμα η ποικιλία ελιών, περιβαλλοντικές, κλιματολογικές, εδαφολογικές συνθήκες καλλιέργειας, η ωριμότητα της ελιάς και η υγεία της ελιάς εμπλέκονται στις διαφορές στη σύνθεση του VOO κατά τον σχηματισμό του στα φρούτα.
2. Μεταβλητές που ενεργούν κατά την εξαγωγή του λαδιού συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης των διαφόρων σταδίων της διαδικασίας όπως άλεση, παρασκευή πάστας ελιάς, σύστημα εκχύλισης λαδιού και φιλτράρισμα της ποιότητας των VOO.
3. Μεταβλητές που δρουν μετά την εκχύλιση του λαδιού, κατά την αποθήκευση. Αφού το ελαιόλαδο εξαχθεί από τις ελιές, η οξειδωτική φθορά μπορεί να επηρεαστεί από εξωτερικές μεταβλητές που σχετίζονται με την αποθήκευση του λαδιού και την λιανική συσκευασία, μεταξύ των οποίων είναι το διαθέσιμο οξυγόνο, η θερμοκρασία, το φως καθώς και η πιθανή επιμόλυνση μετάλλων κατά την αποθήκευση.
4. Μια σημαντική επίδραση στην κατάσταση του λαδιού κατά την κατανάλωση, μπορεί επίσης να αποδοθεί στις μαγειρικές διεργασίες που συνήθως συμβάλλουν στην θερμική αποδόμηση των ελαίων, με το τηγάνισμα να είναι μία από τις κοινές διαδικασίες. Εκτός από πολλές άλλες χρήσεις, το ελαιόλαδο θεωρείται εξαιρετικό για εφαρμογές με υψηλές θερμοκρασίες (Casal et al., 2010), αφού πληρεί όλα τα κριτήρια λιπαρών οξέων του σταθερού υγιεινού τηγανίσματος (Kochhar, 2000) με το πρόσθετο πλεονέκτημα του σχετικά χαμηλού σημείου τήξεως.

## 2.1 ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γραφτεί πολλές αναλυτικές κριτικές σχετικά με τον μηχανισμό της οξείδωσης των λιπιδίων (Frankel, 1989). Πολλοί καταλύτες ή εκκινητές επιταχύνουν την οξείδωση. Αυτά περιλαμβάνουν φως, θερμοκρασία, ένζυμα, μέταλλα, μεταλλοπρωτεΐνες,. Η αυτοοξείδωση των λιπαρών οξέων στηρίζεται κατ'εξοχήν στην δομή που είναι γνωστή ως 1-4 cis-cis πενταδιένιο (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). Πενταδιενική δομή δεν υπάρχει στο ελαιϊκό οξύ, υπάρχει μια φορά στο λινελαϊκό οξύ, δυο φορές στο λινολενικό και τρεις φορές στο αραχιδικό (Μπαλατσούρας, 1997). Τα κύρια υποστρώματα για αυτές τις αντιδράσεις είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα και οξυγόνο. Ο μηχανισμός ελευθέρων ριζών της οξείδωσης

των λιπιδίων χωρίζεται συνήθως σε τρία στάδια: 1. έναρξη (intitiation), 2. διάδοση (propagation), 3. τερματισμός (termination).

1.Εναρξη (Initiation). Στο στάδιο αυτό σχηματίζονται οι πρώτες ελεύθερες ρίζες ( $R^\bullet$ ). Το στάδιο αυτό δεν χαρακτηρίζεται από κατανάλωση ατμοσφαιρικού οξυγόνου και επίσης δεν υπάρχει ανεπιθύμητη οσμή και γεύση. Η διάρκεια του σταδίου αυτού καθορίζεται από την σύσταση της λιπαρής ουσίας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στο ρυθμό των αντιδράσεων σχηματισμού ελεύθερων ριζών (Κυριτσάκης, 2007).



2.Διάδοση (Propagation). Σε αυτό το στάδιο οι ελεύθερες ρίζες  $R^\bullet$  που έχουν σχηματιστεί αρχικά αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και δίνουν ρίζες  $ROO^\bullet$  υπερόξυ-ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται σε υδροϋπεροξειδία  $ROOH$  αφού γίνει απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το μόριο του ακόρεστου λιπαρού οξέος. Η ρίζα  $R^\bullet$  που προκύπτει αντιδρά στη συνέχεια με το οξυγόνο, για να δώσει νέα υπερόξυ-ρίζα ( $ROO^\bullet$ ) και τότε αρχίζει να επιταχύνεται η οξείδωση (Κυριτσάκης, 2007).



Τα υδροϋπεροξειδία είναι ασταθή και διασπώνται εύκολα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προκύπτουν νέες ελεύθερες ρίζες ( $RO^\bullet, ROO^\bullet$ ) οι οποίες συμμετέχουν στις αντιδράσεις σχηματισμού ριζών  $R$  και σε νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις (Κυριτσάκης, 2007).

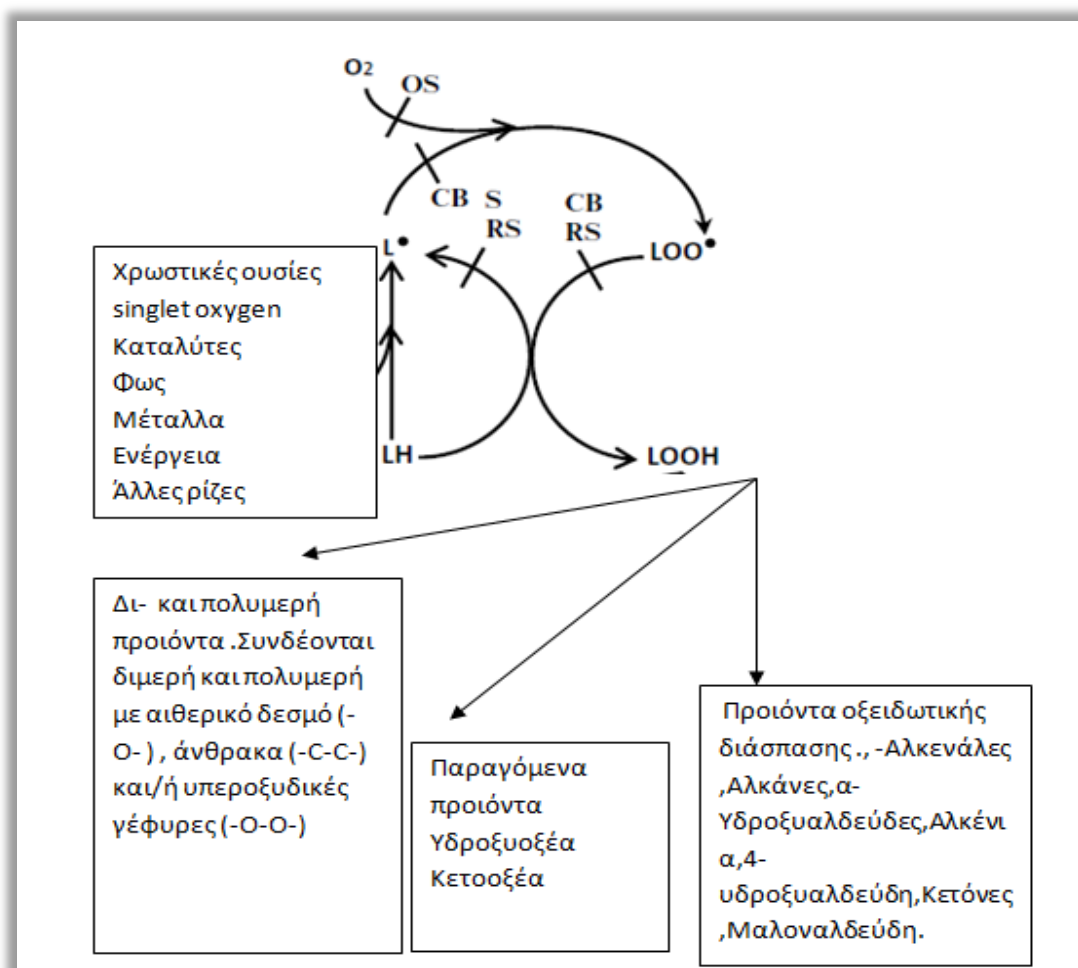
3.Τερματισμός (Termination) Στο στάδιο τερματισμού σχηματίζονται σταθερά προϊόντα που δεν έχουν το χαρακτήρα της ελεύθερης ρίζας (Κυριτσάκης, 2007).



Όπου  $R^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$  = ελεύθερες ρίζες

$RR$ ,  $ROOR$  = προϊόντα τελικής αντίδρασης

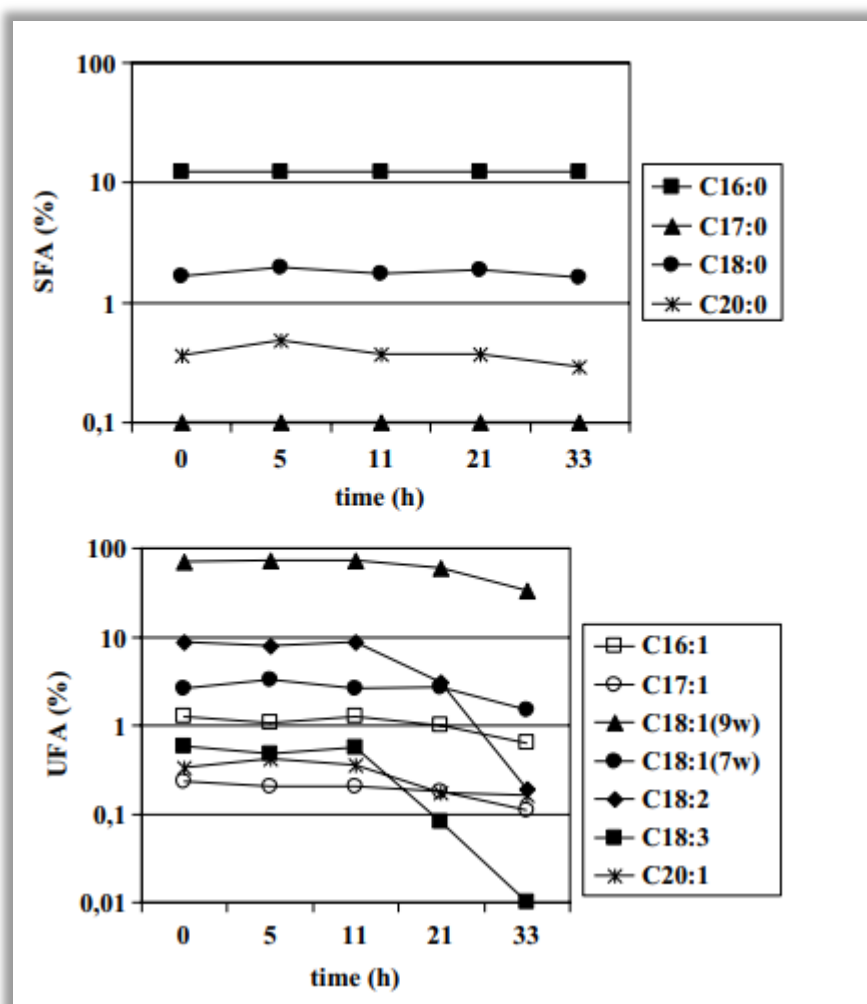
Κατά το στάδιο τερματισμού, οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζονται μη ριζικά προϊόντα. Οποιαδήποτε αντίδραση που εμποδίζει την διάδοση υπεροξειδωσης ή απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες από το σύστημα, παίζει βασικό ρόλο στο μηχανισμό τερματισμού (Σχήμα 2.1) (Morales and Przybilski, 2013).



**Σχήμα 2.1** Μηχανισμός οξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης των αντιοξειδωτικών και χημικοί παράγοντες. Σημείωση Λιπιδικές ενώσεις :LH, ρίζα λιπιδίου: LOO, υπεροξυ-ρίζα: LOOH, oxygen scavenger :OS, διακόπτης αλυσιδωτής αντίδρασης: CB, συνεργιστικό :S αποσβέστης:Q, χηλική ένωση: CA, root scavenger: RS (Πηγή: Shahidi and Wanasunda, 1992).

Ο σχετικός ρυθμός οξείδωσης ελαϊκού /λινελαϊκού /λινολενικού είναι της τάξης 1/12/25 με βάση τον σχηματισμό υπεροξειδίου (Frankel, 1983). Ο ρυθμός από-

σύνθεσης του υδροϋπεροξειδίου σχετίζεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών στο οξειδωμένο λιπαρό οξύ. Τα λινολενικά υδροϋπεροξείδια αποσυντίθενται ταχύτερα από τα λινελαϊκά και ελαϊκά και μπορούν επίσης να διαδώσουν την οξείδωση άλλων λιπαρών οξέων (Frankel, 1989). Στο Σχήμα 2.2 φαίνεται η αλλαγή στη σύνθεση λιπαρού οξέος του VOO κατά την οξείδωση. Η ταχύτητα διάσπασης υδροϋπεροξειδίων εξαρτάται από τον αριθμό των διπλών δεσμών: υπεροξείδιο C18:3> υπεροξείδιο C18:2> υπεροξείδιο C18:1



**Σχήμα 2.2** Μεταβολή κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (%) κατά την διάρκεια της διαδικασίας οξειδωτικής επιδείνωσης του παρθένου ελαιολάδου (Morales and Przybylski, 2013).

Από το Σχήμα 2.2 είναι φανερό ότι κυρίως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μειώθηκαν κατά την διάρκεια της αυτοοξείδωσης. Έτσι το ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ ήταν εκείνα που επηρεάστηκαν περισσότερο.

Το λινολενικό οξύ παρουσίασε ταχύτερη αποσύνθεση από το λινελαϊκό οξύ, ακολουθούμενο από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά. Η πιο σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μετά από 21 ώρες οξειδωσης όταν εντοπίστηκε μεγαλύτερη ποσότητα πτητικών. Το λινολενικό οξύ ουσιαστικά εξαφανίστηκε μετά από 33 ώρες οξειδωσης, η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ μειώθηκε δραστικά και το ελαϊκό οξύ επηρεάστηκε επίσης από την οξειδωτική φθορά. Στα οξειδωμένα λάδια, μετά από 21 ώρες ανιχνεύτηκαν πολλές αλδεΐδες. Οι συγκεντρώσεις τους αυξήθηκαν περαιτέρω κατά τις επόμενες ώρες, πράγμα που σημαίνει ότι τα κύρια πτητικά προϊόντα αποσύνθεσης που βρέθηκαν σε οξειδωμένα ελαιόλαδα, παρήχθησαν από μονοϋδροϋπεροξειδία των ακόρεστων ελαϊκών, λινολεϊκών και λινολενικών λιπαρών οξέων.

Επίσης σύμφωνα με τον Μπαλατσούρα (1997) ο ρυθμός οξειδωτικού ταγγίσματος εξαρτάται από :

1. Ο ρυθμός οξειδώσεως είναι τόσο πιο γρήγορος όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διπλών δεσμών στο μόριο του λιπαρού οξέος ή του τριγλυκεριδίου.
2. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των μορίων λινελαϊκού σε τριγλυκερίδια με βάση το ελαϊκό οξύ και του ρυθμού οξειδωτικού ταγγίσματος είναι γραμμική.
3. Ο τριπλός δεσμός οξειδώνεται τέσσερις φορές πιο γρήγορα απ' ό τι ο διπλός δεσμός.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, στην ελεύθερη μορφή τους, οξειδώνονται δύο φορές πιο γρήγορα από ότι οι αντίστοιχοι εστέρες τους. Ο ρυθμός οξειδωτικού ταγγίσματος στο ελαιόλαδο είναι περίπου ανάλογος με τον αριθμό ιωδίου που προσδιορίστηκε σε αυτό. Τα τελικά προϊόντα του οξειδωτικού ταγγίσματος μειώνουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ελαιολάδου, ενώ παράλληλα πολλά είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία. Αυτά τα προϊόντα είναι οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα οξέα, τα οξυοξέα και τα κετονοξέα. Στην δυσάρεστη οσμή που εμφανίζουν τα ελαιόλαδα σημαντικό ρόλο παίζουν οι αλδεΐδες (ακεταλδεΐδη, προπιοναλδεΐδη, κροτοναλδεΐδη, α-πεντανάλη και η εξενο-διάλη (Μπαλατσούρας, 1997).

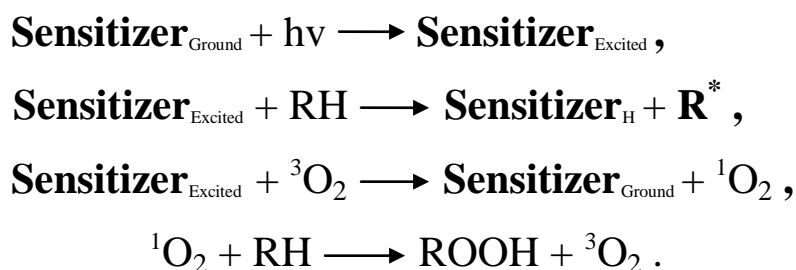
## 2.2 ΦΩΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ

Η φωτοοξειδωση, η οποία και συνδέεται με την παρουσία ορισμένων χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη, είναι μια σημαντική αιτία αλλοίωσης του ελαιολάδου. Η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη, οι οποίες ονομάζονται στην φωτοοξειδωση ευαισθητοποιητές (sensitizers) βρίσκονται τόσο στην απλή ή διεγερμένη κατάσταση (singlet sensitizers) όσο και στην τριπλή ή θεμελιώδη (triplet sensitizers). Το οξυγόνο βρίσκεται και αυτό τόσο στην διεγερμένη ( $^1\text{O}_2$ ) όσο και στην βασική κατάσταση ( $^3\text{O}_2$ ) (Κυριτσάκης, 2007).

Προκειμένου να αρχίσει η φωτοοξειδωση, θα πρέπει οι ευαισθητοποιητές (χλωροφύλλη, φαιοφυτίνη) να έρθουν σε επαφή με το φως (άμεσο ηλιακό, διάχυτο φως δωματίου, φως φθορισμού). Αυτό είναι πολύ εύκολο να συμβεί όταν το ελαιόλαδο συσκευάζεται σε διάφανα δοχεία και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης είναι μεγάλη (Interesse et al., 1971).

Συνήθως η ποσότητα οξυγόνου που διαλύεται σε λάδι ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας, είναι επαρκής για την οξείδωση του λαδιού, σε ένα εμπορευματοκιβώτιο σε τιμή PV 10 meq/Kg (Przybylski and Eskin, 1988).

Η έκθεση των ευαισθητοποιητών στο φως, έχει σαν αποτέλεσμα την απορρόφηση ενέργειας, η οποία προκαλεί την ενεργοποίησή τους. Κατόπιν, η ενέργεια που απορροφήθηκε αποδίδεται στο  $^3\text{O}_2$  το οποίο και μεταπίπτει στο  $^1\text{O}_2$ . Η διαδικασία του σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωτοοξειδωση και η μεταφορά ενέργειας συμβαίνει όπως περιγράφεται στον ακόλουθο μηχανισμό :



**Σχήμα 2.3** Διαδικασία σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων (Morales and Przybylski, 2013).

*Sensitizer Ground* Χρωστική στη θεμελιώδη κατάσταση

*Sensitizer Excited* Χρωστική στη διεγερμένη κατάσταση

$^3\text{O}_2$  οξυγόνο τριπλής κατάστασης,  $^1\text{O}_2$  singlet oxygen,

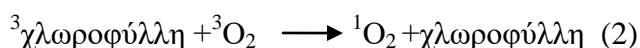
*RH* Λιπαρό οξύ, *ROOH* Υδροϋπεροξειδίου του λιπαρού οξέος, *hν* ηλιακή ενέργεια

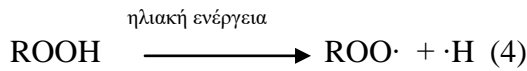
Η ενέργεια ( $h\nu$ ) μεταφέρεται από το φως στον ευαισθητοποιητή (Sensitizer Excited), ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να αντιδράσει άμεσα με ένα λιπίδιο (RH) σχηματίζοντας ρίζες ( $R^*$ ) που με τη σειρά τους ξεκινούν την οξειδωση. Στη συνέχεια ο Excited αντιδρά με το  $^3O_2$  στην θεμελιώδη κατάσταση και το μετατρέπει σε singlet oxygen. Το πιο καταστροφικό είναι η αντίδραση ενός διεγερμένου ευαισθητοποιητή με οξυγόνο στη βασική κατάσταση προς σχηματισμό singlet oxygen. Η μεταφορά ενέργειας σε ένα αποδέκτη, ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ, προκαλεί το σχηματισμό ενός υδροϋπεροξειδίου. Το διεγερμένο οξυγόνο έχει βρεθεί ότι αντιδρά με το λινελαϊκό οξύ περίπου 1500 φορές ταχύτερα από το οξυγόνο (Morales and Przybylski, 2013).

