

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΕΩΣ**

**Διερεύνηση της οξειδωτικής σταθερότητας  
των λιπιδίων και των πρωτεϊνών κρέατος χοίρου  
μετά από προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΥΡΩΠΗ Ν. ΜΠΟΤΣΟΓΛΟΥ**

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2013**

**ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- A. Γκόβαρης, καθηγητής (επιβλέπων)
- I. Αμβροσιάδης, καθηγητής (μέλος)
- Γ. Παπαγεωργίου, ομότιμος καθηγητής (μέλος)

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- A. Γκόβαρης, καθηγητής
- I. Αμβροσιάδης, καθηγητής
- Γ. Παπαγεωργίου, ομότιμος καθηγητής
- Δ. Φλετούρης, αναπλ. καθηγητής
- Η. Παπαπαναγιώτου, επίκουρος καθηγητής
- Σ. Ηλιάδης, επίκουρος καθηγητής
- A. Πεξαρά, λέκτορας

Περιεχόμενα	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	16
A. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ	16
1. Ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου	16
2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου στο κρέας	21
3. Οξείδωση λιπιδίων	24
3.1 Αυτοξείδωση των PUFAs	24
3.1.1 Προϊόντα της αυτοξείδωσης των (PUFAs)	27
3.2 Φωτοευαισθητοποιημένη οξείδωση των λιπιδίων	31
3.2.1 Προϊόντα της φωτοευαισθητοποιημένης οξείδωσης των λιπιδίων	31
4. Επίδραση της οξείδωσης των λιπιδίων στην ποιότητα του κρέατος	32
5. Μέθοδοι εκτίμησης της οξείδωσης των λιπιδίων	33
5.1 Μέθοδος αριθμού υπεροξειδίων	34
5.2 Μέθοδος συζευγμένων διενίων	36
5.3 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (μηλονική διαλδεύδη)	37
5.4 Μέθοδος εξανάλης	40
6. Οξείδωση πρωτεϊνών	40
6.1 Μηχανισμός οξείδωσης των πρωτεϊνών του κρέατος	41
6.2 Ο ρόλος των λιπιδίων στην οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος	44
6.3 Προϊόντα της οξείδωσης των πρωτεϊνών	46
7. Επίδραση της οξείδωσης των πρωτεϊνών στην ποιότητα του κρέατος	51
7.1 Τεχνολογικές ιδιότητες	51
7.2 Θρεπτικές ιδιότητες	53
7.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	55
8. Μέθοδοι εκτίμησης της οξείδωσης των πρωτεϊνών	56
8.1 Μέθοδος προσδιορισμού των καρβονυλικών ομάδων	57
8.2 Μέθοδος μέτρησης της α-αμινοαδипικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεύδης	58
8.3 Μέθοδος προσδιορισμού των σουλφυδρυλικών ομάδων	59
9. Παράγοντες που επιταχύνουν την ταχύτητα της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος	59

9.1 Φρεσκότητα του κρέατος	60
9.2 Μέγεθος των τεμαχιδίων του κρέατος	60
9.3 Περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα	61
9.4 Παρουσία μεταλλικών ιόντων	62
9.5 Τιμή pH	64
9.6 Περιεκτικότητα σε αλάτι	64
9.7 Συγκέντρωση του οξυγόνου	65
9.8 Ενεργότητα του νερού	66
9.9 Θερμοκρασία μαγειρέματος και συντήρησης	67
9.10 Μέθοδοι ακτινοβόλησης και υψηλής υδροστατικής πίεσης	68
10. Μέθοδοι προστασίας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος και των προϊόντων του από την οξείδωση	69
10.1 Διατροφικές μέθοδοι	70
10.2 Τεχνολογικές μέθοδοι	72
11. Αντιοξειδωτικές ουσίες ως προσθετικά τροφίμων. Ταξινόμηση και μηχανισμοί δράσης	77
11.1 Πρωτοταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες	78
11.2 Δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες	80
11.2.1 Ενώσεις που συμπλέκονται με μεταλλικά ιόντα	81
11.2.2 Ενώσεις που εκκαθαρίζουν το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης	81
11.2.3 Αναγωγικές ενώσεις που δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο	82
11.2.4 Ενώσεις που δρουν με διάφορους μηχανισμούς δράσης	83
12. Αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών	84
13. Αντιοξειδωτικές ουσίες και ανθρώπινος οργανισμός	85
14. Φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες	86
15. Πολυφαινολικές ενώσεις των φυτών	89
15.1 Φαινολικά οξέα	90
15.2 Φλαβονοειδή	92
15.3 Ταννίνες	97
16. Εκχύλιση των πολυφαινολικών ουσιών των φυτών	97
17. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των φυτών	100
18. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών	102