Η αποτελεσματικότητα της φωτοοξειδωσης είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος του φωτός, όπου τα μικρότερα μήκη κύματος είναι τα πιο αποτελεσματικά. Αυτή η διαδικασία διαδίδεται με τον μηχανισμό ελεύθερων ριζών, και σχηματίζονται παρόμοια υδροϋπεροξειδία (Frankel, 1983). Σύμφωνα με τον Κυριτσάκη (2007), η φωτοοξειδωτική δράση της χλωροφύλλης είναι μεγαλύτερη από την φωτοοξειδωτική δράση της φαιοφυτίνης παρόλο που και η χλωροφύλλη (a,b) και η φαιοφυτίνη (a,b) στο σκοτάδι δρουν ως παρεμποδιστές της αυτοοξειδωσης. Οι Rahmani and Csallani (1991), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο ελαιόλαδο τόσο πιο ευαίσθητο είναι αυτό στη φωτοοξειδωση.

Σύμφωνα με τον Κυριτσάκη (2007), όταν συμβεί φωτοοξειδωση, η φυσική χλωροφύλλη καταστρέφεται εντελώς. Τα υδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων που σχηματίζονται στην αρχή, διασπώνται με την καταλυτική δράση του φωτός και δίνουν υπεροξειδικές ρίζες ( $ROO\cdot$ ). Στη συνέχεια οι υπεροξειδικές ρίζες αποσπούν άτομα υδρογόνου από την χλωροφύλλη με αποτέλεσμα μεταβολές στο συζυγές ηλεκτρονιακό σύστημα της χλωροφύλλης. Η ελεύθερη ρίζα της χλωροφύλλης στη συνέχεια αντιδρά με το  $^1O_2$  και τότε προκύπτει η αποχρωματισμένη μορφή της χλωροφύλλης μετά από αντίδραση με μια ελεύθερη ρίζα υδρογόνου.

Η καταστροφή της χλωροφύλλης κατά την διάρκεια της φωτοοξειδωσης ακολουθεί τον πιο κάτω πολύπλοκο μηχανισμό :





**Σχήμα 2.4** Μηχανισμός καταστροφής της χλωροφύλλης (Κυριτσάκης, 2007).

Τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται από singlet oxygen αποσυντίθενται εύκολα για να σχηματίσουν μια ποικιλία αλκοξυ και υπεροξυ -ριζών οι οποίες με την σειρά τους επιταχύνουν την αυτοοξειδωση των ελεύθερων ριζών. Η οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων από singlet oxygen μπορεί να ανασταλεί, από ενώσεις που αντιδρούν ταχύτερα με αυτόν τον εκκινητή ή από αποσβέστες που απενεργοποιούν το singlet oxygen στη μορφή του εδάφους (Morales and Przybylski, 2013).

Μεταξύ των πιο αποτελεσματικών φυσικών αποσβεστών που είναι γνωστές είναι η α-τοκοφερόλη και το β-καροτένιο. Άλλοι γνωστοί αποσβέστες περιλαμβάνουν αμινοξέα, πρωτεΐνες, σουλφίδια, φαινόλες και χηλικές ενώσεις (Bellus, 1978). Σύμφωνα με τους Kiritsaki and Dugan (1985) ο συνδυασμός β-καροτένιου και α-τοκοφερόλης δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.

Έτσι στον πίνακα που ακολουθεί διακρίνουμε την διαφοροποίηση του Αριθμού Υπεροξειδίων σε δείγματα ελαιολάδου στα οποία είχε προστεθεί β-καροτένιο και χηλική ένωση του νικελίου και τα οποία οξειδώθηκαν σε μικρότερο βαθμό από τον μάρτυρα όταν εκτέθηκαν σε φως φθορισμού.



**Πίνακας 2.1** Οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου που εκτέθηκε σε φως φθορισμού, παρουσία β-καροτένιου και χηλικής ένωσης νικελίου (Κυριτσάκης, 2007).

Αριθμός υπεροξειδίου ελαιολάδου

(meqO<sub>2</sub>/Kg ελαιολάδου)

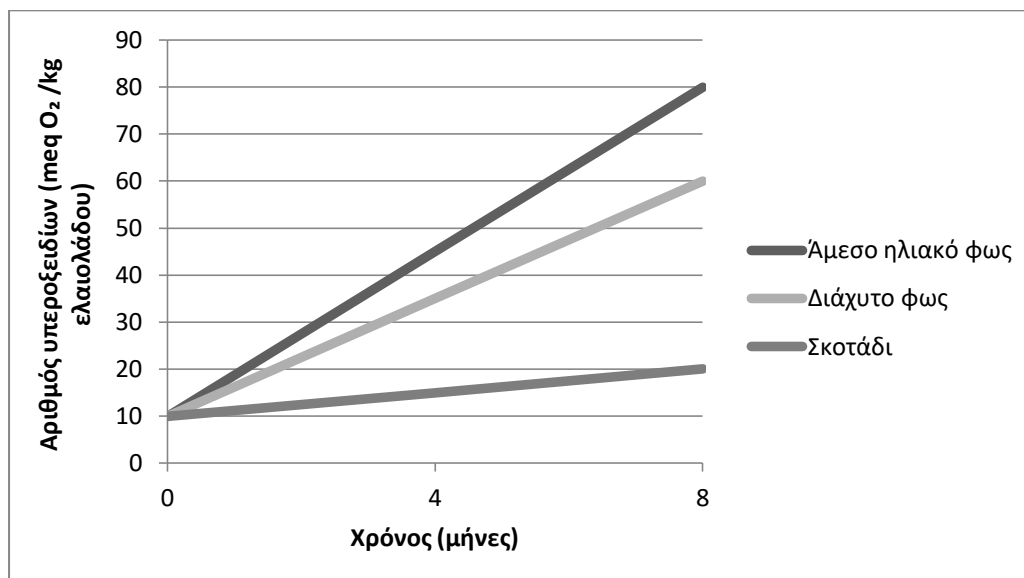
Περιπτώσεις	Ώρες φωτισμού (θερμοκρασία 32 <sup>0</sup> C)				
	0	8	16	24	32
Αποχρωματισμένο ελαιόλαδο + χλωροφύλλη (6mg/Kg)	0	27	45	51	72
Αποχρωματισμένο ελαιόλαδο +χλωροφύλλη (6mg/kg) +β – καροτένιο (100mg/kg)	0	5	16	26	57
Αποχρωματισμένο ελαιόλαδο +χλωροφύλλη (6mg/kg) +χηλική ένωση νικελίου (100mg/kg)	0	10	16	25	47

Από τον πίνακα 2.1 φαίνεται ότι τόσο το β-καροτένιο όσο και η χηλική ένωση του νικελίου έδρασαν σαν αποσβέστες του <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> επανέρχεται με την παρουσία κατάλληλου αποσβέστη στη βασική του κατάσταση (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>).

Σύμφωνα με Kiritsakis (1998), σε δείγματα ελαιολάδου που περιέχονταν σε φιάλες από πλαστικό και από γυαλί και οι οποίες διατηρήθηκαν σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας φωτός φθορισμού, (έκθεση σε δύο λαμπτήρες φθορισμού ισχύος 18 Watt ο καθένας και σε απόσταση 30 εκατοστών από τα δείγματα εμφανίστηκε διπλάσια αυξημένος ο Αριθμός Υπεροξειδίων στα δείγματα που δέχτηκαν φως από τα δείγματα που ήταν στο σκοτάδι. Η μεγαλύτερη αύξηση στον Αριθμό Υπεροξειδίων των πλαστικών αλλά και των γυάλινων δειγμάτων ελαιολάδου που εκτέθηκαν στο φως, ενισχύει την άποψη ότι η χλωροφύλλη που υπήρχε στα δείγματα προφανώς προώθησε την φωτοοξείδωση. Από την άλλη η μικρότερη αύξηση του Αριθμού Υπεροξειδίων όλων των δειγμάτων (πλαστικών και γυάλινων)

που παρέμειναν στο σκοτάδι ενδέχεται να συνδέεται με την αντιοξειδωτική δράση της χλωροφύλλης (Κυριτσάκης, 2007).

Στο Σχήμα 2.5 που ακολουθεί, φαίνεται η επίδραση που έχει τόσο το ηλιακό φως όσο και το διάχυτο φως και το σκοτάδι στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων .



**Σχήμα 2.5** Επίδραση του σκότους, του άμεσου ηλιακού φωτός και του διάχυτου φωτός δωματίου στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (περίπου 4 ώρες την ημέρα και τον υπόλοιπο χρόνο της ημέρας στο διάχυτο φως ) (Κυριτσάκης, 2007).

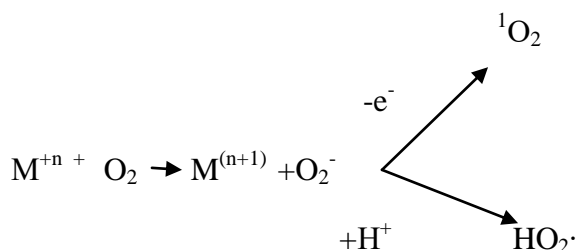
### **2.3 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΠΟΥ ΚΑΤΑΛΥΕΤΑΙ ΑΠΟ ΣΙΔΗΡΟ**

Τα λιπίδια των τροφίμων περιέχουν γενικά, ίχνη βαρέων μετάλλων που πιθανώς προκύπτουν από την παρουσία ενζύμων τα οποία ενεργοποιούν τα μέταλλα ή από τα προϊόντα αποσύνθεσης των ενζύμων. Τα βαρέα μέταλλα, ιδιαίτερα εκείνα με δύο ή περισσότερες καταστάσεις σθένους, αυξάνουν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Ο μηχανισμός της καταλυόμενης από σίδηρο υπεροξειδωσης λιπιδίων εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία προσχηματισμένου υδροϋπεροξειδίου του λιπιδίου (LOOH) και διαιρείται σε ανεξάρτητη από LOOH (ή εξαρτώμενη από σίδηρο) και εξαρτώμενη από LOOH (Girotti, 1985).

Ο μηχανισμός LOOH- ανεξάρτητη έναρξη δεν είναι σαφής. Τα μέταλλα μετάπτωσης είναι ικανά να διασπών άμεσα τα ακόρεστα λιπίδια ( LH ) σε ρίζες

αλκάλιο ( L' ) αλλά αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα αργά και συνεπώς δεν είναι σημαντική στην προώθηση της οξειδωσης των λιπιδίων (Reische et al., 1998) .

Ένα μονοπάτι της LOOH- ανεξάρτητης οξειδωσης μπορεί να γίνει μέσω ενεργοποίησης οξυγόνου παρουσία μετάλλων μετάπτωσης, οπότε η έναρξη της οξειδωσης λαμβάνει χώρα είτε μέσω υπεροξειδικών ριζών HO<sub>2</sub> είτε μέσω singlet oxygen (Nawar, 1996) .

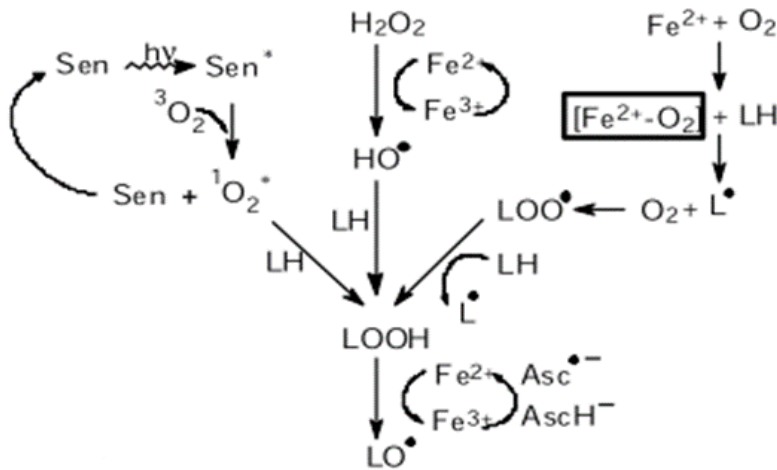


Η υπεροξειδική ρίζα παρατηρήθηκε ότι δεν έπαιζε σημαντικό ρόλο ως εκκινητής υπεροξειδωσης σε συστήματα λιποσωμάτων (Aruoma et al., 1989).

Ωστόσο οι Tadolini and Hakin (1997) υποστήριξαν την συμμετοχή του Fe<sup>+3</sup> στην έναρξη της υπεροξειδωσης του ελεύθερου λιπιδίου. Έχει προταθεί ο σχηματισμός ενός συμπλόκου Fe<sup>2+</sup> - O<sub>2</sub> - Fe<sup>+3</sup> (Minotti and Aust, 1987) και σύμπλοκων σιδήρου-οξυγόνου, όπως

Ferryl ( Fe<sup>4+</sup> ) και perferryl ιόντων (Fe<sup>5+</sup>) (Goddard and Sweeney, 1987) που ξεκινούν την οξειδωση λιπιδίων.

Ο σίδηρος μπορεί να είναι καταστροφικός καταλύτης στην υπεροξειδωση των λιπιδίων επειδή μπορεί να ξεκινήσει και να ενισχύσει την υπεροξειδωση τους. Το βήμα έναρξης μπορεί να προκληθεί από δύο διαφορετικούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από το σίδηρο. Ο μηχανισμός που εξαρτάται από τις ρίζες του υδροξυλίου έχει υιοθετηθεί από τους περισσότερους ερευνητές. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός, ανεξάρτητος από τις ρίζες υδροξυλίου, προτείνει ότι τα σύμπλοκα σιδήρου-οξυγόνου και όχι η ρίζα HO ξεκινούν υπεροξειδωση των λιπιδίων. Στον πρώτο μηχανισμό, ο σίδηρος μέσω αντίδρασης Fenton, σχηματίζει HO•, το οποίο τελικά ξεκινά υπεροξειδωση λιπιδίων. Στον δεύτερο μηχανισμό, ωστόσο, έχει προταθεί ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων δεν ξεκινά από HO• αλλά μάλλον από σίδηρο με τη μορφή συμπλόκων σιδήρου-οξυγόνου (Schafer et al., 2000).



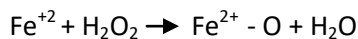
**Σχήμα 2.6** Έναρξη της οξείδωσης των λιπιδίων μέσω σιδήρου από διαφορετικές οδούς (Schafer et al., 2000)

Ο perferryl ion είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν που μπορεί να παραχθεί από αντίδραση των  $Fe^{2+}/O_2$  ή των  $Fe^{3+}/O_2^{\bullet -}$

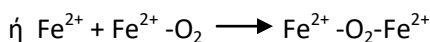


Perferryl ion

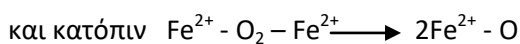
Το Ferryl ion σχηματίζεται μέσω δύο οδών :



Ferryl ion



Perferryl ion



Ferryl ion

(Schafer et al., 2000)

Τα προτεινόμενα σύμπλοκα σιδήρου δεν έχουν απομονωθεί (Ohyashiki et al., 2002) και τα ευρήματα (Aruoma et al., 1989) δείχνουν ότι ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο  $Fe^{+2}-Fe^{+3}$  δεν είναι απαραίτητο για να αρχίσει η οξείδωση. Αρκετές μελέτες (Fukuzama et al., 1988, Fukuzama et al., 1993, Tadolini et al., 1997) έδειξαν ότι όταν τα υπεροξειδία απομακρύνθηκαν από τα λιπίδια, η υπεροξειδωση των λιπιδίων δεν προκλήθηκε από σίδηρο. Επίσης ακόμη και με χαμηλή ποσότητα υπεροξειδίων, οι εξαρτώμενες από υπεροξειδία αντιδράσεις οξείδωσης μπορεί να

καταστούν κυρίαρχες. Καθώς σχεδόν όλα τα λιπίδια περιέχουν ίχνη υπεροξειδίων, η αποσύνθεση υπεροξειδίων από σίδηρο, μπορεί να είναι η πιο σημαντική αιτία οξείδωσης σε πολλά τρόφιμα ( Decker and Mc Clements, 2001).

Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις μετάλλου-υδροϋπεροξειδίου και συνεπώς η οξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τον σίδηρο είναι ακόμη ατελής (Decker and McClements, 2001). Τα υπεροξείδια είναι πιο πολικά από το μη οξειδωμένο λίπος και τείνουν να συσσωρεύονται κοντά στην επιφάνεια. Έτσι, οι συνθήκες αντίδρασης, οι οποίες αυξάνουν την δέσμευση του σιδήρου στην επιφάνεια, θα αυξήσουν την προ-οξειδωτική δράση του σιδήρου (Schaich,1992).

Το  $Fe^{+2}$  αναφέρεται ότι αποσυνθέτει υπεροξείδια με υψηλότερο ρυθμό από τα ιόντα  $Fe^{+3}$  (Frankel,2005). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης για την διάσπαση του δεσμού O-O (184 KJ/mole) από εκείνη του δεσμού O-H (377 KJ/mole) (Min, 2002).

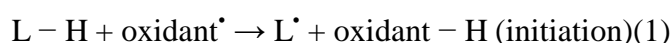
Ένας συγκεκριμένος μηχανισμός εκκίνησης σε συστήματα ελαίου /νερού προτάθηκε σε αρκετές μελέτες (Garner-Suillerot et al.,1984), (Fukuzama et al., 1993), όπου η σύνδεση του σιδήρου στην επιφάνεια του συστήματος ελαίου /νερού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αντίδραση του με υπεροξείδια. Οι ρίζες αλκόξυ ( $LO\bullet$ ) και υπερόξυ ( $LOO\bullet$ ) που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της αποσύνθεσης υπεροξειδίου από σίδηρο, μπορούν στη συνέχεια να διεισδύσουν στην υδρόφοβη περιοχή και να προκαλέσουν τις αντιδράσεις έναρξης αφαιρώντας περαιτέρω άτομο  $H^+$  από λιπαρό οξύ LH με τις ρίζες αλκόξυ να είναι πιο δραστικές από τις υπερόξυ ρίζες ( Buettner, 1993).

Οι Tang et al. ( 2000), ισχυρίζονται ότι η αντίδραση μεταξύ του  $Fe^{+2}$  και του υπεροξειδίου των λιπιδίων θεωρείται υπεύθυνη για την έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, αλλά η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να ξεκινήσει μόνο όταν η συγκέντρωση του  $Fe^{+2}$  μειωθεί σε μια κρίσιμη τιμή .

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μέσω των ελεύθερων ριζών έχει τρία κύρια στάδια: έναρξη, διάδοση, τερματισμό.

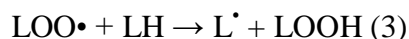
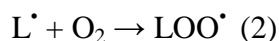
### **1) Έναρξη (intitation)**

Στο στάδιο αυτό παράγεται η ρίζα  $L\bullet$



## **2) Διάδοση (Propagation)**

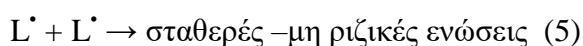
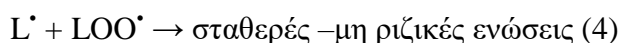
Μόλις παραχθεί μία ρίζα,  $L^\bullet$  μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο για να σχηματίσει υπεροξυ-ρίζα (Min, 2002).



Η αλληλεπίδραση του  $L^\bullet$  με το  $O_2$  έχει πολύ χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης (Min, 1988) και ο ρυθμός αντίδρασης είναι πολύ γρήγορος (Ivanov, 1985). Η υπεροξυρίζα που σχηματίζεται μπορεί περαιτέρω να αφαιρεί υδρογόνο από ένα λιπαρό οξύ που παράγει  $L^\bullet$  και μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο και να παράγει άλλο  $LOO^\bullet$ . Ως εκ τούτου, ένα μόνο γεγονός έναρξης μπορεί να οδηγήσει σε μετατροπή εκατοντάδων πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων σε υδροϋπεροξειδία λιπιδίων, που συνοδεύονται από κατανάλωση οξυγόνου, (Gutteridge and Hallwell, 1990). Η αποσύνθεση του  $LOOH$  έχει επίσης ως αποτέλεσμα την συσσώρευση τελικών προϊόντων υπεροξειδωσίας λιπιδίων βραχείας αλυσίδας, κυρίως αλδεϋδών (Minotti and Aust, 1989).

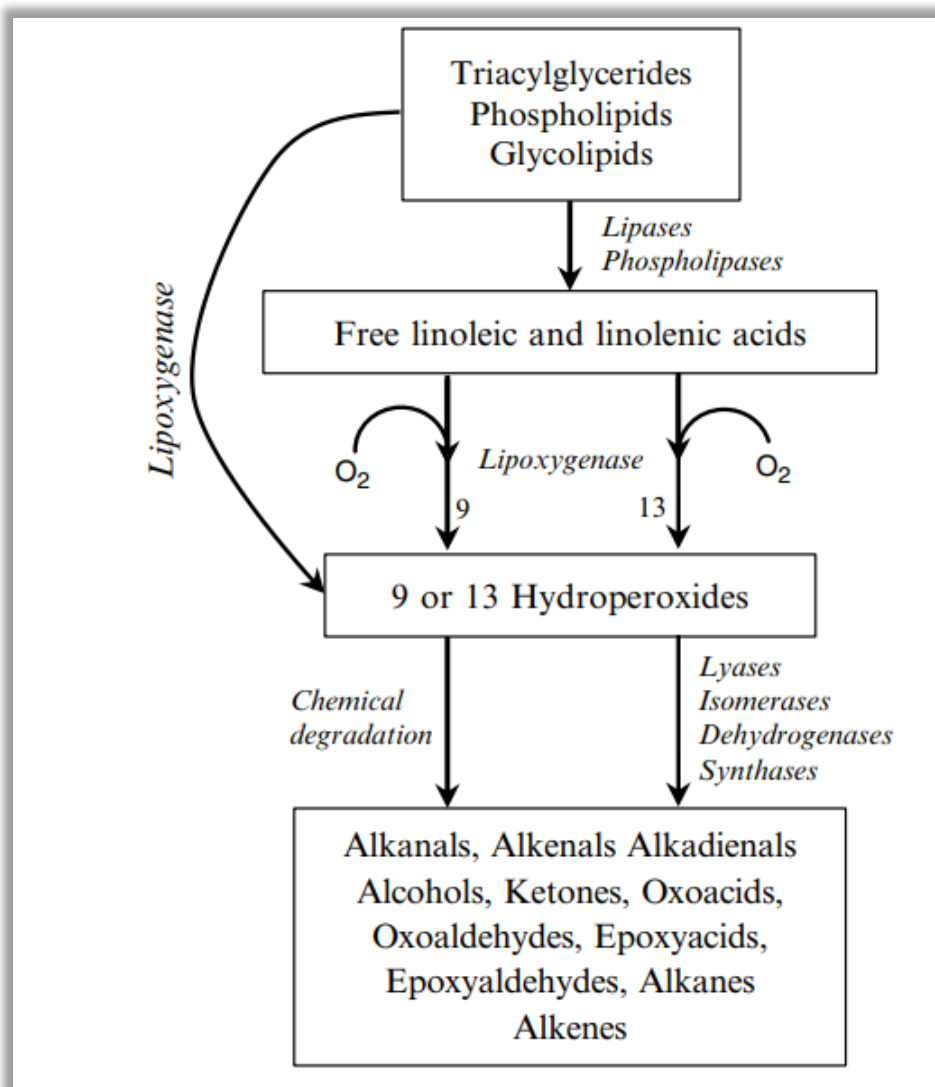
## **3) Τερματισμός (Termination)**

Στο τελευταίο στάδιο της οξειδωσίας οι ρίζες υπεροξειδίου συσσωρεύονται και τείνουν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας μη ριζικά προϊόντα. Όταν το οξυγόνο είναι άφθονο, η αντίδραση μεταξύ αλκόξυ ( $LO^\bullet$ ) ή υπερόξυ ( $LOO^\bullet$ ) με χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης (4 Kcal/mole) σχηματίζει μη ριζικά προϊόντα οξειδωσίας (Colakoglu, 2007). Όταν η συγκέντρωση οξυγόνου είναι χαμηλή, η αντίδραση του  $L^\bullet$  - με  $LOO^\bullet$  -  $LO^\bullet$  ή  $L^\bullet$  - λαμβάνει χώρα και εμποδίζει την επανάληψη της αλληλουχίας της αντίδρασης (Colakoglu, 2007).



## 2.4 ENZYΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Η υποβάθμιση των λιπιδίων συμβαίνει με μια διαδικασία που συχνά ονομάζεται PUFA καταρράκτης (Wang and Hammand, 2010). Συνήθως, διαφορετικά ένζυμα εμπλέκονται στην οξειδωτική αποσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Σχήμα 2.7).



**Σχήμα 2.7** Ενζυμική οξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων (Morales and Przybylski, 2013).

Η αλληλουχία ξεκινά με την υδρόλυση διαφόρων ακυλογλυκεριδίων με λιπάσες και φωσφολιπάσες και απελευθερώνονται PUFA. Στη συνέχεια συγκεκριμένες λιποξυγενάσες μετατρέπουν ακόρεστα λιπαρά οξέα σε δύο κύρια υδροϋπεροξειδία, δηλαδή 9 και 13 ισομερή τα οποία έχουν μικρή σταθερότητα. Στο τελευταίο βήμα του

μονοπατιού, λυάσες, ισομεράσες και αφυδρογονάσες, αποικοδομούν τα υδροϋπεροξειδία σε μια ποικιλία πτητικών και μη πτητικών προϊόντων. Οι αλδεύδες, κετόνες και αλκοόλες, είναι συνήθως άμεσα υπεύθυνες για τη άσχημη γεύση στα έλαια Σχήμα 2.7 (Morales and Przybylski, 2013).

Στις ελιές ο σχηματισμός 13- υδροϋπεροξειδίων από λινελαϊκό και λινολενικό οξύ, οδηγεί στο σχηματισμό C6 αλδευδών και αλκοολών οι οποίες είναι οι κύριοι συντελεστές της αισθητηριακής αντίληψης VOO (Aparicio and Morales, 1998).

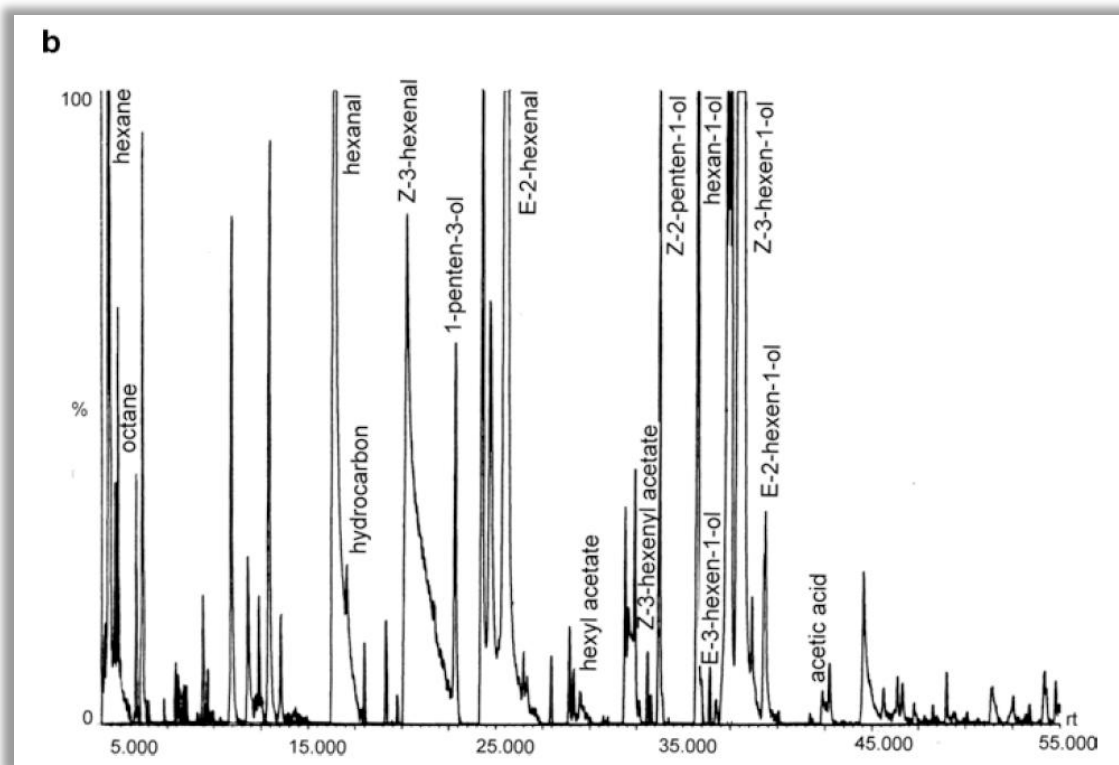
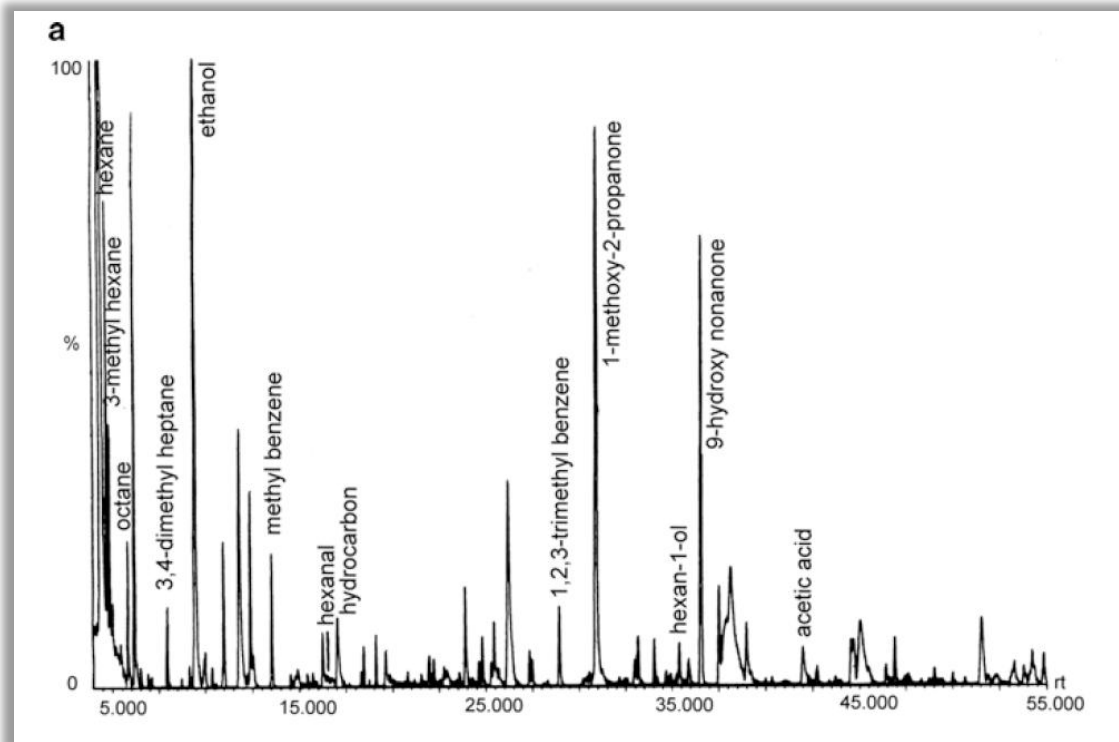
Τα ελεύθερα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα λινελαϊκό και λινολενικό στα φυτά είναι τα προτιμώμενα υποστρώματα τα οποία οξειδώνονται από λιπογενάσες. Ένας συγκεκριμένος τύπος λιποξυγενασών είναι ικανός να καταλύσει την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων όταν αποτελούν μέρος των τριγλυκεριδίων (Morales and Przybylski, 2013).

Για ένα αποτελεσματικό και υψηλό ρυθμό οξείδωσης, τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική αποδόμηση του PUFA απαιτούν την συνεχή παρουσία οξυγόνου (Siedow, 1991).

Έλλειψη του οξυγόνου δεν τερματίζει την οξειδωτική αποικοδόμηση αφού ορισμένες λιποξυγενάσες και άλλα εμπλεκόμενα ένζυμα μπορούν να οξειδώσουν λιπαρά οξέα απουσία οξυγόνου. Στην περίπτωση αυτή σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες αντί υδροϋπεροξειδίου (Feussner et al., 2002). Η παρουσία ίχνους ποσοτήτων υδροϋπεροξειδίων επιταχύνουν την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων από λιποξυγενάσες, ιδιαίτερα υπό αναερόβιες συνθήκες (Siedow, 1991).

Τα ένζυμα που καταλύουν την αποδόμηση PUFA είναι πολύ ενεργά κατά την ωρίμανση της ελιάς. Κατά την συγκομιδή, την αποθήκευση και την μεταποίηση της ελιάς, συμβαίνει συχνά ζημιά στα φρούτα και το περιεχόμενο των σπασμένων κυττάρων βρίσκεται εκτεθειμένο στην δράση ενζύμων η οποία απελευθερώνει οξυγόνο (Morales and Przybylski, 2013). Στη διάρκεια της παραγωγής VOO αυτές οι οδοί ενεργοποιούνται με σχετικά υψηλό ρυθμό, σχηματίζοντας επιθυμητές πτητικές ενώσεις, όταν οι ελιές συνθλίβονται και συμπιέζονται με το λάδι. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8 το προφίλ των πτητικών ενώσεων ανέπαφων και κομμένων ελιών, είναι αρκετά διαφορετικό, με τις πτητικές ενώσεις να παράγονται από την δράση της λιποξυγενάσης και άλλων ενζύμων αμέσως μετά την κοπή των ελιών, εκθέτοντας έτσι τα περιεχόμενα των κυττάρων στο οξυγόνο.





**Σχήμα 2.8** Χρωματογράμματα πτητικών ενώσεων άθικτων (α) και κομμένων καρπών ελιάς (β) (Morales and Przybylski, 2013)

Από το Σχήμα 2.8 παρατηρούμε ότι η εξανάλη και η 1-εξανόλη υπάρχουν στην ολόκληρη ελιά. Όταν ο καρπός διαρραγεί αυτό που παρατηρούμε είναι μια αύξηση της Z-3-εξανάλης καθώς και της E-2-εξανάλης .

Το πτητικό προφίλ των κομμένων ελιών ( Σχήμα 2.8) έδειξε σημαντική αλλαγή λόγω της παραγωγής πτητικών ενώσεων (αλδεΐδες και αλκοόλες ) που προσφέρουν χαρακτηριστικές πράσινες γεύσεις, που προέρχονται από οξειδωτική αποδόμηση προϊόντων που σχηματίζονται από λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. Τα ένζυμα διάσπασης μπορεί να είναι φυσικά στα φρούτα /φυτά της ελιάς, ενώ τα μικροβιακά ένζυμα δεν μπορούν να αποκλειστούν ως πρόσθετος παράγοντας φθοράς (Morales and Przybylski, 2013).

Ο σχηματισμός των υδροϋπεροξειδίων σε μικρές ποσότητες, είναι ικανός για να επιταχύνει την οξείδωση στο τελικό λάδι. Οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες σχηματίζονται από την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων, προκαλούν νωρίτερα από το αναμενόμενο, σχηματισμό εκτός γεύσης και μείωση της σταθερότητας αποθήκευσης του λαδιού. Μη πτητικά προϊόντα οξείδωσης, ιδιαίτερα υδροξυλιωμένα και οξυλιωμένα λιπαρά οξέα, είναι υπεύθυνα για την πικρή γεύση των ελαίων. Αυτά τα οξέα προέρχονται, πιθανώς από την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων λινελαϊκού και λινολενικού οξέος που αποικοδομήθηκε από ενζυμική και μη ενζυμική οξείδωση (Bierman et al., 1980 ).

## **2.5 ΘΕΡΜΟΟΞΕΙΔΩΣΗ-ΤΗΓΑΝΙΣΜΑ**

Το τηγάνισμα με λίπος είναι μια από τις παλαιότερες και πιο δημοφιλείς μεθόδους παρασκευής τροφίμων. Το τηγάνισμα είναι μια διαδικασία βύθισης τροφίμων σε ζεστό λάδι, που διατηρείται σε θερμοκρασία 150-190 °C, όπου πραγματοποιείται ταυτόχρονη μεταφορά θερμότητας και μάζας μεταξύ του λαδιού και του τηγανιτού φαγητού. Τα τηγανιτά τρόφιμα είναι πολύ δημοφιλή στους καταναλωτές λόγω της εξαιρετικής γεύσης, του χρώματος και της τραγανής υφής (Boskou et al., 2006).

Το τηγάνισμα λειτουργεί ως μέσο μαγειρέματος και συμβάλλει στην υφή και την γεύση των τηγανισμένων τροφίμων. Η ποσότητα λαδιού που απορροφάται από τηγανιτά προϊόντα (Πίνακας 2.2 ) επηρεάζεται από τον χρόνο, την επιφάνεια των τροφίμων, την υγρασία στα τρόφιμα και τον τύπο λαδιού τηγανίσματος (Mehta and Swinburn, 2001).

Το απορροφημένο λάδι κατά το τηγάνισμα τείνει να συσσωρεύεται στην επιφάνεια της τηγανισμένης τροφής και αντικαθιστά το εξατμισμένο νερό μέσα στο προϊόν κατά την ψύξη και την αποστράγγιση (Moreira et al., 1999a).

**Πίνακας 2.2** Περιεκτικότητα σε λάδι τηγανιτών προϊόντων (Melta and Swinburn, 2001).

Τηγανιτό προϊόν	Λάδι % w/w
Πατατάκια	20 - 38
Chips καλαμποκιού	25 - 38
Τορτίγια chips	23 - 30
Ντόνατς	20 - 25
Τηγανιτές Πατάτες	6 – 20

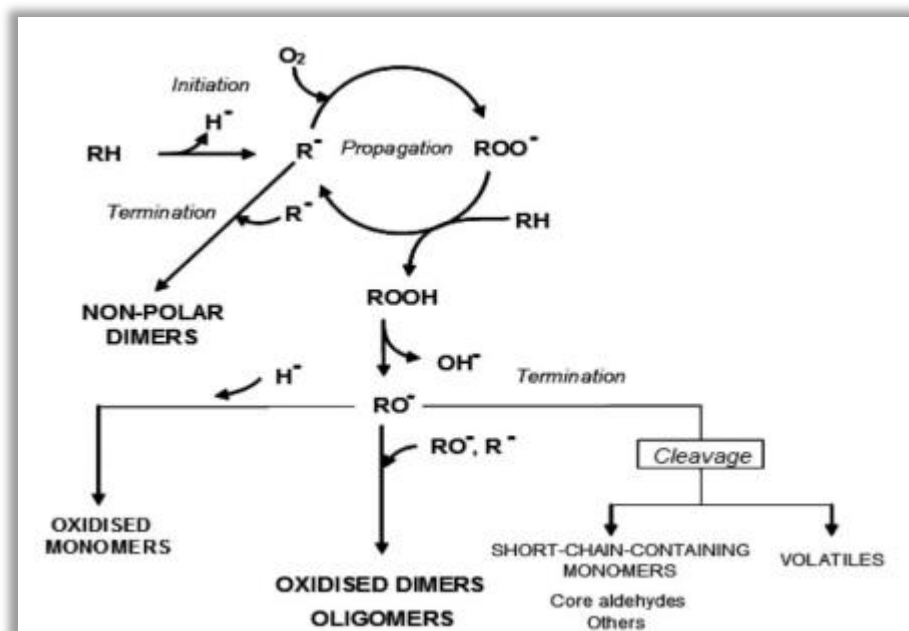
Τρεις τύποι οξείδωσης πραγματοποιούνται σε τηγανιτό λάδι: η αυτοοξείδωση, η θερμική οξείδωση και η φωτοοξείδωση (Nayak et al., 2015).

Η οξείδωση με συνδυασμό θερμοκρασίας και οξυγόνου ονομάζεται αυτό-οξείδωση. Καταλήγει σε δυσάρεστη οσμή και γεύση, λόγω της οξειδωτικής ή υδρολυτικής αποδόμησής του ( Shukla and Bhattacharya ,2004).

Η θερμική οξείδωση συμβαίνει λόγω της θέρμανσης σε θερμοκρασία περισσότερο από 180°C (Marinova et al. ,1992). Ο ρυθμός θερμικής οξείδωσης είναι ταχύτερος από αυτόν της αυτοοξείδωσης (Choe and Min, 2009).

Οι παραπάνω αναφερθείσες διαδικασίες οξείδωσης ακολουθούν έναν γνωστό μηχανισμό ελευθέρων ριζών (Σχήμα 2.9 ) ο οποίος περιλαμβάνει τρία βήματα: 1. Έναρξη της αλυσίδας, 2. Διάδοση και 3. Τερματισμό. Στην έναρξη της αλυσίδας οι αντιδράσεις προχωρούν από την θερμότητα, το φως, και τον μεταλλικό καταλύτη και σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες αλκυλίου (R<sup>•</sup>) (Halliwell and Gutteridge ,1984). Κατά την διάδοση, η ρίζα που σχηματίζεται στο πρώτο βήμα αντιδρά με οξυγόνο για να σχηματίσει την υπεροξυ- ρίζα (ROO<sup>•</sup>). Τα επίπεδα των υπεροξυ-ριζών είναι υψηλότερα από τις ελεύθερες ρίζες λιπιδίων ( Halliwell and Gutteridge ,1984). Στη συνέχεια δημιουργούνται (R<sup>•</sup> +ROOH). Τα υδροϋπεροξειδία είναι πολύ ασταθή και δημιουργούν ενώσεις βραχείας αλυσίδας με την διάσπαση του O-O, C-C, και C-O δεσμών γύρω από την ομάδα υπεροξειδίου (Nayak et al., 2015). Ο τερματισμός περιλαμβάνει τον σχηματισμό τελικών προϊόντων όπως μη πολικά διμερή οξει-

δωμένο μονομερές, ολιγομερές, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα (Nayak et al., 2015).