19. Η σημασία των πολυφαινολών στην υγεία του ανθρώπου	104
<b>B. ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ</b>	107
20. Η Ελιά	107
20.1 Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς	107
20.2 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς	108
20.3 Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς	110
21. Τα φύλλα της ελιάς	113
21.1 Χαρακτηριστικά των φύλλων της ελιάς	114
21.2 Τα φύλλα της ελιάς ως πηγή βιοδραστικών ουσιών	115
21.3 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε πολυφαινολικές ουσίες	117
21.4 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε флаβονοειδή	121
21.5 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε σεκοϊριδοειδή και παράγωγά τους	121
21.6 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε άλλα βιοδραστικά συστατικά	124
22 Μέθοδοι παραλαβής των βιοδραστικών συστατικών	125
23 Μέθοδοι προσδιορισμού των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων	128
23.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολών	128
23.2 Προσδιορισμός ολικών флаβονοειδών	129
23.3 Προσδιορισμός των επιμέρους φαινολικών συστατικών	129
24. Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς	130
25. Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων	133
<b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ</b>	135
<b>A. ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ-Διερεύνηση της δυνατότητας     παρασκευής εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με αντιοξειδωτικές ιδιότητες</b>	136
1. Υλικά και μέθοδοι	136
1.1. Διαλύτες και αντιδραστήρια	136
1.2. Φυτικό υλικό	136
1.3. Χημική ανάλυση (Proximate analysis) των φύλλων της ελιάς	136
1.4. Ξήρανση, άλεση και αποθήκευση των φύλλων της ελιάς	137
1.5. Εκχύλιση των φύλλων ελιάς	137
1.6. Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς	139
1.7. Προσδιορισμός ολικών флаβονοειδών στα εκχυλίσματα των φύλλων	

της ελιάς	140
1.8. Προσδιορισμός ολικών φλαβονολών (κατεχίνη και επικατεχίνη) στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς	140
1.9. Υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς	141
1.10. Προσδιορισμός της α-τοκοφερόλης σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς	142
1.11. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φύλλων Ελιάς με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH <sup>•</sup>	142
1.12. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φύλλων Ελιάς με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS <sup>•+</sup>	143
1.13. Στατιστική ανάλυση	144
2. Αποτελέσματα και συζήτηση	145
2.1. Συλλογή των φύλλων	145
2.2. Επεξεργασία και αποθήκευση των φύλλων	145
2.3. Εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς	147
2.4. Χημική σύσταση των φύλλων της ελιάς	151
2.5. Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε ολικές πολυφαινόλες, ολικά φλαβονοειδή, ολικές φλαβανόλες και α-τοκοφερόλη	152
2.6. Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε επιμέρους φαινολικά συστατικά με υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων	153
2.7. Αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της ελιάς	159
B. ΔΕΥΤΕΡΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ-Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε α-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C	161
1. Υλικά και μέθοδοι	161
1.1. Διαλύτες και αντιδραστήρια	161
1.2. Εκχύλισμα φύλλων ελιάς	161
1.3. Χοίροι και σιτηρέσια	162
1.4. Βασική χημική ανάλυση (Proximate analysis) του χοιρινού κρέατος	163
1.5. Προσδιορισμός της σύνθεσης του χοιρινού κρέατος σε λιπαρά οξέα	163
1.6. Παρασκευή των χοιρινών μπιφτεκιών και πειραματικός σχεδιασμός	164
1.7. Μετρήσεις pH και ικανότητας συγκράτησης ύδατος	166
1.8. Μέτρηση του χρώματος των μπιφτεκιών	166