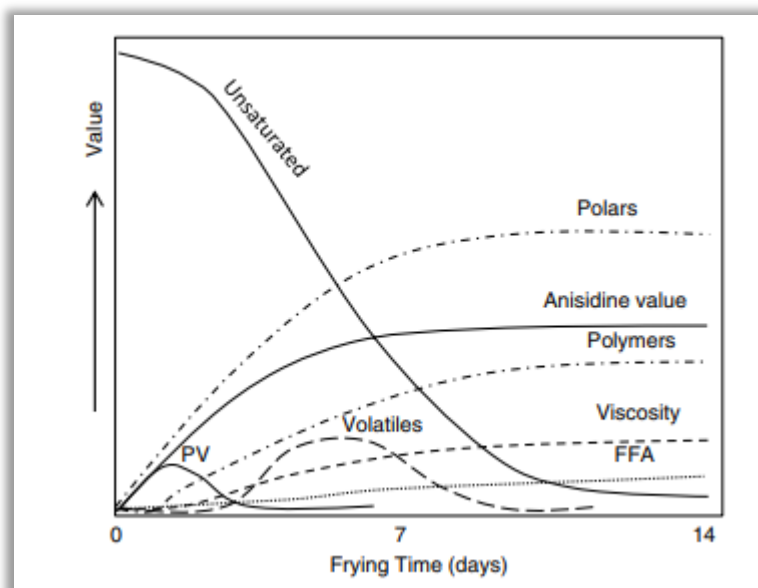
**Σχήμα 2.9** Στάδια οξείδωσης κατά την θέρμανση -τηγάνισμα του ελαιολάδου (Nayak et al., 2015).

Ένα μέρος των πτητικών ενώσεων εξατμίζονται στην ατμόσφαιρα δημιουργώντας συχνά ατμοσφαιρική ρύπανση (May et al., 1983).

Οι πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται από την αποικοδόμηση υφίστανται περαιτέρω χημικές αντιδράσεις με απόδοση ενώσεων με υψηλότερο μοριακό βάρος. Οι μη πτητικές ενώσεις είναι άλλες ομάδες συστατικών που σχηματίζονται κατά το τηγάνισμα και αλλάζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του λαδιού και των τηγανισμένων τροφίμων. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στις λιπαρές ουσίες κατά το τηγάνισμα μειώνουν την περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και ενδογενή δευτερεύοντα συστατικά όπως φαινολικά και αντιοξειδωτικά στο λάδι (Allouche et al., 2007).

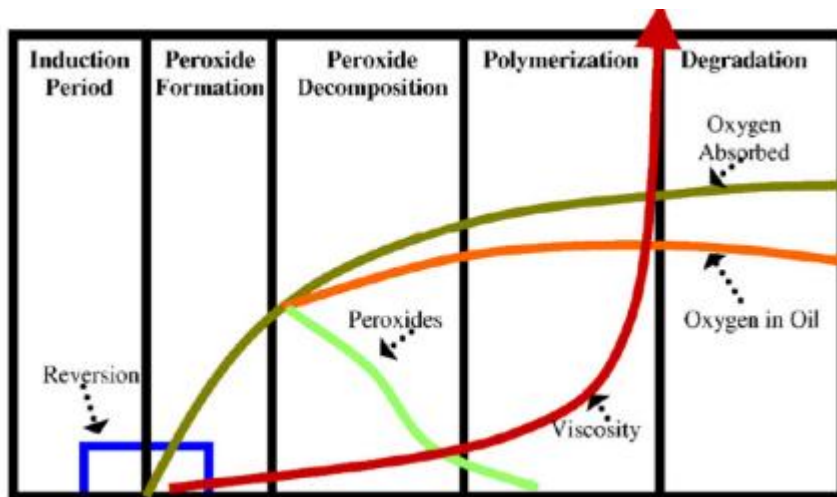
Οι Wu and Chen (1992), παρατήρησαν ότι όταν προστίθεται νερό στο σύστημα τηγανίσματος, η ποσότητα των πτητικών ενώσεων μειώνεται σημαντικά. Η εμφάνιση ή η απώλεια πτητικών ενώσεων στο τηγάνισμα οφείλεται στον συνδυασμό εξάτμισης –αποσύνθεσης και της αντίδρασης πτητικών ενώσεων με άλλα συστατικά των τροφίμων (Nawar, 1985).

Ως συνέπεια των χημικών αλλαγών, οι ακόλουθες παράμετροι αυξάνουν την τιμή τους: αφρισμός, χρώμα, ιξώδες, πυκνότητα, ειδικό βάρος, θερμότητα, περιεκτικότητα σε FFAs, και ολιγομερείς ενώσεις. (Σχήμα 2.10).



**Σχήμα 2.10** Αποικοδόμηση λιπαρών οξέων και σχηματισμός προϊόντων κατά το τηγάνισμα (Morales and Przybylski, 2013).

Η οξείδωση είναι η πιο δυσμενής αλλαγή που εμφανίζεται στο τηγανιτό λάδι και αποτελείται από 5 στάδια: 1.περίοδος επαγωγής, 2.σχηματισμός υπεροξειδίου, 3.αποσύνθεση υπεροξειδίου, 4.πολυμερισμός, και 5.αποικοδόμηση (Σχήμα 2.11). Η φωτοοξείδωση εμφανίζεται όταν ένα triplet oxygen μετατρέπεται σε singlet oxygen από την έκθεσή του στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το singlet oxygen αλληλεπιδρά με ακόρεστα λιπαρά οξέα για να σχηματίσει υδροϋπεροξείδιο και έτσι ξεκινά η αντίδραση της αυτοοξείδωσης (Nayak et al., 2015).



**Σχήμα 2.11.** Τα στάδια της οξείδωσης (Nayak et al., 2015).

Φυσικές παράμετροι, οι οποίες επιλέγονται συνήθως για συγκεκριμένες λειτουργίες όπως: θερμοκρασία, χρόνος, τύπος και φρεσκάδα τηγανίσματος, αντιοξειδωτικά, προσβασιμότητα οξυγόνου, τα ενδογενή συστατικά του λαδιού και των τροφίμων, καθώς και ο σχεδιασμός μιας φριτέζας, επηρεάζουν σημαντικά τον ρυθμό οξείδωσης, υδρόλυσης και ολιγομερισμού που συμβαίνει κατά την διάρκεια του τηγανίσματος (Morales and Przybylski, 2013).

Σύμφωνα με την μοριακή δομή των τριγλυκεριδίων, θα πρέπει να σχηματίζονται μηδαμινές υπεροξειδικές ρίζες και τοξικά παράγωγα, όταν το τηγάνισμα γίνεται με λιπαρές ουσίες πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν η λιπαρή ουσία είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτό αποδεικνύει περίτρανα ότι είναι άστοχη η προτίμηση των σπορελαίων (αραβοσιτέλαιου, σογιέλαιου, αραχιδέλαιου) για το τηγάνισμα της πατάτας, των αυγών, του κρέατος, των ψαριών, ενώ αντίθετα είναι εύστοχη η χρήση του ελαιολάδου (Μπαλατσούρας, 1997).

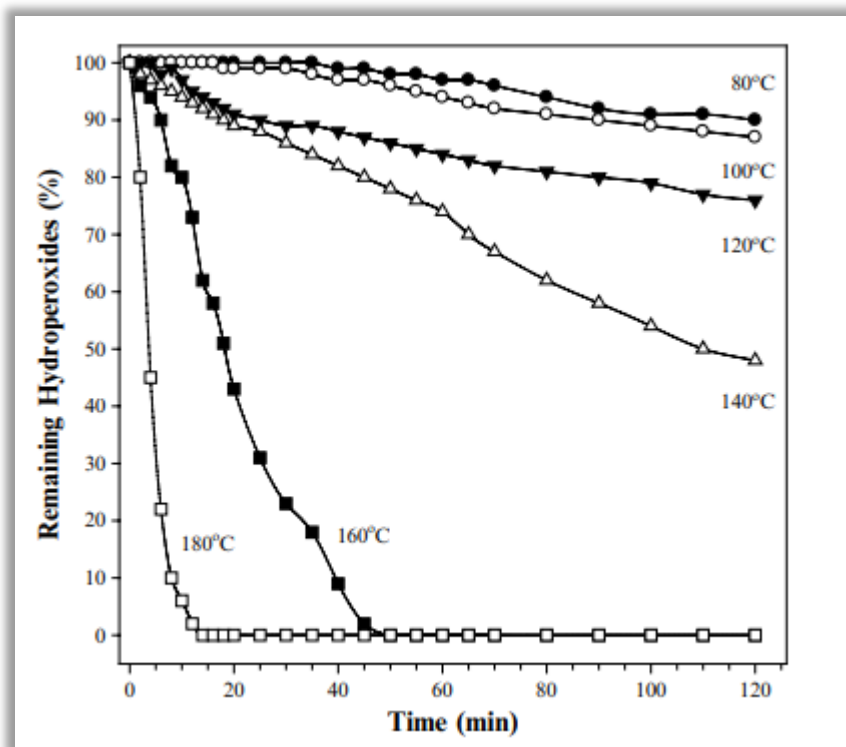
Το ελαιόλαδο επειδή είναι πλούσιο σε μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (ελαϊκό) και φτωχό σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, καθώς επίσης είναι και πλούσιο σε φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες (ιδιαίτερα το παρθένο) ενδείκνυται για περισσότερα συνεχόμενα τηγανίσματα από ότι τα σπορέλαια (Μπαλατσούρας, 1997).

Ο Varela (1980) αξιολόγησε το ελαιόλαδο συγκριτικά με άλλες λιπαρές ουσίες, ως προς την καταλληλότητά του για τηγάνισμα. Το συμπέρασμα των πειραμάτων αυτών ήταν ότι το ελαιόλαδο σχημάτιζε μια λεπτή κρούστα στο εξωτερικό των τηγανιτών φαγητών με αυξημένη λιποπεριεκτικότητα ενώ οι άλλες λιπαρές ουσίες σχημάτιζαν παχύτερη κρούστα πλην όμως πιο φτωχή σε λιπαρή ουσία.

Το λάδι πρέπει να σχηματίσει ελεύθερες ρίζες για να αντιδράσει με οξυγόνο κατά την διάρκεια της οξειδωτικής αντίδρασης, και το πιο αδύναμο σημείο στο μόριο είναι το μεθυλένιο που βρίσκεται μεταξύ διπλών δεσμών. Η ενέργεια που απαιτείται για να σπάσει ο δεσμός άνθρακα –υδρογόνο στον άνθρακα 11 του λινελαϊκού οξέος είναι 50 Kcal/mole, ενώ ο δεσμός άνθρακα-υδρογόνο σε κορεσμένους άνθρακες χωρίς γειτονικό δεσμό είναι περίπου 100 Kcal/mole (Min and Boff, 2002).

Οι διαφορετικοί δεσμοί υδρογονάνθρακα των λιπαρών οξέων, εξηγούν τις διαφορές στα ποσοστά οξείδωσης του στεατικού, ελαϊκού, λινολενικού και λινελαϊκού οξέος κατά την θερμική οξείδωση ή την αυτοοξείδωση. Η θερμότητα, το φως, τα μέταλλα και τα δραστικά είδη οξυγόνου διευκολύνουν τον σχηματισμό ριζών στα έλαια, καθώς τα  $Fe^{+3}$  και  $Cu^{+2}$  απομακρύνουν τα πρωτόνια υδρογόνου από έλαια για να σχηματιστούν ρίζες αλκυλίου με μηχανισμούς μείωσης της οξείδωσης με μέταλλα ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Morales and Przybylski, 2013). Οι ρίζες αλκυλίου που σχηματίζονται είναι πολύ δραστικές και αλληλεπιδρούν με άλλα αλκοξυ και υπεροξυ –ρίζες για να σχηματίσουν μια ποικιλία πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων (Morales and .Przybylski, 2013).

Ο δεσμός οξυγόνου –οξυγόνου που σχηματίζεται σε υδροϋπεροξειδία είναι ασθενής και απαιτεί μόνο 44Kcal/mole ενέργειας για να σπάσει (Morales and Przybylski, 2013).



**Σχήμα 2.12** Σταθερότητα των υδροϋπεροξειδίων σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Morales and Przybylski, 2013).

Τα υδροϋπεροξειδία είναι γενικά ασταθή και κατά την διάρκεια του τηγανίσματος αποσυντίθενται εύκολα. Ενώ στους 80 °C παραμένουν τα υδροϋπεροξειδία σε υψηλές τιμές ακόμα και για 120 min, ανεβαίνοντας η θερμοκρασία στους 160°C σχεδόν μηδενίζονται μετά από 45 min (Σχήμα 2.12).

Τα υδροϋπεροξειδία αποσυντίθενται σε αλκοξυρίζες και υδροξυρίζες με ομόλυση του δεσμού υπεροξειδίου (Morales and Przybylski, 2013).

## 2.6 .ΟΛΙΓΟΜΕΡΙΣΜΟΣ

Τα κύρια προϊόντα αποσύνθεσης κατά την διαδικασία του τηγανίσματος είναι μη πτητικά πολικά και μη πολικές ενώσεις, κυρίως ολιγομερή διαφόρων ριζών, και δευτερεύοντα συστατικά όπως στερόλες, τοκοφερόλες και φαινόλες (Dobarganes et al., 2000).

Τα διμερή και τα πολυμερή είναι μεγάλα μόρια και σχηματίζονται σύμφωνα με τους εξής δεσμούς : -C-C-, -C-O-C-, -C-O-O-C- (Kim et al.,1999, Rudzinska et al., 2009). Υδροξυ και κετο -διμερή λινελαϊκού, συμπεριλαμβανομένων των διμερών ελαϊκού οξέος βρέθηκαν στο σογιέλαιο κατά το τηγάνισμα (Cristopoulou and Perkins, 1989).



Οι Rudzinska et al. (2009), παρατήρησαν ότι οι φυτοστερόλες κατά την διάρκεια της θερμοξειδωτικής αποδόμησης μεταμορφώνονται κυρίως σε ολιγομερή με μικρές ποσότητες πτητικών και οξειδωμένων προϊόντων.

Ο ολιγομερισμός κατά το τηγάνισμα ακολουθεί τον συνηθισμένο μηχανισμό οξείδωσης. Λάδια πλούσια σε λινελαϊκό και λινολενικό οξύ σχηματίζουν ολιγομερή πιο εύκολα κατά την διάρκεια του τηγανίσματος από ότι έλαια υψηλά σε ελαϊκό οξύ (Bastida and Sanchez-Muniz, 2001). Τα ολιγομερή που σχηματίζονται κατά το τηγάνισμα είναι πλούσια σε οξυγόνο και συνήθως έχουν γέφυρες αιθέρα ή υπεροξειδίου (Morales and Przybylski, 2013).

Οι Yoon et al. (1988), ανέφεραν ότι τα πλούσια σε οξυγόνο ολιγομερή επιταχύνουν την οξείδωση του λαδιού και αυξάνουν σημαντικά το ιξώδες του (Tseng et al., 1996). Επιπλέον αυτές οι ενώσεις μειώνουν την μεταφορά θερμότητας αυξάνουν τον αερισμό, διεγείρουν την απορρόφηση λαδιού από τα τρόφιμα και προκαλούν αλλαγές στο χρώμα των τηγανισμένων τροφίμων. Τα ολιγομερή είναι πολύ συζευγμένες ενώσεις που σχηματίζουν ένα καφέ ρητινώδες υπόλειμμα στα τοιχώματα της φριτέζας στην περιοχή επαφής μεταξύ λαδιού και αέρα (Moreira et al., 1999).

### **2.6.1. Αποικοδόμηση των συστατικών του λαδιού**

Οι υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια του τηγανίσματος, διεγείρουν την αποδόμηση των λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα των ακόρεστων, σε μια ποικιλία πτητικών και μη πτητικών ενώσεων. Μεταξύ των συστατικών που σχηματίζονται είναι μια ποικιλία ενώσεων που μπορεί να είναι τοξικές σε διαφορετικές ποσότητες (Morales and Przybylski, 2013). Οι Uriarte and Guillen (2010), παρατήρησαν τον σχηματισμό alkylbenzenes, προϊόντων θερμοξειδωτικής αποικοδόμησης λινολενικού και λινολεϊκού οξέος. Αυτά τα συστατικά με τα gamma carbonyls είναι οι πρωταρχικοί μολυσματικοί παράγοντες στις εγκαταστάσεις τηγανίσματος προκαλώντας συνεχή έκθεση των εργαζομένων σε κίνδυνο. Πολλά δευτερεύοντα συστατικά των ελαίων αποικοδομούνται με παρόμοιο ρυθμό με τα λιπαρά οξέα κατά την διάρκεια του τηγανίσματος. Οι τοκοφερόλες, οι στερόλες και οι φαινόλες, εμπλέκονται στην οξειδωτική αποδόμηση και σχηματίζουν ενδιάμεσα ρίζες, οι οποίες αλληλεπιδρούν περαιτέρω για να παράγουν συχνά ολιγομερή. Ο Andrikopoulos et al. (2002), παρατήρησε ότι το 85 – 90% των τοκοφερόλων εξαφανίστηκε κατά την διάρκεια πολλαπλών τηγανισμάτων στο ελαιόλαδο. Άλλα τυπικά φαινολικά ελαιολάδου ήταν

πιο ανθεκτικά στην αποδόμηση σε σύγκριση με τις τοκοφερόλες. Ωστόσο, μετά από τηγάνισμα πολλαπλών παρτίδων, απομένει μόνο το 20-30%.

Οι Rastrelli et al. (2002), ανέφεραν ότι κατά την αποθήκευση, οι τοκοφερόλες αποικοδομήθηκαν με ταχύτερο ρυθμό από ότι άλλες φαινολικές ουσίες στο ελαιόλαδο. Ωστόσο κατά την διάρκεια του τηγανίσματος, οι τοκοφερόλες και τα φαινολικά εξαφανίστηκαν με τον ίδιο ρυθμό, δείχνοντας παρόμοια αντιοξειδωτικά δυναμικά.

Υδροξυτυροσόλη, ελευροπαΐνη και παράγωγα του ελεανολικού οξέος αποικοδομούνται με ρυθμό παρόμοιο με αυτό των τοκοφερολών κατά την διάρκεια του τηγανίσματος των τροφίμων (Brenes et al., 2002). Το μεγαλύτερο μέρος της αποικοδόμησης των φαινολικών μπορεί να συνδεθεί με τον σχηματισμό ολιγομερών με αντιδράσεις μεταξύ των ίδιων φαινολικών μορίων ή μεταξύ διαφορετικών ριζικών μορίων. Τα πιο επιρρεπή στο σχηματισμό ολιγομερών είναι τα φαινολικά τύπου κινόνης (Robards et al., 1999). Η μελέτη της επίδραση της θερμικής οξείδωσης στα δευτερεύοντα συστατικά του VOO καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η αποικοδόμηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, με την διαδικασία της θερμικής οξείδωσης σχετίζεται με την μειωμένη συγκέντρωση ο – διφαινολών και α – τοκοφερόλης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια φαινολική ένωση, όπως τυροσόλη, λιγνίνες και οξειδωμένα παράγωγα σεκοιριδοειδών, παρέμειναν στο λάδι ως επί το πλείστον σε αμετάβλητη μορφή, ακόμη και όταν το επίπεδο των πολικών συστατικών υπερβαίνει το 25%, ενώ η α – τοκοφερόλη συνήθως, μετατρέπεται πλήρως σε μια οξειδωμένη μορφή (Morales and Przybylski, 2013).

Χρωμοφυλλικές χρωστικές ουσίες, όπως pheophorbides και pyropheophytins (πυροφαιοφυτίνες) είναι ανθεκτικά στην θερμοοξειδωτική αποδόμηση (Tena, 2010).

## 2.7 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

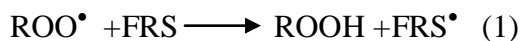
Η χρήση αντιοξειδωτικών ως αναστολέων της αυτοοξείδωσης των ελεύθερων ριζών είναι μείζονος σημασίας για την διατήρηση των πολυακόρεστων λιπιδίων από οξειδωτική φθορά (Frankel, 2005).

Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να είναι οποιαδήποτε ουσία που καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση ενός υποστρώματος. Υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί για αντιοξειδωτική δράση. Γενικά τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο τάξεις:

- A. Πρωτογενή (chain braking) αντιοξειδωτικά και
- B. Δευτερογενή (preventative) αντιοξειδωτικά (Antolovich et al., 2002).

Ορισμένα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να έχουν πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτική ιδιότητα. Κοινό γνώρισμα για τα κύρια αντιοξειδωτικά είναι η ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και επομένως να αναστέλλουν την έναρξη, την διάδοση και την αντίδραση β-σπάσης (Semb T.N., 2012).