1.9. Προσδιορισμός των συζευγμένων διενίων	166
1.10. Προσδιορισμός των υδροϋπεροξειδίων	167
1.11. Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεύδης	167
1.12. Προσδιορισμός των καρβονυλίων των πρωτεϊνών	168
1.13. Προσδιορισμός των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών	169
1.14. Προσδιορισμός της α-τοκοφερόλης	169
1.15. Οργανοληπτική αξιολόγηση	170
1.16. Στατιστική ανάλυση	170
2. Αποτελέσματα και συζήτηση	171
2.1. Επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των ζωοτροφών στη βασική χημική σύσταση, στο pH και στην απώλεια υγρών του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων	171
2.2 Επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των χοιροτροφών στη σύσταση σε λιπαρά οξέα του επιμήκη ραχιαίου των χοίρων	172
2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο pH νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνταν στους 4 °C	174
2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνταν στους 4 °C	174
2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	177
2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	179
2.7. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	181
2.8. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	185
2.9. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	188
Γ. ΤΡΙΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ-Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών ψημένων χοιρινών μπιφτεκίων που ήταν εμπλουτισμένα σε α-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C	192
1. Υλικά και μέθοδοι	192

2. Αποτελέσματα και συζήτηση	192
2.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο pH ψητών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C	192
2.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο των χοιρινών μπιφτεκιών	193
2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα των ψητών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C	194
2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	196
2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε ψητά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	198
2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης σε ψητά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	199
2.7. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων σε ψητά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	201
2.8. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων σε ψητά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C	204
2.9. Οργανοληπτική ανάλυση νωπών χοιρινών μπιφτεκιών όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις ζωοτροφές και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και α-τοκοφερόλης στον κιμά	206
Δ. ΤΕΤΑΡΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ-Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξειδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών κατεψυγμένων χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε α-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν σε κατάψυξη	208
1. Υλικά και μέθοδοι	208
2. Αποτελέσματα και συζήτηση	208
2.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στη χρώση (L*, a*, b*) νωπών μπιφτεκιών που συντηρούνταν σε κατάψυξη στους -18 °C	208
2.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν	



σε κατάψυξη επί 180 ημέρες	211
2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες	212
2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες	214
2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες	216
2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες	217
2.7. Οργανοληπτική ανάλυση κατεψυγμένων χοιρινών μπιφτεκίων όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις χοιροτροφές και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και $\alpha$ -τοκοφερόλης στον κιμά	219
E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	222
Z. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	233
H. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	234
Θ. ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	236
I. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	238

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη, που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πραγματοποιήθηκε με στόχο τη διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του χοιρινού κρέατος.

Ευχαριστώ ολόθερμα τον καθηγητή κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Επιβλέποντα Καθηγητή της διατριβής μου, για την καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση της διατριβής με την ουσιαστική επίβλεψη και καθοδήγησή του, τις πολυδιάστατες συμβουλές του, το ενδιαφέρον του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον ομότιμο καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαγεωργίου του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διατριβής μου, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και συμβουλές του κατά τη διάρκεια της διατριβής μου, τη συμπαράστασή του και το ενδιαφέρον του.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ιωάννη Αμβροσιάδη, διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διατριβής μου, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του, τις εύστοχες διορθώσεις στο δοκίμιο της διατριβής και το ενδιαφέρον του στα πλαίσια της ενλόγω μελέτης.

Θεωρώ, επίσης, υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Φλετούρη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και μέλος της επταμελούς εξεταστικής Επιτροπής, για τις εύστοχες υποδείξεις του στη διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων, την αμέριστη καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, επίσης, στον επίκουρο καθηγητή κ. Σταύρο Ηλιάδη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και μέλος της επταμελούς εξεταστικής Επιτροπής, για την βοήθειά του στη διενέργεια των βιοχημικών αναλύσεων στα πλαίσια της ενλόγω μελέτης.

Επιπλέον, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Ηλία Παπαπαναγιώτου