Όπως περιγράφεται από τον Liebler (1992), οι απενεργοποιητές ελεύθερων ριζών (FRS) αλληλεπιδρούν με τις υπεροξειδικές ρίζες όπως περιγράφεται στον ακόλουθο μηχανισμό



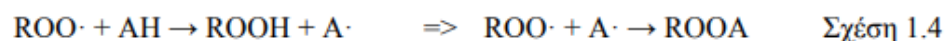
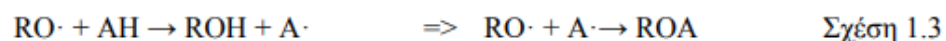
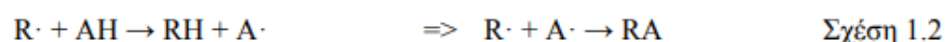
Με τον ίδιο τρόπο οι ρίζες FRS και αλκοξυλίου παρεμβαίνουν στον ακόλουθο μηχανισμό



Το ελαιόλαδο, το οποίο είναι πολύ σταθερό στην οξείδωση (Guillen and Cabo, 2002) περιέχει φυσικά αντιοξειδωτικά όπως: φαινόλες, τοκοφερόλες και καροτενοειδή .

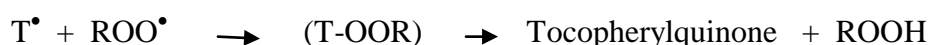
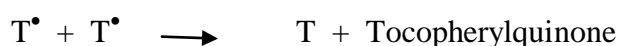
Οι φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο περιλαμβάνουν: τυροσόλη (4-υδροξυφαινυλαιθανόλη), υδροξυτυροσόλη (3,4- διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη), υδροξυβενζοϊκά οξέα, ελαιοροπίνη, καφεϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης (Tsimidou et al., 1992). Κατά τους Keceli and Gordon (2002), η περιεκτικότητα τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης, και φαινολικών οξέων είναι 34,9 37,8 και 36,3 ppm αντίστοιχα (το ελαιόλαδο ήταν εμπορίου χωρίς να αναφέρεται η ποικιλία). Οι φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο δρουν κυρίως ως αντιοξειδωτικά στο αρχικό στάδιο της οξείδωσης απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες και τα χηλικά μέταλλα (Chimi et al., 1991). Η υδροξυτυροσόλη έχει την πιο αποτελεσματική δράση στο ελαιόλαδο (Baldioli et al., 1996). Μεταξύ των φαινολικών ενώσεων, οι ο-διφαινόλες όπως το καφεϊκό οξύ καθίστανται αποτελεσματικές στην αναστολή των εξαρτώμενων από σίδηρο οξειδωτικών αντιδράσεων (Keceli and Gordon, 2002). Ωστόσο η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, τα βανιλικά οξέα και το π-κουμαρικό οξύ δεν οξειδώνονται από τα ιόντα σιδήρου (Choe and Min, 2006). Κατά τον Velasco and Dobarganes (2002), η αυτοοξείδωση του

ελαιολάδου είναι πιο ήπια όταν η α-τοκοφερόλη και οι φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιούνται μαζί απ' ότι όταν χρησιμοποιούνται χωριστά .



*Σχέσεις 1.2-1.4: Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με φαινολικές ενώσεις, οι οποίες τερματίζονται όταν ενωθούν δύο ελεύθερες ρίζες (Roberfroid & Calderon, 1990)*

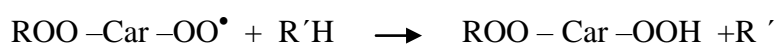
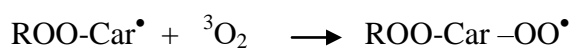
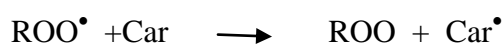
Στο παρθένο ελαιόλαδο η συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης μειώθηκε με τον χρόνο αποθήκευσης του λαδιού στο σκοτάδι (Deiana et al., 2002). Κατά τους Morello et al. (2004), δεν υπάρχει τοκοφερόλη σε ελαιόλαδο που αποθηκεύεται σε σκοτεινή θερμοκρασία δωματίου για 12 μήνες. Οι τοκοφερόλες ανταγωνίζονται τα ακόρεστα υπεροξυ-λιπίδια. Ένα μόριο τοκοφερόλης μπορεί να προστατεύσει 103 έως 108 πολυακόρεστα μόρια λιπαρών οξέων σε χαμηλή τιμή υπεροξειδίου (Kamal – Elden and Appelqvist, 1996). Οι ρίζες τοκοφερόξυ είναι πιο σταθερές από τις ρίζες λιπιδίων λόγω δομών συντονισμού. Αυτό επιβραδύνει τελικά τον ρυθμό οξειδωσης του λαδιού στο στάδιο διάδοσης της αυτοοξειδωσης ( Choe and Min, 2006). Οι ρίζες τοκοφερόξυ μπορούν να αντιδράσουν με άλλες ενώσεις ή μεταξύ τους ανάλογα με τους ρυθμούς οξειδωσης των λιπιδίων. Σε υψηλά ποσοστά οξειδωσης, οι ρίζες τοκοφερόξυ ενδέχεται να αντιδρούν με ρίζες υπεροξυ-λιπιδίων και τότε παράγονται σύμπλοκα τοκοφερόλης –λιπιδίων ανά οξύ (T-OOR ) τα οποία μπορούν να υδρολυθούν σε τοκοφερουλοκινόνη και υδροϋπεροξειδίο λιπιδίων (Liebler et al., 1990).



Η αποτελεσματικότητα των τοκοφερολών ως αντιοξειδωτικών εξαρτάται από τα ισομερή και την συγκέντρωση των τοκοφερολών. Η δραστικότητα της τοκοφερόλης στις ελεύθερες ρίζες είναι υψηλότερη στην δ-τοκοφερόλη και ακολουθούν η γ, β, και α-τοκοφερόλη. Η τιμή κατωφλίου για την α-τοκοφερόλη, ως προ-οξειδωτικό, στην οξείδωση παρθένου ελαιολάδου είναι 60 έως 70 ppm (Deiana et al., 2002). Η προ-οξειδωτική δραστηριότητα της α-τοκοφερόλης, μειώνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, ακόμη και σε υψηλή συγκέντρωσή της (Marinova and Yanishlieva, 1992).

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα τετρατερπενοειδών που αποτελείται από ισοπρενοειδείς μονάδες. Οι διπλοί δεσμοί στα καροτενοειδή είναι συζευγμένες μορφές και συνήθως είναι όλες trans μορφές. Το β-καροτένιο είναι ένα από τα περισσότερο γνωστά καροτενοειδή. Τα μη ραφινρισμένα έλαια περιέχουν β-καροτένιο. Το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει 1,0 έως 2,7 ppm β-καροτένιου καθώς και 0,9 έως 2,3 ppm λουτεΐνη (Psomiadou and Tsimidou, 2002). Οι Fakourelis et al. (1987), ανέφεραν ότι η οξείδωση του ελαιολάδου που περιείχε μόνο β-καροτένιο κάτω από το φως στους 25°C μειώθηκε όταν το μήκος φωτός κυμάνθηκε μεταξύ 400-500 nm.

Μια ρίζα υπεροξυ-λιπιδίου μπορεί να προστεθεί σε ρίζα β-καροτένιο και προπαράγωγο υπεροξυ-καροτίνης (ROO-Car<sup>•</sup>) ειδικά σε υψηλότερα από 150 mmHg οξυγόνου (Burton and Ingold, 1984). Η καροτεν-υπεροξυ ρίζα αντιδρά με <sup>3</sup>O<sub>2</sub> και έπειτα με μόρια λιπιδίων και παράγει ρίζες λιπιδίων αλκυλίου, οι οποίες διαδίδουν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης λιπιδίων (Iannone et al., 1998).



Επειδή οι τοκοφερόλες είναι τα πιο συνηθισμένα αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο, έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιοξειδωτικών. Η α-τοκοφερόλη έδειξε συνεργιστικά αποτελέσματα με το β-καροτένιο για μείωση της αυτοοξείδωσης (Palozza and Krinsky, 1992).

## 2.8 ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΟΠΙΔΙΩΝ

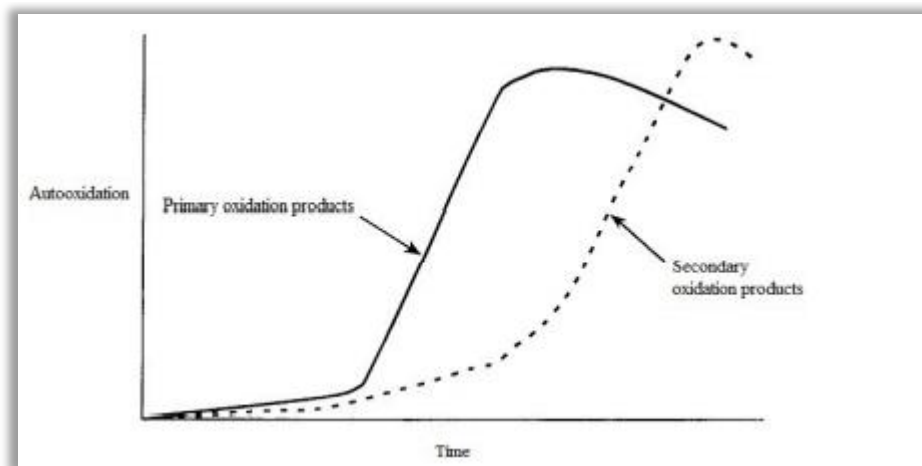
Στην οξείδωση των λιπιδίων η διαδικασία οξείδωσης, εμφανίζει γενικά μια φάση υστέρησης ακολουθούμενη από μια εκθετική αύξηση του ρυθμού οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της φάσης καθυστέρησης, η οξείδωση είναι σχετικά αργή και σταθεροποιημένη. Η αύξηση της διάρκειας αυτής της φάσης είναι σημαντική γιατί όσο μειώνεται η θερμοκρασία, μειώνεται η συγκέντρωση του οξυγόνου, μειώνεται η δράση των προ-οξειδωτικών. Όταν ισχύουν τα προηγούμενα δεν σχηματίζονται προϊόντα αποσύνθεσης και ως εκ τούτου δεν υπάρχει τάση οξείδωσης σε αυτή την φάση ( Fennema et al., 2007, Allen and Hamilton, 1994).

Μόλις επιτευχθεί η εκθετική φάση, τα προϊόντα αποσύνθεσης λιπαρών οξέων σχηματίζονται γρήγορα. Τα υδροϋπεροξειδία είναι τα κύρια πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης, που συσσωρεύονται κατά την διάρκεια του σταδίου έναρξης και του πολλαπλασιασμού της διαδικασίας οξείδωσης (Fennema et al., 2007b).

Ο χρόνος επίτευξης του μέγιστου επιπέδου των υδροϋπεροξειδίων, στην διαδικασία οξείδωσης, σχετίζεται με το βαθμό κορεσμού των λιπιδίων και εμφανίζεται νωρίτερα σε πολυακόρεστα λιπίδια επειδή τα υδροϋπεροξειδιά τους αποσυντίθενται πιο εύκολα. Αφού επιτευχθεί το μέγιστο επίπεδο των υδροϋπεροξειδίων, θεωρητικά, στην συνέχεια παρατηρείται πτώση των υδροϋπεροξειδίων γιατί αυτά αποσυντίθενται σε μια ποικιλία προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης (Frankel, 1987).

Η πτώση των υδροϋπεροξειδίων παρατηρείται όταν ο ρυθμός αποσύνθεσης σε δευτερεύοντα προϊόντα υπερβαίνει τον ρυθμό σχηματισμού (Shadili and Wanasundara, 2002).

Θεωρητικά αυτό σημαίνει ότι τα πρωταρχικά προϊόντα οξείδωσης θα κυριαρχήσουν στο αρχικό στάδιο και τα δευτερεύοντα προϊόντα οξείδωσης θα κυριαρχήσουν σε μεταγενέστερα στάδια της διαδικασίας οξείδωσης. Αυτό απεικονίζεται στο Σχήμα 2.13 (Frankel, 1987).



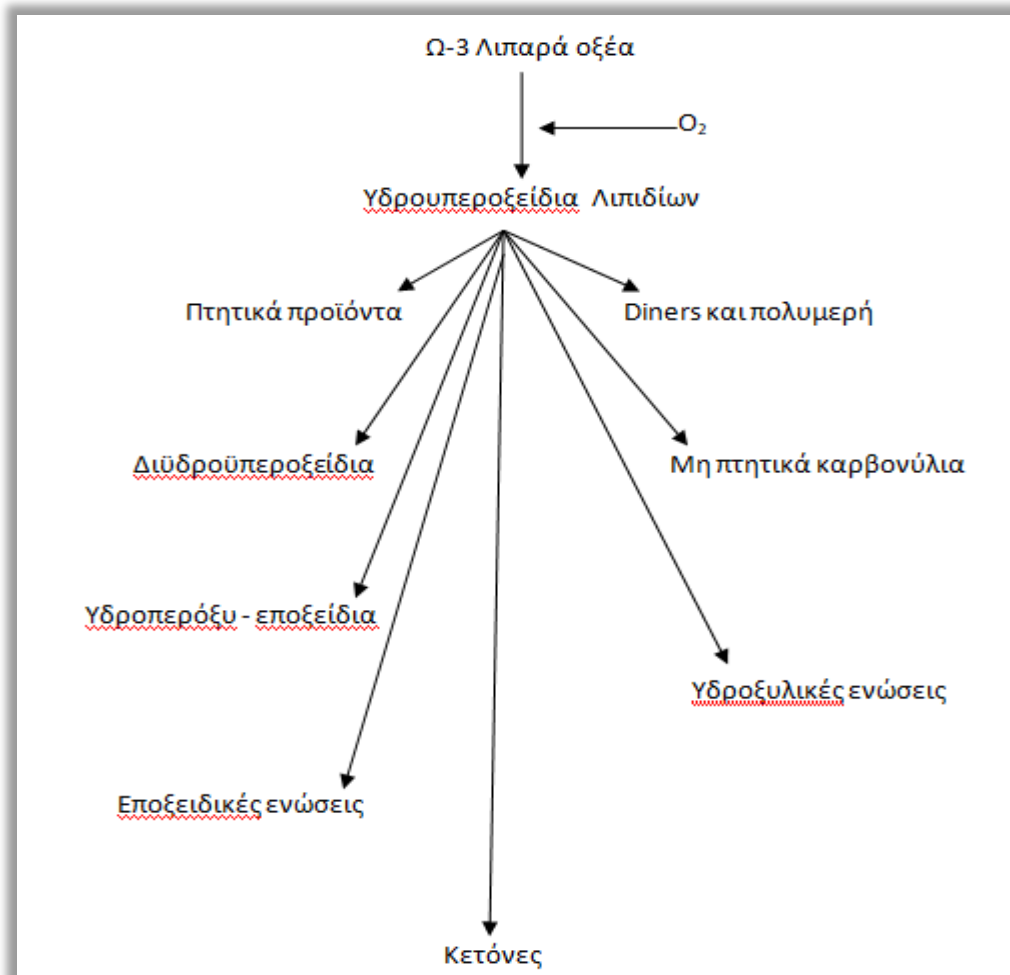
**Σχήμα 2.13** Θεωρητική ανάπτυξη πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης σε συνάρτηση του χρόνου στην οξείδωση των λιπιδίων (Frankel, 1987).

Το υδροϋπεροξειδίο αρχικά θα αποσυντεθεί σε μια ρίζα αλκοξυλίου ( $RO^{\bullet}$ ). Η ακόλουθη διαδρομή θα έχει πολλές εναλλακτικές διαδρομές με αποτέλεσμα μεγάλο αριθμό πιθανών προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης (Fennema et al., 2007c).

Ο σχηματισμός της ρίζας αλκοξυλίου υψηλής ενέργειας είναι το σημείο εκκίνησης για την διάσπαση της αλειφατικής αλυσίδας σε λιπαρά οξέα, γνωστή ως αντίδραση β-σπάσης (Frankel, 1998).

Η διάσπαση της αλειφατικής αλυσίδας παράγει αλδεϋδες εκτός από μια ρίζα στην αλειφατική αλυσίδα. Αυτή η ρίζα (π.χ ρίζα αλκυλίου) μπορεί θεωρητικά να αντιδράσει περαιτέρω με μια ρίζα υδρογόνου για να σχηματίσει υδρογονάνθρακα, μια ρίζα υδροξυλίου για να σχηματίσει μια αλκοόλη ή οξυγόνο για την παραγωγή ενός υδροϋπεροξειδίου. Η ιοντική αλκοξυλική ρίζα μπορεί να μετατραπεί σε κετόνη χάνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα εποξειδίο μέσω σύνδεσης με γειτονικούς άνθρακες. Επιπλέον ορισμένα από τα προϊόντα αποσύνθεσης πιθανότατα περιέχουν ανέπαφα συστήματα πενταδιενίου. Η παρουσία αυτών των διπλών δεσμών μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον σχηματισμό προϊόντων αποσύνθεσης λόγω περαιτέρω αφαίρεσης υδρογόνου (Fennema et al., 2007b).

Το Σχήμα 2.14 απεικονίζει κάποια πιθανή δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης τα οποία δημιουργούνται από την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων:



**Σχήμα 2.14** Σχηματισμός ορισμένων πιθανών δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης από την αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων (Vera Kristinova, 2012 μη δημοσιευμένη εργασία).

Τα πολυάριθμα τελικά προϊόντα της αντίδρασης της β-σπάσης είναι αποτέλεσμα των υδροϋπεροξειδίων που μπορούν να σχηματιστούν σε πολλές θέσεις στο λιπαρό οξύ, διαφορετικών στο βαθμό κορεσμού και τον τύπο του λιπαρού οξέος (Fennema et al., 2007a).

Τα προϊόντα δευτερογενούς οξείδωσης που σχηματίζονται καθιστούν δύσκολη την εύρεση ακριβών μεθόδων για μετρήσεις προϊόντων δευτερογενούς οξείδωσης. Τα προϊόντα της αντίδρασης β-σπάσης είναι χαμηλού μοριακού βάρους πτητικές ενώσεις που προκαλούν οξείδωση (Frankel, 1984).

Οι συνδυασμοί διαφορετικών ενώσεων αποσύνθεσης δίνουν διαφορετικές αισθητικές ιδιότητες (Fennema et al., 2007a).



Ο βαθμός και ο ρυθμός της οξείδωσης των λιπιδίων επηρεάζεται από την σύνθεση λιπαρών οξέων, την συγκέντρωση οξυγόνου, την θερμοκρασία, την επιφάνεια, το νερό και την απουσία αντι-και προ-οξειδωτικών (Fennema et al., 2007b).

Η φωτοοξείδωση γενικά δεν προκαλεί ανησυχία, καθώς η απορρόφηση φωτός δεν μπορεί να επηρεάσει τα λιπίδια εκτός εάν εκτίθενται αυτά σε άμεσο ηλιακό φως ή φως φθορισμού χωρίς κατάλληλη προστασία (List et al., 2005).

Η ενζυμική οξείδωση προκαλεί επίσης λιγότερη προσοχή στα έλαια, επειδή οι λιποξυγενάσες απενεργοποιούνται με θέρμανση κατά την διάρκεια διύλισης (Fennema et al., 2007b).

Με βάση αυτά τα γεγονότα η αυτοοξείδωση είναι το κύριο μέλημα της οξείδωσης σε εξευγενισμένα έλαια (Semb, 2012).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

Η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων, πρωτογενών προϊόντων τα οποία είναι πολύ ασταθή και με αποσύνθεση, σχηματίζονται δευτερεύοντα προϊόντα .

Αυτά τα δευτερεύοντα προϊόντα μπορεί να περιλαμβάνουν εκατοντάδες μεμονωμένα συστατικά που επηρεάζουν δυσμενώς την γεύση του ελαιολάδου. Οι αναλυτικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για την μέτρηση του βαθμού της οξείδωσης βασίζονται σε προϊόντα που σχηματίζονται ή εμπλέκονται σε αυτή την επιδείνωση. Οι μέθοδοι που περιγράφονται πιο κάτω μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα μετρά το οξυγόνο (ως κύρια αιτία οξείδωσης) και τα πρωτογενή προϊόντα, ενώ η δεύτερη μετρά δευτερογενή προϊόντα που σχηματίζονται από την απόσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων (Morales and. Przybylski, 2013).

#### **3.1.ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ**

##### **3.1.1 Κατανάλωση οξυγόνου**

Το οξυγόνο είναι μια από τις κύριες αιτίες της οξείδωσης που μπορεί να μετρηθεί για την αξιολόγηση της σταθερότητας του ελαιολάδου. Η κατανάλωση οξυγόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί με αέρια χρωματογραφία (GC) με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας ή με μέτρηση της πίεσης όταν καταναλώνεται οξυγόνο. Η GC μετρά άμεσα την ποσότητα οξυγόνου που υπάρχει πάνω από το αποθηκευμένο λάδι και μπορεί να εκτελεστεί υπό επιταχυνόμενες συνθήκες με πλήρη έλεγχο των παραμέτρων. Η μεταβολή της πίεσης αξιολογείται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες οι οποίες μπορούν να μετρήσουν άμεσα την κατανάλωση οξυγόνου. Και οι δυο μέθοδοι είναι σχετικά απλές και αξιολογούν άμεσα την ποσότητα οξυγόνου που χρησιμοποιείται για την οξείδωση του συγκεκριμένου λαδιού (Morales and Przybylski, 2013).