του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και μέλος της επταμελούς εξεταστικής Επιτροπής, καθώς και την κ. Ανδρεάνα Πεξάρá λέκτορα του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της επταμελούς εξεταστικής Επιτροπής, για τις εύστοχες υποδείξεις τους και την όλη συνδρομή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και ιδιαίτερα τον πατέρα μου ομότιμο καθηγητή του Εργαστηρίου Διατροφής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Νικόλαο Μπότσογλου, για τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις, τη συνεχή υποστήριξη και την ηθική συμπαράσταση.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξειδωση των λιπιδίων είναι μια από τις κυριότερες αιτίες υποβάθμισης της ποιότητας των κρεάτων και των κρεατοσκευασμάτων κατά την συντήρησή τους. Οδηγεί σε παραγωγή δυσάρεστης οσμής και γεύσης, χαρακτηριστικών που είναι ευρύτερα γνωστά ως τάγγισμα. Το τάγγισμα αρχίζει σύντομα μετά τη θανάτωση του ζώου και συνοδεύεται από ελάττωση της συγκέντρωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μείωση βιταμινών και χρωστικών, καθώς και σχηματισμό αλδευδών, κετονών, αλκοολών και άλλων ουσιών με μικρό μοριακό βάρος. Η πιθανότητα, μάλιστα, τα προϊόντα οξειδωσης να είναι τοξικά για τον άνθρωπο, αποτελεί απειλή στην εικόνα της υγιεινής του κρέατος μιας και οι καταναλωτές ζητούν όσον το δυνατόν πιο υγιεινές και ασφαλείς τροφές (Addis 1986). Το τάγγισμα επιδρά επίσης αρνητικά στη χρώση, την υφή και τη θρεπτική αξία του κρέατος. Αυτό παρατηρείται μετά από πολυήμερη συντήρηση υπό ψύξη, κατάψυξη και απόψυξη, καθώς επίσης και μετά από θερμική κατεργασία και συντήρηση υπό ψύξη. Επιπλέον, η μηχανική αποστείωση και οι άλλοι χειρισμοί στο σφάγιο που εκθέτουν τα λιπίδια στην επίδραση του οξυγόνου, προκαλούν επιτάχυνση της οξειδωσης. Το πρόβλημα του ταγγίσματος καθίσταται οξύτερο στις μέρες μας μετά τη διάθεση στην κατανάλωση κρεάτων με αυξημένη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι πολύ περισσότερο ευάλωτα σε οξειδωση.

Μολονότι η οξειδωση των λιπιδίων του κρέατος και οι τρόποι αντιμετώπισής της έχουν ευρύτατα διερευνηθεί, έχει γίνει μέχρι τώρα ελάχιστη έρευνα σχετικά με την οξειδωση των πρωτεϊνών του κρέατος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η γνώση μας όσον αφορά τις αρνητικές επιπτώσεις της οξειδωσης των πρωτεϊνών στην ποιότητα του κρέατος να είναι σχετικά περιορισμένη. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες σε μοντέλα τροφίμων υποδεικνύουν ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές της διαλυτότητας, της πυκνότητας, της ενυδάτωσης καθώς και της ικανότητάς τους στο σχηματισμό ζελατίνης και γαλακτωμάτων που μπορεί να προκαλέσουν ελάττωση της τρυφερότητας και της ευχυμίας του κρέατος και ακόμη να επηρεάσουν αρνητικά την οσμή και τη χρώση του.

Με σκοπό την παρεμπόδιση της διαδικασίας της οξειδωσης, φαινολικές συνθετικές ουσίες όπως το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο και η βουτυλοϋδροξυανισόλη έχουν εγκριθεί εδώ και πολλά χρόνια και προστίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις για τον έλεγχο της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε κρέατα και προϊόντα κρέατος που συντηρούνται σε ψύξη (Okada et al. 1990). Οι επιφυλάξεις όμως που διατυπώθηκαν τα τελευταία χρόνια σχετικά με την πιθανότητα καρκινογόνου δράσης των ουσιών αυτών (Namiki 1990, Pokorny 1997).

προκάλεσαν μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με την ανεύρεση εναλλακτικών φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών για τη συντήρηση των τροφίμων, όπως η βιταμίνη E, τα καροτένια, η βιταμίνη C, η καρνοσίνη και διάφορα εκχυλίσματα βοτάνων (Wong et al. 1995, Jensen et al. 1998, O'Neill et al. 1998).