##### **3.1.2.Συζυγή Διένια και Τριένια**

Κατά τον σχηματισμό υπεροξειδίων και υδροϋπεροξειδίων μια μετατόπιση του διπλού δεσμού λαμβάνει χώρα μετατρέποντας έτσι την κανονική διακεκομμένη διαμόρφωση μεθυλενίου σε συζευγμένες μορφές. Τα συζυγή διένια (CDs) δείχνουν

απορρόφηση στα 232nm και τα τριένια στα 268nm (Noor and Augustin, 1984). Με μέτρηση CDs, η οξειδωτική κατάσταση εκτιμάται έμμεσα.

Ο προσδιορισμός των σταθερών απορρόφησης  $K_{232}$  και  $K_{268}$  καθώς και της σχέσης  $\Delta K$  αποσκοπεί στον έλεγχο της ποιότητας και της γνησιότητας του ελαιολάδου. Το ΔΣΕ και η Ε.Ε έχουν καθιερώσει για την κάθε κατηγορία ελαιολάδου κάποιες μέγιστες τιμές, για αυτές τις σταθερές, οι οποίες πρέπει να τηρούνται αυστηρά (Κυριτσάκης, 2007).

Έτσι λοιπόν τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (συζυγή διένια), εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 232nm ενώ σε μήκος κύματος 268nm απορροφούν ορισμένα προϊόντα διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων (2,4-δισακόρεστες αλδεϋδες, β-δικετόνες, 3,5-δισακόρεστες μεθυλοκετόνες) καθώς και συζυγή τριένια τα οποία συνήθως σχηματίζονται κατά τον εξευγενισμό του ελαιολάδου. Συνεπώς μεγάλες τιμές απορρόφησης στα 268nm μπορεί να οφείλονται σε προχωρημένη οξείδωση του παρθένου ελαιολάδου κυρίως όμως σε νοθεία του με εξευγενισμένα ελαιόλαδα ή σπορέλαια (ΕΦΕΤ 2015) ημερομηνία πρόσβασης : 20/12/2020

Για τον προσδιορισμό της σχέσης  $\Delta K$  μετρώνται οι απορροφήσεις σε τρία μήκη κύματος στα 268nm, 282nm, 274nm και η σχέση  $\Delta K$  είναι η εξής:

$$\Delta K = K_{268} - (K_{282} - K_{274})/2$$

**Πίνακας 3.1** Κατηγορίες ελαιολάδου σύμφωνα με τις τιμές  $K_{232}$ ,  $K_{268}$  και  $\Delta K$

Κατηγορίες ελαιολάδου	$K_{232}$	$K_{268}$	$\Delta K$
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	<2,5	<0,22	<0,01
Παρθένο ελαιόλαδο	<2,6	<0,25	<0,01
Εξευγενισμένο και παρθένο ελαιόλαδο μαζί	Δεν υπάρχει όριο	<0,9	<0,15

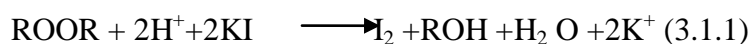
### 3.1.3 Αριθμός Υπεροξειδίου

Ο Αριθμός Υπεροξειδίου (PV) χρησιμοποιείται ως δείκτης της αρχικής οξείδωσης αφού μετρά την περιεκτικότητα σε υδροϋπεροξείδια. Υπάρχουν πολλές

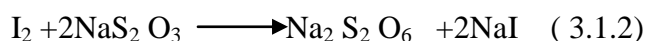
διαδικασίες για την αξιολόγηση του PV. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η ιωδομετρική τιτλοδότηση, αν και πρόσφατα καθιερώθηκαν φασματομετρικές μεθόδολογίες. Η δεύτερη πιο κοινή διαδικασία που χρησιμοποιείται, βασίζεται στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του σιδήρου σε συνδυασμό με την χρωματομετρική μέτρηση. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του Αριθμού Υπεροξειδίου και των αισθητηριακών βαθμολογιών για τα αποθηκευμένα λάδια (Przybylski et al., 1993).

### **Μέθοδος ιωδομετρικής τιτλοδότησης**

Η αντίδραση μεταξύ ενός κορεσμένου ιωδιούχου καλίου και ενός δείγματος ελαίου είναι η βάση στην μέθοδο αυτή. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ικανότητα των υδροϋπεροξειδίων να οξειδώνουν τα ιόντα ιωδίου όπως περιγράφεται στην εξίσωση 3.1.1



Το σχηματιζόμενο ιώδιο δίνει μια ποσοτική μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων που υπάρχουν όταν τιτλοδοτούνται με θειοθειικό νάτριο, παρουσία αμύλου ως δείκτη όπως περιγράφεται στην εξίσωση 3.1.2 (Shahidi and Zhong, 2005b).



Το PV εκφράζεται ως χιλιοϊστοϊσοδύναμο υπεροξειδίου ανά χιλιογράμμο δείγματος. Η μέθοδος αυτή έχει αρκετούς περιορισμούς. Είναι χρονοβόρα, απαιτεί μεγάλες ποσότητες δείγματος και παράγει σημαντική ποσότητα αποβλήτων (Ruiz and Lendl 2001, Dobarganes and Velasco, 2002).

Εκτός από αυτούς τους πρακτικούς περιορισμούς η μέθοδος θεωρείται ότι έχει δύο βασικούς περιορισμούς. Ο πρώτος και κύριος περιορισμός είναι ότι το ιώδιο μπορεί να απορροφηθεί σε ακόρεστους δεσμούς στο λιπιδικό υλικό, και συνεπώς να έχουμε χαμηλότερη εσφαλμένη μέτρηση PV. Δεύτερον το ιώδιο μπορεί να απελευθερωθεί από ιωδιούχο κάλιο, από οξυγόνο που υπάρχει στο δείγμα και έτσι αυξάνει εσφαλμένα την μέτρηση του Αριθμού Υπεροξειδίου (PV) ( Semb., 2012).

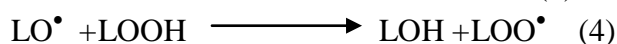
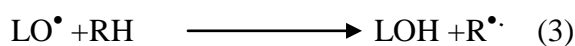
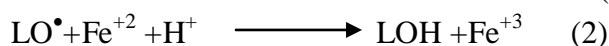
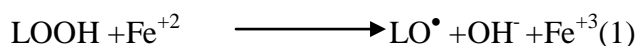
Διαφορετική δραστηριότητα μεταξύ διαφορετικών υπεροξειδίων, διακύμανση βάρους στο δείγμα, οι παραλλαγές στις συνθήκες αντίδρασης, όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία είναι επίσης πιθανές πηγές σφάλματος στην μέθοδο ιωδομετρικής τιτλοδότησης που έχει αναφερθεί (Semb, 2012).

Έχει προταθεί να περιοριστεί η πιθανή παρεμβολή οξυγόνου που υπάρχει στο δείγμα ιωδίου διοχετεύοντας αέριο άζωτο ή ιώδιο καδμίου (Semb, 2012).

Σύμφωνα με τον Frankel (2005), η μέθοδος ιωδιομετρικής τιτλοδότησης έχει ελάχιστο όριο ανίχνευσης 0,5 mEq δείγμα υπεροξειδίου /Kg ελαιολάδου. Αυτό θεωρείται σχετικά χαμηλή ευαισθησία, και αυτό σε συνδυασμό με τους προαναφερθέντες περιορισμούς οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών νέων μεθόδων προκειμένου να μετρηθεί ο Αριθμός Υπεροξειδίου. Μεταξύ αυτών η φασματοφωτομετρική μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου, η οποία είναι πιο ευαίσθητη και απαιτεί μικρότερο μέγεθος δείγματος (0,1g) σε σύγκριση με την ιωδιομετρική τιτλοδότηση (Frankel, 2001).

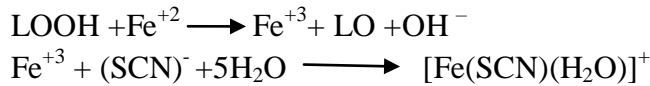
#### 3.1.4. Φασματοφωτομετρική μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των υδροϋπεροξειδίων να οξειδώνουν τα ιόντα σιδήρου ( $Fe^{+2}$ ) στα ιόντα σιδήρου ( $Fe^{+3}$ ) σε όξινο μέσο. Τα ιόντα σιδήρου σχηματίζουν χρωμοφόρα όταν συμπλοκοποιούνται σε θειοκυανικό, που μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία (Eymard and Genot, 2003).



Ο θειοκυανικός σίδηρος είναι ερυθρο-ιώδες σύμπλοκο με μέγιστο φάσμα απορρόφησης στα 500 -510 nm.

Η μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου για τον προσδιορισμό λιπαντικών είναι απλή αναπαραγώγιμη και θεωρείται πιο ευαίσθητη από την τυπική μέθοδο ιωδομετρικής τιτλοδότησης. Η αυξημένη ευαισθησία (0,05 mEq υπεροξειδίου /Kg) οφείλεται κυρίως στην χαμηλότερη ευαισθησία ιόντων σιδήρου σε αυθόρμητη οξείδωση μέσω οξυγόνου στον αέρα, σε σύγκριση με την υψηλή ευαισθησία στην οξείδωση των διαλυμάτων ιωδίου. Σφάλμα που σχετίζεται με την παρουσία οξυγόνου μπορεί να αποφευχθεί με διοχέτευση αντιδραστηρίων με άζωτο (Mihaljevic et al., 1996) ωστόσο αυτή δεν είναι η τυπική διαδικασία σύμφωνα με την δημοσιευμένη μέθοδο IDF (μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου). Η μέθοδος IDF προσδιορίζει τον Αριθμό Υπεροξειδίου βασισόμενη στην αρχή του θειοκυανικού σιδήρου. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, τα υδροϋπεροξειδία (LOOH) οξειδώνουν το  $Fe^{+2}$  σε  $Fe^{+3}$  ο οποίος αντιδρά με το θειοκυανικό αμμώνιο σχηματίζοντας ένα ροζ σύμπλοκο θειοκυανικού σιδήρου. Η απορρόφηση του συμπλόκου είναι ανάλογη με την ποσότητα των υδροϋπεροξειδίων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής (Semb, 2012):



Το PV είναι παρόμοιο με την μέθοδο ιωδιομετρικής τιτλοδότησης που εκφράζεται ως milliequivalents του υπεροξειδίου ανά κιλό δείγματος. Έχουν γίνει πολλά πειράματα για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ PV αποτελέσματα που λαμβάνονται με την μέθοδο θειοκυανικού σιδήρου και με ιωδιομετρική τιτλοδότηση. Οι Makinen et al. (1995), ανέφεραν ότι η μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου δίνει τιμές PV που είναι διπλάσιες από αυτές της ιωδιομετρικής μεθόδου (AOCS Επίσημη μέθοδος Cd-8B-90). Τα αποτελέσματα συνεπώς που λαμβάνονται από τον θειοκυανικό σίδηρο πρέπει να πολλαπλασιαστούν με έναν συντελεστή διόρθωσης 0,5 (Makinen et al., 1995).

Η σχέση που δίνει τον Αριθμό Υπεροξειδωσης είναι η εξής:

$$\text{PV (mEq/Kg)} = (A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{λευκό}}) \times L \times V / 55,845 \times S \times 0,1 \times 0,5$$

Όπου: L = η κλίση της τυπικής καμπύλης που κατασκευάζεται ως  $m\text{Fe}^{+3} = f(A)$

V = ο όγκος ισο-εξάνιου που χρησιμοποιείται για την διάλυση του λαδιού σε ml

S = η ποσότητα δείγματος λαδιού σε gr

55,845 = μοριακό βάρος σιδήρου (g/mole)

0,1 = όγκος του δείγματος που διαλύθηκε σε ισο-εξάνιο (ml)

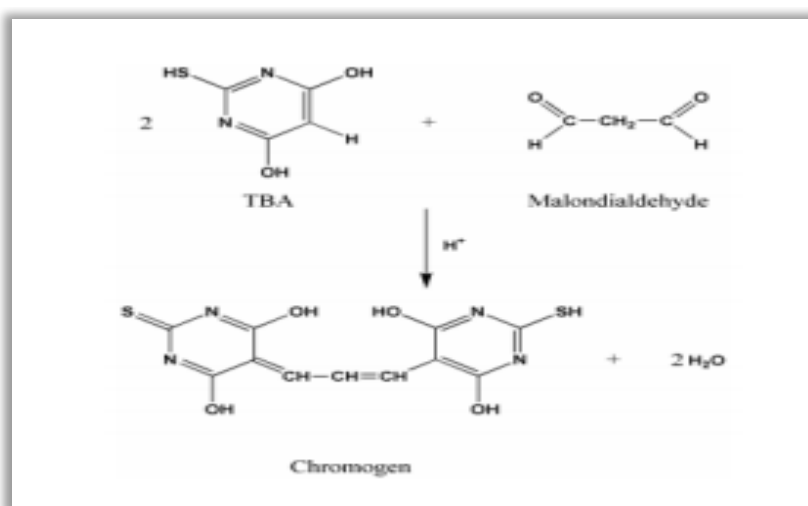
0,5 = συντελεστής διόρθωση

A = απορρόφηση του δείγματος και του λευκού (χωρίς λάδι).

## 3.2 ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΑΣ ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

### 3.2.1 Δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος

Η δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ του TBA και της μηλονικής αλδεϋδης. Είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα τεστ ιδιαίτερα για τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η TBA παράγει ένα κόκκινο χρώμα με μέγιστη απορρόφηση στα 532nm. Αυτή η δοκιμή δεν αφορά μόνο την μηλονική αλδεϋδη αλλά υπάρχουν αναφορές και για άλλες αλδεϋδες οξείδωσης και υπεροξειδία που σχηματίζουν επίσης ένα χρωματιστό σύμπλεγμα που θα μπορούσε να επηρεάσει την αξιολόγηση.



**Σχήμα 3.1** Η αντίδραση θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και μηλονικής αλδεϋδης (MDA) σχηματίζει ένα ροζ προϊόν το οποίο έχει μέγιστο απορρόφησης 532-535 nm (Antolovich et al., 2002).

Η μηλονική αλδεϋδη που χρησιμοποιείται παράγεται από 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπάνιο με όξινη υδρόλυση (Frankel, 2005). Η μέτρηση της δευτερογενούς οξείδωσης με την μέθοδο TBA εκφράζεται ως μmoles TBA /g δείγματος.

Η δοκιμασία χρησιμοποιείται συχνά παρά τον γνωστό περιορισμό της στην έλλειψη ευαισθησίας. Συνθήκες αντίδρασης όπως θερμοκρασία, χρόνος θέρμανσης, pH και η παρουσία αντιοξειδωτικών και μεταλλικών ιόντων επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη του χρώματος (Antolovich et al., 2002).

Ωστόσο ο κύριος περιορισμός προκύπτει από την ικανότητα πολλών ενώσεων να αντιδρούν με το αντιδραστήριο TBA και ως εκ τούτου συμβάλει στην υπερεκτίμηση της έντασης του χρώματος ( de las Heras et al., 2003).

Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι τα αλκένια, οι κετόνες, τα οξέα, οι εστέρες, οι πρωτεΐνες, η σουκρόζη, η ουρία, οι πυριδίνες, οι πυριμιδίνες (Jardine et al., 2002).

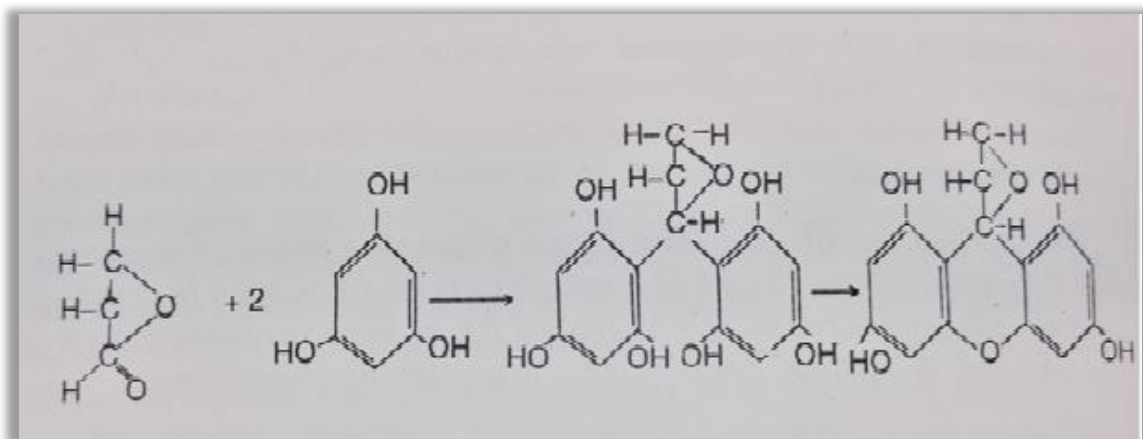
Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την βελτίωση της επιλεκτικότητας της μεθόδου TBA. Οι Chirico et al. (1993), χρησιμοποίησαν την μέθοδο TBA σε συνδυασμό με HPLC για τον χαρακτηρισμό των μεμονομένων ενώσεων που σχηματίζονται. Ωστόσο η πιθανότητα ύπαρξης ενώσεων με παρόμοιες ιδιότητες φάσματος ήταν ακόμη περιορισμός (Chirico et al., 1993).

### **3.2. 2 Μέθοδος Kreis (δοκιμή)**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εκδήλωση ερυθρού χρώματος το οποίο σχηματίζεται όταν η ταγγισμένη λιπαρή ουσία έρθει σε επαφή με πυκνό υδροχλωρικό οξύ και διάλυμα φλωρογλουκινόλης (Phloroglucinol) σε αιθέρα. Πρόκειται για αντίδραση που οδηγεί σε έγχρωμα προϊόντα, της οποίας η ένταση του χρώματος είναι μέτρο της επιυδρινικής αλδεΐδης. Η επιυδρινική αλδεΐδη είναι παράγωγο του οξειδωτικού ταγγίσματος (Μπαλατσούρας, 1997).

Βέβαια η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται ως εμπειρική και είναι πολύτιμη για ποιοτικές έρευνες και δεν προσφέρεται για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Προτείνεται ακόμη και σήμερα, για μια γρήγορη εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης μιας λιπαρής ουσίας, αλλά παρουσιάζει το σοβαρό μειονέκτημα ότι το τελικό χρώμα επηρεάζεται από την παρουσία διαφόρων χρωστικών που υπάρχουν στο εξεταζόμενο δείγμα. Παράλληλα με το δείγμα ελαιολάδου προετοιμάζεται και ένας μάρτυρας προκειμένου να γίνει σύγκριση του χρώματός του με αυτό του δείγματος. Όταν το δείγμα αρχίσει να εμφανίζει ρόδινο χρώμα τότε έχει αρχίσει και η οξείδωση. Η ένταση του χρώματος του δείγματος ελαιολάδου, στη φάση της οξείδωσης, μπορεί να μετρηθεί και σε χρωματόμετρο Lovibond (Κυριτσάκης, 2007) .

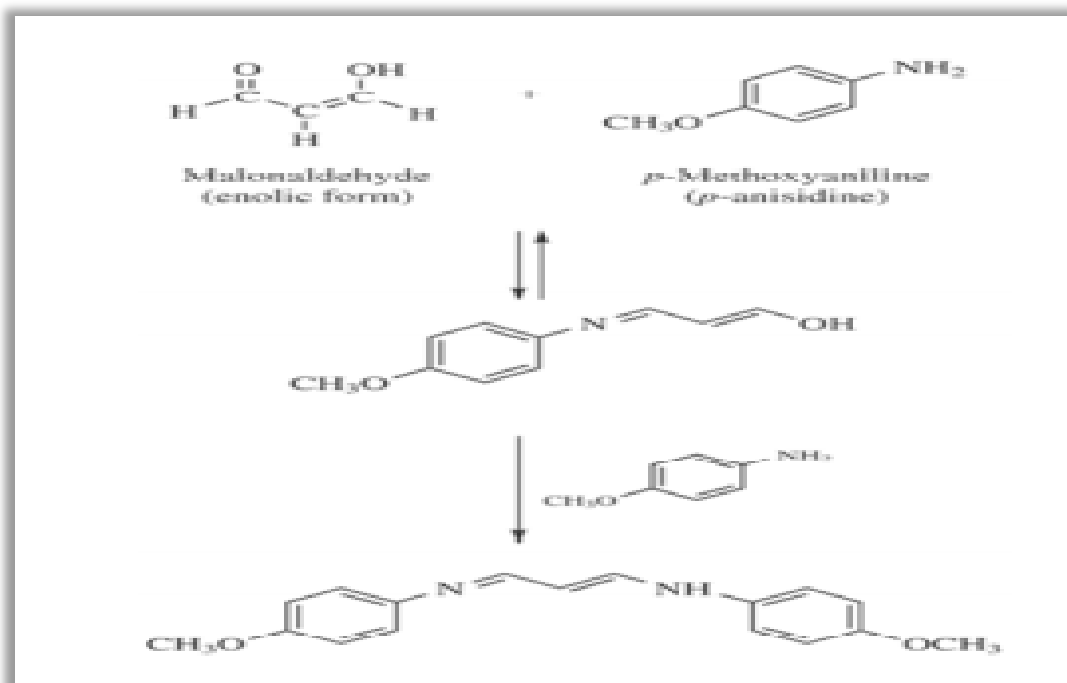




**Σχήμα 3.2** Αντίδραση λιπαρής ουσίας με φλωρογλουκινόλη (Κυριτσάκης, 2007).

### 3.2.3 Τιμή ανισιδίνης(AV)

Η δοκιμή βασίζεται στην αντίδραση της ρ-ανισιδίνης με ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις που υπάρχουν στα λάδια και το έγχρωμο προϊόν αντίδρασης σχηματίζεται και μετράται φασματοφωτομετρικά στα 350 nm. Συνιστώνται τιμές ανισιδίνης κάτω από 10 για φρέσκα λάδια. Έχει βρεθεί ένας καλός συσχετισμός μεταξύ της AV και των αισθητηρίων για τα έλαια και τα τηγανιτά προϊόντα (McMullen and Hawrysh, 1991). Ένας συνδυασμός υπεροξειδίου και τιμών ανισιδίνης χρησιμοποιούνται συχνά ως πλήρης περιγραφή της οξειδωτικής κατάστασης του ελαίου και ονομάζεται δείκτης TOTOX. Ο δείκτης TOTOX (OV) δίνεται από την σχέση:  $2 \times PV + AV$  (Morales and Przybylski, 2013).