Η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς για τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας του παραγόμενου κρέατος, είναι ένα θέμα που δεν έχει ακόμη επαρκώς διερευνηθεί. Τα φύλλα της ελιάς μπορεί να θεωρηθούν ως μια πολύ πλούσια πηγή βιολογικά δραστικών πολυφαινολικών ενώσεων που το σύνολό τους μπορεί να φτάσει έως τα 40 g/kg ξηρής ουσίας (Silva et al. 2006). Μεταξύ αυτών κύρια συστατικά είναι η ελαιοευρωπαϊνή, που είναι ο γλυκοζίδης του εστέρα της υδροξυτυροσόλης με ελενολικό οξύ και συνιστά το πικρό συστατικό που απομακρύνεται κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου, καθώς και η υδροξυτυροσόλη που είναι προϊόν υδρόλυσης της ελαιοευρωπαϊνής (Jaron-Lujan et al. 2006). Οι δύο αυτές φαινολικές ουσίες θεωρείται ότι προσδίδουν στο δέντρο της ελιάς ανθεκτικότητα έναντι προσβολών από έντομα και βακτήρια.

Στα φύλλα της ελιάς ανευρίσκονται και διάφορες άλλες φαινολικές ενώσεις που είναι κυρίως φλαβονοειδή και γλυκοζίτες τους όπως η απιγενίνη, το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το ελενολικό οξύ, το βανιλινικό οξύ, η εσπεριδίνη, η λουτεολίνη, η κερκετίνη και η ρουτίνη (Ryan et al. 2002). Η παρουσία όλων αυτών των φαινολικών ενώσεων, που ανέρχονται τουλάχιστον σε 35, είναι ίσως η αιτία που διάφορα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς παρουσίασαν σε σχετικές εργασίες με μοντέλα τροφίμων μεγαλύτερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση από εκείνη που παρουσίασε μεμονωμένα η βιταμίνη E, το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο, ή οι αντίστοιχες ποσότητες ελαιοευρωπαϊνής και υδροξυτυροσόλης αθροιστικά (Le Tutour & Guedon 1992, Benavente-Garcia et al. 2000, Briante et al. 2002). Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν επίσης παρουσιάσει σημαντική *in vitro* αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών μικροοργανισμών (Bisignano et al. 2001, Markin et al. 2003).

Η βιομηχανία επεξεργασίας των καρπών της ελιάς, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς, δημιουργεί μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων φύλλων ελιάς αφού υπολογίζεται ότι τα φύλλα της ελιάς αποτελούν περίπου το 10% του ολικού βάρους των καρπών της ελιάς που προσκομίζονται στα εργοστάσια για επεξεργασία (Kiritsakis 1998). Ακόμη εκτιμάται ότι από το κλάδεμα και μόνο των ελαιόδένδρων παράγονται ετησίως περίπου 25 κιλά ανά δένδρο υπολειμμάτων που αποτελούνται από φύλλα και μικρά κλωνάρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περιοχή της Μεσογείου

καλλιεργούνται περίπου οχτώ εκατομμύρια εκτάρια ελαιοδένδρων που αποτελούν το 98% της παγκόσμιας παραγωγής (Kiritsakis 1998).

Παρά το γεγονός ότι τα φύλλα της ελιάς μπορεί να αποτελέσουν μια άφθονη και φθηνή πρώτη ύλη για παρασκευή βιολογικά δραστικών εκχυλισμάτων με χρήση μη τοξικών και χαμηλού κόστους διαλυτών, το θέμα αυτό άρχισε να απασχολεί τους ερευνητές μόλις πολύ πρόσφατα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι όλες σχεδόν οι μέχρι τώρα ερευνητικές προσπάθειες που είχαν εστιαστεί στη μεθοδολογία παραλαβής από τα φύλλα ελιάς χημικά καθαρής ελαιοευρωπαϊνης έδειχναν ότι όλες σχεδόν οι τεχνικές αυτές είναι εξαιρετικά δαπανηρές.

Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής είναι η διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με στόχο τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του χοιρινού κρέατος. Η διατριβή αυτή ολοκληρώθηκε σε 4 φάσεις:

- Στην πρώτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα βελτιστοποίησης της διαδικασίας παραλαβής των αντιοξειδωτικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς με σκοπό την παρασκευή εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Στη δεύτερη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C.
- Στην τρίτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C.
- Στην τέταρτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν σε κατάψυξη.