**Σχήμα 3.3** Προτεινόμενη αντίδραση μεταξύ της *p*-ανισιδίνης και της μηλονικής αλδεΐδης (Shahidi and Wanasundara ,2002).

### 3.2.4 Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία

Η ανάλυση των συστατικών γεύσης με GC είναι μια άμεση μέτρηση των ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό εκτός γεύσης και ως εκ τούτου είναι πλέον κατάλληλος για σύγκριση με αισθητηριακή αξιολόγηση. Αυτή η μεθοδολογία μπορεί επίσης να παρέχει δεδομένα σχετικά με την προέλευση των αρωματικών ενώσεων και των προδρόμων τους (Frankel, 1993).

Αρχικά οι πιο ευρέως εφαρμοζόμενες τεχνικές εισαγωγής δείγματος για αναλύσεις πτητικών ενώσεων με GC ήταν η στατικού υπερκείμενου χώρου (static headspace), δυναμικού υπερκείμενου χώρου (dynamic headspace) και direct injection. Οι δυναμικού υπερκείμενου χώρου (dynamic headspace) έχουν εφαρμοστεί ευρέως στην μελέτη της οξείδωσης ελαιολάδου (Dobarganes et al., 1986, Solinas et al., 1987, Morales et al., 1997) αν και τα τελευταία χρόνια η μικρό-εγκύλιση στερεάς φάσης (SPME) ήταν η πιο κοινή τεχνική προετοιμασίας δείγματος για την αξιολόγηση των πτητικών ενώσεων στο οξειδωμένο ελαιολάδο. Σύμφωνα με τους Harwood and Aparicio (2000), οι ενώσεις που προσδιορίζονται με αυτή την μέθοδο συνήθως είναι οι στερόλες, οι αλκοόλες και οι εστέρες.

### **3.3 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ**

#### **3.3.1 Δοκιμή αντοχής στην οξειδωμένη σταθερότητα**

Έχει αναπτυχθεί μια σειρά από επιταχυνόμενες δοκιμές για την αξιολόγηση της οξειδωτικής αντοχής στο λάδι. Σύμφωνα με τον Frankel (1983), η οξειδωτική σταθερότητα δοκιμάζεται σε θερμοκρασία πάνω από 85°C αλλά δεν είναι αξιόπιστη λόγω των εμπλεκόμενων διαφορετικών μηχανισμών οξείδωσης. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα αποτελέσματα της Rancimat και της μεθόδου ενεργού οξυγόνου (AOM) δεν συμφώνησαν με τις δοκιμές σταθερότητας που πραγματοποιήθηκαν στους 60°C (Warner et al.,1989).

#### **3.3.2 Μέθοδος ενεργού οξυγόνου.**

Στην δοκιμή Active Oxygen Method (AOM) ή Swift, τοποθετείται το δείγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι έχουν τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 98 °C και μέσα από αυτούς περνά ρεύμα αέρα (Κυριτσάκης, 2007).

Δείγματα λαδιού λαμβάνονται σε διάφορα διαστήματα και καθορίζεται το PV. Σχεδιάζοντας το PV σε σχέση με τον χρόνο έχει καθοριστεί η περίοδος επαγωγής (Morales and Przybylski, 2013). Ο χρόνος που χρειάζεται για να φτάσει το PV (Αριθμός Υπεροξειδίων) στο 100 ονομάζεται Active Oxygen Method (AOM) (Κυριτσάκης, 2007).

#### **3.3.3 Δοκιμές απορρόφησης οξυγόνου**

Η οξειδωτική φθορά μπορεί επίσης να παρακολουθείται διατηρώντας το λάδι σε υψηλά επίπεδα θερμοκρασίας, σε κλειστό κύκλωμα όπου και θα μετράται η απορρόφηση του οξυγόνου (Morales and Przybylski , 2013).

#### **3.3.4 Δοκιμές αγωγιμότητας**

Οι δοκιμές αγωγιμότητας βασίζονται στην αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων και τον σχηματισμό λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, τα οποία αλλάζουν την αγωγιμότητα του νερού. Αυτά τα οξέα παράγονται όταν τα λάδια θερμαίνονται στους 100°C ή ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες και είναι συνήθως μυρμηκικά και οξικά

οξέα. Διάφορα αυτοματοποιημένα όργανα με βάση την αρχή της αγωγιμότητας έχουν αναπτυχθεί συμπεριλαμβανομένης της Rancimat (Rossel, 1987).

Με την μέθοδο Rancimat επιτυγχάνεται οξείδωση των μορίων των λιπαρών οξέων του δείγματος ελαιολάδου, μέσω της συνεχόμενης θέρμανσης, καθώς και της συνεχούς ροής αέρα που διοχετεύεται μέσα από αυτό. Τα αρχικά προϊόντα οξείδωσης που σχηματίζονται, είναι τα υπεροξειδία, ενώ τα δευτερεύοντα είναι πτητικά οξέα όπως το φορμικό οξύ και το οξικό οξύ. Αυτά τα πτητικά οξέα διοχετεύονται μέσω ενός σωλήνα από το δοχείο του δείγματος σε ένα δοχείο το οποίο περιέχει απιονισμένο νερό, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα η οποία μετρείται με ειδικό ηλεκτρόδιο. Ο χρόνος που μεσολαβεί έως τον σχηματισμό των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, ονομάζεται χρόνος επαγωγής της οξείδωσης και όσο μεγαλύτερη τιμή έχει ο χρόνος επαγωγής της οξείδωσης, τόσο πιο σταθερό είναι το δείγμα που εξετάζεται (Farhoosh et al., 2013) .

### **3.3.5. Δοκιμές ταχείας αποθήκευσης**

Οι δοκιμές ταχείας αποθήκευσης έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την παρακολούθηση της σταθερότητας φυτικών ελαίων χρησιμοποιώντας μια τροποποίηση της δοκιμής φούρνου Schaal (Eskin et al., 1989). Σε αυτή την δοκιμή, η οξείδωση επιταχύνεται κρατώντας το δείγμα λαδιού από 60°C έως 65°C στο σκοτάδι και τα δείγματα αξιολογούνται σε καθορισμένα διαστήματα μετρώντας την έκταση της οξείδωσης (Morales and Przybylski, 2013).

Υπάρχουν παραλλαγές των συνθηκών δοκιμής φούρνου Schaal και περιλαμβάνουν διαφορές στην ποσότητα λαδιού που χρησιμοποιείται για αποθήκευση, το μέγεθος των δοχείων αποθήκευσης, τις διαφορές σε αναλογίες μεταξύ της επιφάνειας του λαδιού και του όγκου του, και ανεξάρτητα από το εάν ή όχι τα εμπορευματοκιβώτια καλύπτονται κατά την αποθήκευση. Η αναλογία μεταξύ επιφάνειας ή και όγκου του λαδιού επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό οξείδωσης (Morales and Przybylski, 2013).

Η δοκιμή φούρνου Schaal είναι πιο αξιόπιστη από τις δοκιμές που διεξήχθησαν σε υψηλές θερμοκρασίες επειδή αναπαράγει παρόμοια οξειδωτικά και οι αλλαγές παρατηρήθηκαν υπό πραγματικές συνθήκες ζωής στο ράφι (De Man et al., 1987).

Αυξάνοντας την θερμοκρασία αποθήκευσης, ο ρυθμός οξείδωσης αυξάνεται κι έτσι ολόκληρη η δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Μια ημέρα αποθήκευσης σε αυτή την κατάσταση είναι ισοδύναμο με περίπου ένα μήνα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Evans et al., 1973 ). Αυτή η δοκιμή εκτελείται επίσης με έκθεση στο φώς για να αξιολογηθεί οποιαδήποτε επίδραση φωτοοξείδωσης στην οξειδωτική σταθερότητα του λαδιού (Morales and Przybylski, 2013).

### **3.3.6.Δοκιμές αποθήκευσης περιβάλλοντος**

Αυτές οι δοκιμές πραγματοποιούνται παρόμοια με την δοκιμή φούρνου Schaal αλλά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι δοκιμές πρέπει να εκτελούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της αργής διαδικασίας οξείδωσης και ως εκ τούτου είναι δαπανηρές και χρονοβόρες (Morales and Przybylski, 2013).

=

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου, το οποίο αποτελεί το 1-2% των συστατικών του ελαιολάδου, ανήκουν ενώσεις οι οποίες δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Τέτοιες ενώσεις είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο τα οποία ανήκουν στους υδρογονάνθρακες. Το σκουαλένιο μάλιστα, το οποίο αποτελεί και το 90% του κλάσματος των υδρογονανθράκων, έχει ιδιαίτερα ευεργετικές ιδιότητες, έχει αντικαρκινική δράση. Από τις χρωστικές το β-καροτένιο και η α-τοκοφερόλη (κυρίως) αποσβένουν το O<sub>2</sub>, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η αλλοίωση του ελαιολάδου κατά την φωτοοξείδωση. Οι φαινολικές ενώσεις (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, λιγνίνες, φλαβονοειδή) σχετίζονται άμεσα με την οξειδωτική σταθερότητα χάρη στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Μάλιστα οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Οι τοκοφερόλες και ιδιαίτερα η α-τοκοφερόλη η οποία βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα από τις άλλες τοκοφερόλες στα ελληνικά ελαιόλαδα, είναι ενώσεις οι οποίες δρουν ως αντι-οξειδωτικά. Η αντιοξειδωτική δράση της τοκοφερόλης θεωρείται μικρότερης σημασίας από αυτή των πολυφαινολών. Αυτό συμβαίνει ίσως γιατί τα πολικά αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά σε μη πολικά λίπη, ενώ τα άπολα αντιοξειδωτικά σε πολικά λίπη. Έτσι λοιπόν στη μάζα του ελαιολάδου τα πολικά αντιοξειδωτικά (πολυφαινόλες), προσανατολίζονται στην επιφάνεια του ελαίου /αέρα και με αυτό τον τρόπο η δράση τους είναι πιο αποτελεσματική από των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών που μένουν στη μάζα του ελαίου. Τα φωσφολιπίδια τα οποία ανήκουν στο σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου, δρουν ως συνεργιστικά δηλαδή κάνουν αναγέννηση αντιοξειδωτικών α-τοκοφερόλης ή φαινολικών ουσιών αλλά και ως καθαριστές μετάλλων. Επίσης οι στερόλες είναι μια άλλη κατηγορία λιπιδίων που σχετίζονται με την ποιότητα του λαδιού καθώς επίσης και με τον έλεγχο γνησιότητάς του.

Οι χλωροφύλλες, φαιοφυτίνες προάγουν την Φωτοοξείδωση, ενώ τα καροτένια και η τοκοφερόλη την παρεμποδίζουν. Ο βαθμός αλλοίωσης του ελαιολάδου επηρεάζεται από την συγκέντρωση των χρωστικών στο ελαιόλαδο καθώς και από τον χρόνο έκθεσής του στο φως. Από την άλλη, λιπαρά οξέα όπως το λινολενικό και το λινελαϊκό που περιέχουν την δομή 1-4 cis-cis πενταδιένιο (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) όταν δράσει με αυτά η λιποξυγενάση (LOX), η οποία είναι ένα ένζυμο που περιέχει

σίδηρο στο ενεργό κέντρο, παράγει υδροϋπεροξειδία με ταυτόχρονη οξείδωση του  $Fe^{+2}$  σε  $Fe^{+3}$ . Είδη LOX οξειδώνουν λιπαρά οξέα που συμμετέχουν σε τριγλυκερίδια παρουσία  $O_2$  και η ταχύτητα οξείδωσης είναι μεγάλη, όμως υπάρχουν και είδη LOX τα οποία μπορούν να δράσουν χωρίς να υπάρχει  $O_2$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι πενταδιενική διάταξη δεν απαντά στο ελαϊκό οξύ το οποίο και βρίσκεται σε αυξημένες ποσότητες έναντι των λινελαϊκού και λινολενικού όσον αφορά τα ελληνικά λάδια. Η παρουσία ακόρεστου δεσμού στα τριγλυκερίδια ευνοεί την αυτοοξείδωση. Η ταχύτητα διάσπασης υδροϋπεροξειδίων εξαρτάται από τον αριθμό διπλών δεσμών. Έτσι για τα υπεροξειδία ισχύει η σχέση:  $C 18:3 > C 18:2 > C 18:1$ . Ορισμένοι ερευνητές αμφιβάλλουν ως προς την δυνατότητα της δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις μεθυλενικές ομάδες που γειτονεύουν με τον ένα διπλό δεσμό του μορίου, ενώ κάποιοι άλλοι συμφωνούν με την δυνατότητα σχηματισμού ελεύθερων ριζών επί της μεθυλενικής ομάδας που βρίσκεται μεταξύ των δύο διπλών δεσμών. Το αποτέλεσμα του οξειδωτικού ταγγίσματος είναι η δημιουργία τελικών προϊόντων τα οποία ζημιώνουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ελαιολάδου, πολλά εκ των οποίων είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Τέτοια προϊόντα είναι οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα οξέα, τα οξυοξέα, και τα κετονοξέα. Περισσότερο ενδιαφέρουσες από πλευράς δυσσομίας είναι οι αλδεΐδες (ακεταλδεΐδη, α-πεντανάλη, εξενο-διάλη).

Επίσης είναι γενικά αποδεκτό ότι όταν το λιπαρό μέσο τηγανίσματος είναι πλούσιο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, τότε σχηματίζονται μηδαμινές υπεροξειδικές ρίζες και τοξικά παράγωγα ενώ όταν οι λιπαρές ουσίες περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα οι υπεροξειδικές ρίζες και τα τοξικά παράγωγα είναι αυξημένα. Επειδή το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκό) και φτωχό σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς επίσης είναι και πλούσιο σε φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες πρέπει να προτιμάται για περισσότερα τηγανίσματα. Το ελαιόλαδο σχηματίζει μια λεπτή κρούστα στο εξωτερικό μέρος των τηγανιτών φαγητών με αυξημένη λιποπεριεκτικότητα, σε αντίθεση με τις άλλες λιπαρές ουσίες οι οποίες σχηματίζουν παχύτερη μεν κρούστα φτωχή δε σε λιπαρή ουσία.

Ακόμη τα βαρέα μέταλλα και ιδιαίτερα εκείνα με δύο ή περισσότερες οξειδωτικές καταστάσεις αυξάνουν τον ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι όταν τα υπεροξειδία απομακρυνθούν από τα λιπίδια, ο σίδηρος δεν προκαλεί υπεροξείδωση στα λιπίδια. Οι περισσότεροι όμως ερευνητές αποδέχονται την άποψη ότι σχεδόν όλα τα λιπίδια περιέχουν έστω και πολύ μικρές ποσότητες υπεροξειδίων και αυτό ενισχύει την άποψη ότι η αποσύνθεση υπεροξειδίων από σίδηρο είναι η πιο

σημαντική αιτία οξείδωσης των τροφίμων. Η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μετάλλου – υδροϋπεροξειδίου δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Εκείνο που υποστηρίζει όμως η παραδοσιακή χημεία είναι ότι η κατάλυση σε ένα διαφασικό σύστημα θα συμβεί στο διεπαφή φάσης ή στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τα υπεροξειδία είναι πιο πολικά από το μη οξειδωμένο λίπος και αυτό τα κάνει επιρρεπή στο να συσσωρεύονται κοντά στην επιφάνεια.

Συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι για την διατήρηση ενός ελαιολάδου, σε καλή οργανοληπτική αλλά και χημική-θρεπτική κατάσταση θα πρέπει να τηρήσουμε κάποια μέτρα ευλαβικά:

1) Να χρησιμοποιείται καλής ποιότητας ελαιόκαρπος ο οποίος θα πρέπει να επεξεργάζεται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα από την ώρα της συλλογής του αφού προηγουμένως πλυθεί επιμελώς με άφθονο νερό υπό πίεση.

2) Να γίνεται σχολαστικό πλύσιμο των δεξαμενών, των βυτίων, των δοχείων φύλαξης του ελαιολάδου.

3) Να αποφεύγεται συστηματικά η μόλυνση του ελαιόκαρπου με βαριά μέταλλα, κυρίως χαλκό και σίδηρο, τα οποία συνήθως προέρχονται είτε από τα μηχανήματα του ελαιουργείου, όταν αυτά δεν είναι από ανοξείδωτο χάλυβα, αλλά και από τα οξειδωμένα δοχεία συντήρησης (τενεκέδες).

4) Να αποθηκεύεται το λάδι σε δροσερή αποθήκη, χωρίς υγρασία, και να μην λιάζεται έντονα. Ο αποθηκευτικός χώρος θα πρέπει επίσης να αερίζεται επαρκώς προκειμένου να διατηρείται και η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία σε χαμηλά επίπεδα.

5) Να αποφεύγεται κάθε επαφή του λαδιού με τον αέρα. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι για να πραγματοποιηθεί τάγγισμα χρειάζεται οξυγόνο. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με το να αποθηκεύεται το ελαιόλαδο σε δοχεία ή δεξαμενές οι οποίες στο πάνω μέρος δεν έχουν κενό .

6) Να προστίθενται στα ελαιόλαδα, με εξαίρεση τα παρθένα, αντιοξειδωτικές ουσίες εκτός από τις φυσικές που ήδη περιέχουν (τοκοφερόλες, φαινόλες, καροτενοειδή).

7) Να αποφεύγεται η έκθεση του ελαιολάδου σε πηγές δυσσομίας (ελαιοπυρήνας, παλιά λάδια κ.λ.π) γιατί το ελαιόλαδο και γενικά οι λιπαρές ουσίες απορροφούν γρήγορα και διατηρούν τις διάφορες δυσσομίες.

8) Η οξύτητα του ελαιολάδου επίσης παίζει σπουδαίο ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου. Ελαιόλαδα με αυξημένη οξύτητα (μεγάλη συγκέντρω-



ση ελεύθερων λιπαρών οξέων FFA) έχουν μικρότερη οξειδωτική σταθερότητα. Αυτό μάλλον συμβαίνει γιατί τα -COOH των FFA δρουν ως καταλύτες και με αυτό τον τρόπο διασπώνται τα υδροϋπεροξειδία με αποτέλεσμα την αύξηση της οξείδωσης.

Ανάλογα με την κατάσταση της οξείδωσης, συνιστάται και η μέθοδος ανάλυσης και ποσοτικοποίησης των υδροϋπεροξειδίων στα ελαιόλαδα. Η επιλογή της μεθόδου θα πρέπει να είναι καλά αιτιολογημένη και ανεξάρτητα από την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί. Εκείνο που θα πρέπει να θυμόμαστε πάντα είναι, ότι η ανάλυση αυτή μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την διαφορά μεταξύ σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων και αποσύνθεσης. Συνεπώς ίσως να ήταν πιο σωστό η αξιολόγηση του βαθμού οξείδωσης να πραγματοποιείται με περισσότερες από μια μεθόδους και μετρώντας διαφορετικούς τύπους ενώσεων οξείδωσης τόσο των πρωτογενών υδροϋπεροξειδίων όσο και των προϊόντων αποσύνθεσής τους

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι για τον προσδιορισμό πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης είναι ο αριθμός υπεροξειδίου (PV) και τα συζευγμένα διένια. Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίου είναι χρήσιμος για μαζικά δείγματα λαδιών που μπορούν να αναλυθούν άμεσα.