Η διατριβή αυτή παρουσιάζεται στο παρόν πόνημα σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος γίνεται ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με την οξείδωση των λιπιδίων, τις μεθόδους εκτίμησης της οξείδωσης των λιπιδίων, την οξείδωση των πρωτεϊνών, τις μεθόδους εκτίμησης της οξείδωσης των πρωτεϊνών, τους παράγοντες που επιταχύνουν την ταχύτητα της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος και τις μεθόδους για

την προστασία των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος και των προϊόντων του από την οξείδωση. Ακόμη, γίνεται αναφορά στα φύλλα της ελιάς ως πηγή βιοδραστικών ουσιών, την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς και τις μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η δική μας έρευνα, εκθέτονται τα αποτελέσματα, γίνεται συζήτηση των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται τα συμπεράσματα και διατυπώνονται προτάσεις.

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

#### A. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ

Οι αλλοιώσεις της χημικής σύστασης των πρώτων υλών των τροφίμων που προκαλούνται από την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τόσο την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων όσο και τη διάρκεια συντήρησης. Οι αλλοιώσεις αυτές προχωρούν με αλυσιδωτές αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται κυρίως οι ελεύθερες ρίζες.

#### 1. Ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου

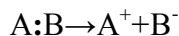
Στις ενώσεις με ένα κανονικό ομοιοπολικό δεσμό, τα δύο ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε ένα μοριακό τροχιακό είναι *συζευγμένα* και έχουν *αντιπαράλληλο σπιν* που συμβολίζεται ( $\uparrow\downarrow$ ). Στις ελεύθερες ρίζες, αντίθετα, ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια σε ένα ή περισσότερα ατομικά ή μοριακά τροχιακά είναι *ασύζευκτα* και έχουν *παράλληλο σπιν* που συμβολίζεται ( $\uparrow\uparrow$ ). Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell & Gutteridge 1990). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο προσδίδει συνήθως στις ελεύθερες ρίζες μεγάλη χημική δραστηριότητα (Halliwell 1999) και συμβολίζεται συνήθως με μία τελεία στο επάνω δεξιό μέρος του χημικού τύπου ( $P^\bullet$ ). Στις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνονται το άτομο του υδρογόνου (H) που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, το μόριο του οξυγόνου ( $O_2$ ) που έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, το οξείδιο του αζώτου (NO) που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, καθώς και τα περισσότερα μεταβατικά μέταλλα, όπως ο  $Fe^{2+}$  και ο  $Fe^{3+}$  που έχουν αντίστοιχα 4 και 5 ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ο  $Cu^{2+}$  που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από πηγές ενέργειας οι οποίες είναι αρκετά ισχυρές ώστε να ελευθερώνουν ένα ηλεκτρόνιο από την σταθερή του διαμόρφωση. Τέτοιες πηγές μπορεί να είναι η υπεριώδης ή η θερμική ακτινοβολία, οποιαδήποτε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλής συχνότητας, καθώς και η βιοχημική ενέργεια. Με τη δράση των πηγών αυτών, οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται από ομολυτική διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού ή με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

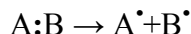
Η ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού απαιτεί, γενικά, για να γίνει μεγάλη ποσότητα ενέργειας, όπως είναι αυτή που περιέχεται στις ακτινοβολίες ιοντισμού, στις ακτινοβολίες UV και στη θερμότητα. Κατά την ομολυτική διάσπαση, ο ομοιοπολικός



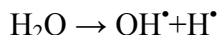
δεσμός διασπάται και το ζεύγος των ηλεκτρονίων του ομοιοπολικού δεσμού αντί να παραμείνει στο ένα από τα δύο άτομα και να σχηματιστούν τα αντίστοιχα ιόντα, όπως στην ετερολυτική διάσπαση,



κατανέμεται εξίσου σε καθένα από τα δύο άτομα που μετατρέπονται έτσι σε ελεύθερες ρίζες,

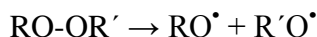


Έτσι, η πρόσπτωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας υψηλής συχνότητας σε υδατικά διαλύματα μπορεί να προκαλέσει ομολυτική διάσπαση του νερού και παραγωγή ελευθέρων ριζών υδρογόνου και υδροξυλίου. Οι ρίζες αυτές μπορούν να αντιδράσουν εύκολα με γειτονικά μόρια που είναι διαλυμένα στο νερό και να προκαλέσουν το σχηματισμό νέων ριζών (Wilson 1978),



Επίσης, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) όταν προσπέσει σε βιολογικά υγρά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών με ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού. Η διάσπαση του δεσμού C-C απαιτεί ενέργεια περίπου 350 kJ/mole που αντιστοιχεί σε UV ακτινοβολία περίπου 300 nm.