Τα συζευγμένα υδροϋπεροξειδία διενίου που παράγονται σε PUFAs μπορούν να προσδιοριστούν από την ισχυρή απορρόφησή τους στα 235nm. Η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για λάδια με χαμηλές ποσότητες PUFA (Revilija Mozuraityte, 2007). Οι τιμές TBARS και ανισιδίνης αξιολογούν προϊόντα δευτερογενούς οξείδωσης. Ωστόσο οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν περιλαμβάνουν κάποια στάδια προετοιμασίας και /ή ανάπτυξης και είναι χρονοβόρα. Τα μονοπάτια διάσπασης των προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τις φυσικές και χημικές συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιείται η οξείδωση. Αυτό καθιστά δύσκολο τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξείδωσης των λιπιδίων. Επομένως είναι ενδιαφέρον να γίνει προσπάθεια χρησιμοποίησης του υποστρώματος αντίδρασης ως δείκτη οξείδωσης .

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **A. ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

ΕΦΕΤ 2015 [https://www.efet.gr/files/F3406\\_odel.pdf](https://www.efet.gr/files/F3406_odel.pdf) 20/12/2020)

Κανονισμός Ε.Κ.2568, 1991

Κυριτσάκης Κ. Α. (2007). Ελαιόλαδο.

Μπαλατσούρας, Γ. (1997). Το ελαιόλαδο. *Τόμος δεύτερος*, 91-94.

Σπηλιόπουλος Ι., Βάκρος Ι., & Ξαπλαντέρη Μ. (2015). Χημεία.

Ψωμιάδου, Ε. (2000). *Επίδραση ισοπρενοειδών λιπιδίων και χλωρόφυλλων στην οξειδωτική σταθερότητα ελαίων πλούσιων σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα* (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας. Τομέας Χημικής Τεχνολογίας και Βιομηχανικής Χημείας. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων).

### **B. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ**

Antonovich, R. S., & Keller, P. R. (2002). Applicability of mass spectrometry to detect coeluting impurities in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 971(1-2),

Allen, J. C., & Hamilton, R. J. (1994). *Rancidity in foods.. ed. 3*. Chapman and Hall Ltd..

Andrikopoulos, N. K., Antonopoulou, S., & Kaliora, A. C. (2002). Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *LWT-Food Science and Technology*, 35(6), 479-484

Andrikopoulos, N. K., Hassapidou, M. N., & Manoukas, A. G. (1989). The tocopherol content of Greek olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(4), 503-509.

Alter, M., & Gutfinger, T. (1982). Phospholipids in several vegetable oils [olive, avocado, cotton, maize, rape]. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse (Italy)*

Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J. J., Uceda, M., & Beltrán, G. (2007). How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9646-9654.

Aparicio, R., & Morales, M. T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1116-1122.

Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 614-627.

Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC (1989) The Mechanism of Initiation of Lipid-Peroxidation - Evidence against a Requirement for an Iron(II) Iron(III) Complex. *Biochem J* 258, 617-620

Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 639-660

Angerosa, F., d'Alessandro, N., Corana, F., & Mellerio, G. (1996). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 736(1-2), 195-203.

Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573.

Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., & Montedoro, G. F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(11), 1589-1593

Brenes, M., García, A., Dobarganes, M. C., Velasco, J., & Romero, C. (2002). Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5962-5967

Bastida, S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2001). Thermal oxidation of olive oil, sunflower oil and a mix of both oils during forty discontinuous domestic fryings of different foods. *Food science and technology international*, 7(1), 15-21

. Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In *Olive Oil* (pp. 41-72). AOCS press

Boskou, D. (2007). Olive oil. *World review of nutrition and dietetics*, 97, 180-210.

Boskou, D., & Morton, I. D. (1975). Changes in the sterol composition of olive oil on heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8), 1149-1153.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Amino acids, peptides, proteins. In *Food chemistry* (pp. 8-91). Springer, Berlin, Heidelberg

Buettner, G. R. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535-543

Buc-Calderon, P., Sipe Jr, H. J., Flitter, W., Mason, R. P., & Roberfroid, M. (1990). N-acyl dehydroalanines scavenge oxygen radicals and inhibit in vitro free radical mediated processes. *Chemico-biological interactions*, 73(1), 77-88.

Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., & Rahmani, M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(5), 307-312.

Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.

Christopoulou, C. N., & Perkins, E. G. (1989). Chromatographic studies on fatty acid dimers: Gas-liquid chromatography, high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(9), 1353-1359.

Choe, E. and Min, D.B. 2007. Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* 72, 77–86.

Colakoglu, A. S. (2007). Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron. *Food Chemistry*, 101(2), 724-728

Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA (2010) Olive oil stability under deep – frying conditions. *Food Chem Toxicol* 48:2972–2979

Cichelli, A., & Pertesana, G. P. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046(1-2), 141-146

Calapaj R., S. Chiricosta, G. Saija, et al., Evaluation of Gas Chromatographic and Spectrophotometric Analytical Results to Check the Presence of Seed Oils in Olive Oil Samples. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 70: 585-594, (1993).

DeMan, J. M., Tie, F., & DeMan, L. (1987). Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(7), 993-996

Dobarganes, M. C., Ríos, J. J., & Pérez-Camino, M. C. (1986). Relationships between the oil composition and the volatile compounds formed under thermoxidative conditions. *Grasas y Aceites*, 37, 61-67

de las Heras, A., Schoch, A., Gibis, M., & Fischer, A. (2003). Comparison of methods for determining malondialdehyde in dry sausage by HPLC and the classic TBA test. *European food research and technology*, 217(2), 180-184.

- Deiana, M., Rosa, A., Cao, C. F., Pirisi, F. M., Bandino, G., & Dessi, M. A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of  $\alpha$ -tocopherol concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4342-4346.
- Decker EA, McClements J (2001) Transition metals and hydroperoxide interactions: an important determinant in the oxidative stability of lipid dispersions. *Inform.* 12, 251-255
- Dobarganes, M. C., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 420-428
- Eskin, N. A. M., Vaisey-Genser, M., Durance-Todd, S., & Przybylski, R. (1989). Stability of low linolenic acid canola oil to frying temperatures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(8), 1081-1084.
- Eskin, N. A. M., Vaisey-Genser, M., Yodice, R., & Mounts, T. L. (1989). Applications for genetically modified oils. *J Am Oil Chem Soc*, 66, 1058-1063
- Evans, C. D., List, G. R., Moser, H. A., & Cowan, J. C. (1973). Long term storage of soybean and cottonseed salad oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 50(6), 218-222.
- Eymard, S., & Genot, C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(9), 497-501
- Farhoosh, R., & Hoseini-Yazdi, S. Z. (2013). Shelf-life prediction of olive oils using empirical models developed at low and high temperatures. *Food Chemistry*, 141(1), 557-565.
- Frankel, E. N. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103-1104.
- Frankel, E. N. (2001). Interfacial lipid oxidation and antioxidation. *Journal of Oleo Science*, 50(5), 387-391
- Frankel, E. N. 2005. Lipid Oxidation, Bridgwater, England, The Oily Press.
- Frankel, E. N. 1998. Lipid oxidation, Oily Press Dundee, Scotland.
- Frankel, E. N. (1987). Secondary products of lipid oxidation. *Chemistry and physics of lipids*, 44(2-4), 73-85.

- Frankel, E. N. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Progress in lipid research*, 22(1), 1-33.
- Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12), 1908-1917.
- Frankel, E. N. (1985). Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. *Flavor chemistry of fats and oils*, 1-37
- Frankel EN (1989) The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and  $\beta$ -carotene in relation to processing of edible oils. *Bibl Nutr Dieta* 43:297–312
- Frankel, E. N. (1999). Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Lipid/Fett*, 101(12), 450-455
- Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 495-511
- Fennema, O. R., Parkin, K. L. & Damodaran, S. 2007a. Food Chemistry, Taylor & Francis Group.
- Fennema, O. R., Parkin, K. L. & Srinivasan, D. 2007b. Fennemas' Food Chemistry, Madison, Wisconsin, USA, CRC Press, Taylor & Francis Group
- Fennema, O. R., Parkin, K. L. & Srinivasan, D. 2007c. Food Chemistry, USA, CRC Press, Taylor and Francis Group
- Fakourelis N., Lee EC and Min DB (1987) Effects of chlorophyll and b-carotene on the oxidation stability of olive oil. *J. Food Sci* 52(1), 234-235.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology*, 53(1), 275-297.
- Fukuzawa K, Seko T, Minami K, Terao J (1993) Dynamics of iron-ascorbate – induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles. *Lipids* 28: 497-503.
- Fukuzawa K, Tadokoro T, Kishikawa K, Mukai K, Gebicki JM (1988) Site – specific induction of lipid peroxidation by iron in charged micelles. *Arch Biochem Biophys* 260:146-152.
- Flath, R. A., Forrey, R. R., & Guadagni, D. G. (1973). Aroma components of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(6), 948-952.
- Frega N., F. Bocci, G. Lercker, Free Fatty Acids and Diacylglycerols as Quality Parameters for Extra Virgin Olive Oil. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 70: 153-156, (1993)

- Goddard, J. G., & Sweeney, G. D. (1987). Delayed, ferrous iron-dependent peroxidation of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 259(2), 372-381.
- Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77(4), 503-510.
- Gómez-Alonso, S., Fregapane, G., Salvador, M. D., & Gordon, M. H. (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 667-672.
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15, 129-135.
- Girotti AW (1985) Mechanism of lipid peroxidation. *Free Radical Biol & Med.* 1985, 1, 87-95.
- Harwood, J., & Aparicio, R. (Eds.). (2000). *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (p. 620). Gaithersburg, MD: Aspen.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5), 715S-725S.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 218, 1–14.
- Iannone, A., Rota, C., Bergamini, S., Tomasi, A., & Canfield, L. M. (1998). Antioxidant activity of carotenoids: an electron-spin resonance study on  $\beta$ -carotene and lutein interaction with free radicals generated in a chemical system. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 12(5), 299-304.
- Ivanov II (1985) A relay model of lipid peroxidation in biological membranes. *J. Free Radicals Biol. Med.* 1, 247–253.
- Interesse, F. S., Ruggiero, P., & Vitagliano, M. (1971). Autoxidation of olive oil: influence of chlorophyll pigments. *Ind. Agric*, 9, 318-323.
- Itoh, T., Yoshida, K., Yatsu, T., Tamura, T., Matsumoto, T., & Spencer, G. F. (1981). Triterpene alcohols and sterols of Spanish olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(4), 545-550.
- Itoth, T., & Tamura, T. M. (1973). Sterol composition of 19 vegetable oils. *J American Oil Chem Society*, 50, 122 -125.

Jardine, D., Antolovich, M., Prenzer, P. D. & Robards, K. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. *J Agric Food Chem*, 50, 1720-1724.

Jung, M. Y., & Min, D. B. (1990). Effects of  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -Tocopherols on Oxidative Stability of Soybean Oil. *Journal of food Science*, 55(5), 1464-1465.

Keceli, T., & Gordon, M. H. (2002). Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *Journal of Food Science*, 67(3), 943-947.

Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701.

Kim, B. H., Ikeda, T., Park, H. S., Kim, H. J., Hyun, M. S., Kano, K., ... & Tatsumi, H. (1999). Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnology Techniques*, 13(7), 475-478.

Kiritsakis, A. K. (Ed.). (1998). *Olive oil: from the tree to the table*. Food & Nutrition Press

Kochhar SP (2000) Stable and healthful oils for the 21st century. *Inform* 11:642–647.

Kiritsakis A, Dugan LR (1985) Studies in photooxidation of olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 62:892–896.

Kornfeldt, A., & Croon, L. B. (1981). 4-demethyl-, 4-monomethyl- and 4, 4-dimethylsterols in some vegetable oils. *Lipids*, 16(5), 306-310.

List, G. R., Wang, T. & Shukla, V. K. S. 2005. Storage, Handling, and Transport of Oils and Fats. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.

Liebler, D. C., Baker, P. F., & Kaysen, K. L. (1990). Oxidation of vitamin E: Evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reactions of the tocopheroxyl radical. *Journal of the American Chemical Society*, 112(19), 6995-7000.

Liebler, D. C., & Burr, J. A. (1992). Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. *Biochemistry*, 31(35), 8278-8284.

Mozuraityte, R. (2007). Oxidation of marine phospholipids in liposomes.

Morales, J. F., & Herrera, A. J. (1997). *U.S. Patent Application No. 29/057,498*.



- McMullen, L. M., Hawrysh, Z. J., Lin, C., & Tokarska, B. (1991). Ascorbyl palmitate efficacy in enhancing the accelerated storage stability of canola oil. *Journal of food science*, 56(6), 1651-1654.
- Mäkinen, M., Haila, K., Lampi, A. M., & Viinanen, E. (1995). Determination of peroxide value comparison of iodometric and ferric thiocyanate methods. In *Proceedings of the 18th Nordic Lipid Symposium* (p. 176). *science*, 56(6), 1651-1654.
- Mihaljević, B., Katušin-Ražem, B., & Ražem, D. (1996). The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(1), 53-63.
- Marinova, E. M., & Yanishlieva, N. V. (1992). Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(3), 313-318
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- Moreira, R. G., Castell-Perez, M. E., & Barrufet, M. (1999). *Deep fat frying: Fundamentals and applications*. Boom Koninklijke Uitgevers.
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Lipid oxidation of edible oil. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 335-364.
- May WA, Peterson RJ, Chang SS (1983) Chemical-reactions involved in the deep-fat frying of foods. 9. Identification of the volatile decomposition products of triolein. *J Am Oil Chem Soc* 60:990–995.
- Mehta, U., & Swinburn, B. (2001). A review of factors affecting fat absorption in hot chips. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(2), 133-154.
- Minotti, G., & Aust, S. D. (1989). The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chemico-biological interactions*, 71(1), 1-19.
- Minotti, G., & Aust, S. D. (1987). The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), 1098-1104.
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Lipid oxidation of edible oil. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 335-364.
- Morchio, G., De Andreis, R., & Fedeli, E. (1987). Indagine sul contenuto di steroli totali in oli di oliva e sulle variazioni nel ciclo di raffinazione. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64(5), 185-192
- Morales, M. T., & Przybylski, R. (2013). Olive oil oxidation. In *Handbook of olive oil* (pp. 479-522). Springer, Boston, MA.

Noor, N., & Augustin, M. A. (1984). Effectiveness of antioxidants on the stability of banana chips. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(7), 805-812.

Nawar, W. W. (1985). Chemistry of thermal oxidation of lipids. *Flavor chemistry of fats and oils*, 39-60.

Nayak, P. K., Dash, U. M. A., Rayaguru, K., & Krishnan, K. R. (2016). Physio-chemical changes during repeated frying of cooked oil: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 40(3), 371-390.

Nawar WW (1996) Lipids. In: Fennema OR (ed), Food chemistry. Marcel Dekker, NewYork (USA

Nicholson, R. V., & Scharer, J. M. (1994). Laboratory studies of pyrrhotite oxidation kinetics.

Ohyashiki T, Kadoya A, Kushida K (2002) The role of Fe<sup>3+</sup> on Fe<sup>2+</sup> - dependent lipid peroxidation in phospholipid liposome. *Chem Pharm Bull* 50:203-207.

Przybylski, R., Malcolmson, L. J., Eskin, N. A. M., Durance-Tod, S., Mickle, J., & Carr, R. (1993). Stability of low linolenic acid canola oil to accelerated storage at 60 C. *LWT-Food Science and Technology*, 26(3), 205-209.

Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(4), 716-721.

Psomiadou, E., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2000).  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1770-1775.

Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992).  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184-187.

Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(9), 669-671.

Przybylski, R., & Eskin, N. A. M. (1988). A comparative study on the effectiveness of nitrogen or carbon dioxide flushing in preventing oxidation during the heating of oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 654 629.

Poiana, M., & Mincione, A. (2004). Fatty acids evolution and composition of olive oils extracted from different olive cultivars grown in Calabrian area. *Grasas y Aceites*, 55(3), 282-290.

- Pannelli, G., Famiani, F., Servili, M., & Montedoro, G. F. (1990). Effetti di Cultivar, epoca e modalita di raccolta, sulle caratteristiche quantitative e qualitative della produzione di olio di oliva. *Atti Convegno Problematiche qualitative dell'olio di oliva, Sassari, Italy*, 247-258.
- Pannelli, G., Famiani, F., Servili, M., & Montedoro, G. F. (1989, September). Agro-climatic factors and characteristics of the composition of virgin olive oils. In *International Symposium on Olive Growing 286* (pp. 477-480).
- Paganuzzi V., Monoglycerides in Vegetable Oils. Note IV: Raw Oils of Low Unsaturation, *Riv. Ital. Sost. Grasse* 76: 457-471, (1999).
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. V., & Gordon, M. H. (2001). Antioxidants in food Boca Raton.
- Pokorny J., J. Korczak, In J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (ed). Antioxidants in food. Boca Raton: CRC Press, pp 311-330, (2001).
- Pérez-Camino, M. D. C., Moreda, W., & Cert, A. (2001). Effects of olive fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerol content of virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 699-704.
- Rossell JB (1987) Measurement of rancidity. In: Allen JC, Hamilton RJ (eds) Rancidity in foods. Applied Science Publishers, London, pp 21-45
- Ruíz, A., & Lendl, B. (2001). A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *Analyst*, 126(2), 242-246.
- Rastrelli, L., Passi, S., Ippolito, F., Vacca, G., & De Simone, F. (2002). Rate of degradation of  $\alpha$ -tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(20), 5566-5570.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Rudzińska, M., Przybylski, R., & Wąsowicz, E. (2009). Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 651-662.
- Reische DW, Lilliard DA, Eitenmiller RR (1998) Antioxidants. In: Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. Eds. Akoh CC, Min DB. Mercel Dekker, New York, (USA) 423-448
- Ramirez-Tortosa, M. C., Granados, S. E. R. G. I. O., & Quiles, J. L. (2006). *Chemical composition, types and characteristics of olive oil* (pp. 45-62). CABI Publishing: Oxford, UK.

- Solinas, M. (1987). HRGC analysis of phenolic components in virgin olive oils in relation to the ripening and the variety of olives. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 64, 255-262.
- Shahidi, F., & Wanasundara, U. N. (2002). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*, 17, 387-403.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: measurement methods. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Shahidi, F., Zhong, H. J., & Ambigaipalan, P. (2005). Antioxidants: regulatory status. *Bailey's industrial oil and fat products*, 1-21.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- Semb, T. N. (2012). *Analytical methods for determination of the oxidative status in oils* (Master's thesis, Institutt for bioteknologi).
- Shukla, V.K.S. and Bhattacharya, K. 2004. Enhancing stability of natural oils and butters with rosemary extracts. *Cosmet. Toiletries Mag.* 119, 5–6.
- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual review of plant biology*, 42(1), 145-188
- Schaich KM (1992) Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. *Lipids*. 27(3), 209- 218
- Schafer, F. Q., Qian, S. Y., & Buettner, G. R. (2000). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46.3 657.
- Servili, M., Montedoro, G. F., Pannelli, G., & Famiani, F. (1990). Influenza delle variabili pedologiche, tecnologiche e varietali sulla qualità degli oli vergini di oliva. *Atti del Convegno ‘Problematice qualitative dell’olio di oliva’*, Sassari, 231-245
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. *Food Chemistry*, 45(2), 141-144.
- Tena N (2010) Evolution of major and minor components of thermoxidised olive oils: implementation of spectroscopic and chromatographic methods. Ph.D. thesis, University of Seville
- Tseng, Y. C., Moreira, R., & Sun, X. (1996). Total frying-use time effects on soybean-oil deterioration and on tortilla chip quality. *International journal of food science & technology*, 31(3), 287-294.

Tang L, Zhang Y, Qian Z, Shen X (2000) The mechanism of Fe<sup>2+</sup> - initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochem J* 352:27-36

Tadolini B, Gabrini L, Menna C, Pinna GG, Hakim G (1997) Iron (III) stimulation of lipid hydroperoxide dependent lipid peroxidation. *Free Rad. Res.* 27:563-576.

Uriarte PS, Guillén MD (2010) Formation of toxic alkylbenzenes in edible oils submitted to frying temperature. Influence of oil composition in main components and heating time. *Food Res Internat* 43:2161–2170.

Varela, G. (1980). Nutritional aspects of olive oil in the frying process. In *Proceedings of the 3rd International Congress on the Biological Value of Olive Oil* (pp. 8-12).

Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.

Warner, K., Frankel, E. N., & Mounts, T. L. (1989). Flavor and oxidative stability of soybean, sunflower and low erucic acid rapeseed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(4), 558-564.

Wu CM, Chen SY (1992) Volatile compounds in oils after deep frying or stir frying and subsequent storage. *J Am Oil Chem Soc* 69:858–865.

Wang T, Hammond EG (2010) Lipoxygenase and lipid oxidation in foods. In: Decker EA, Elias RJ, McClements DJ (eds) *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*, vol 1, Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity. Woodhead Publishing, Cambridge, pp 105–121.

Yoon SH, Jung MY, Min DB (1988) Effects of thermally oxidized triglycerides on the oxidative stability of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 65:1652–1656.

Yin D, Lingnert H, Ekstrand B, Bruk UT (1992) Fenton reagents may not initiate lipid peroxidation in an emulsified linoleic acid model system. *Free Radical Biol & Med.* 13, 543-556.