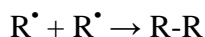
Η θερμότητα μπορεί επίσης να προκαλέσει ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού και επομένως να συμβάλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών:

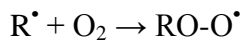


Γενικά, για τη διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες (450-600 °C). Ορισμένοι όμως ομοιοπολικοί δεσμοί, όπως αυτοί που περιέχονται σε ορισμένες αζωενώσεις, δεν είναι τόσο ισχυροί και μπορούν να διασπαστούν ομολυτικά ακόμη και σε θερμοκρασία 30-50 °C. Ουσίες που περιέχουν τέτοιους δεσμούς χρησιμοποιούνται συχνά ως εκκινητές αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Τέτοιες ουσίες είναι οι αζωενώσεις (R-N=N-R) που διασπώνται μονομοριακά και παράγουν ένα μόριο αζώτου και δύο ρίζες με κέντρο τον άνθρακα (R<sup>•</sup>),

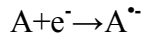


Οι ρίζες με κέντρο τον άνθρακα που σχηματίζονται σε ζεύγη, βρίσκονται πάρα πολύ κοντά μεταξύ τους, γι' αυτό μερικές ανασυνδέονται και σχηματίζουν σταθερά προϊόντα, ενώ πολλές από αυτές διαχέονται χωριστά, αντιδρούν γρήγορα με μοριακό οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες (ROO<sup>•</sup>),

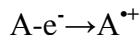




Κατά τις οξειδοαναγωγικές, πάλι, αντιδράσεις στις οποίες, γενικά, δεν απαιτείται μεγάλη ενέργεια, παράγονται ελεύθερες ρίζες με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου (αντίδραση αναγωγής) σε ένα κανονικό μόριο,



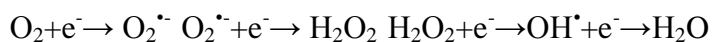
ή αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου (αντίδραση οξείδωσης) από ένα κανονικό μόριο. Οι οξειδοαναγωγικές, αυτές, αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα ή από μέταλλα,



**Πίνακας 1.** Ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

Ελεύθερες ρίζες	Άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου
Ανιόν του σουπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\bullet -}$ ) (Superoxide radical)	Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Hydrogen peroxide)
Υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^{\bullet}$ ) (Hydroperoxyl radical)	Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ) (Singlet oxygen)
Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ) (Hydroxyl radical)	Όζον ( $O_3$ ) (Ozon)
Υπεροξειδική ρίζα ( $ROO^{\bullet}$ ) (Peroxyl radical)	Υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ) (Hypochlorous acid)
Αλκοξειδική ρίζα ( $RO^{\bullet}$ ) (Alcoxyl radical)	Υδροϋπεροξειδία ( $ROOH$ ) (Hydroperoxides)
Ρίζα του οξειδίου του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) (Nitric oxide)	Υπεροξνιτρώδες ανιόν ( $ONOO^{\bullet -}$ ) (Peroxynitrite)

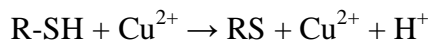
Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ελεύθερες ρίζες καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, που δεν είναι υποχρεωτικά ελεύθερες ρίζες, και σχηματίζονται σε βιολογικά συστήματα. Οι δραστικές αυτές μορφές είναι ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή κατά την οποία προσθέτονται ένα, δύο ή τρία ηλεκτρόνια, καθώς και ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Halliwell 1999). Έτσι, τόσο η ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\bullet -}$ ), όσο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) καθώς και η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ) μπορούν να θεωρηθούν δραστικές μορφές οξυγόνου γιατί παράγονται με αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από ένα, δύο ή τρία ηλεκτρόνια, αντίστοιχα,



Στις δραστικές μορφές οξυγόνου συγκαταλέγονται επίσης το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ) και

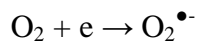
το όζον (O<sub>3</sub>), γιατί μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Στα βιολογικά συστήματα, εκτός από τις ρίζες οξυγόνου μπορούν να σχηματιστούν και πολλές άλλες ρίζες. Έτσι, ρίζες με κέντρο τον άνθρακα (C) είναι σημαντικές ενδιάμεσες ενώσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσις, ενώ ενώσεις που περιέχουν την σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) οξειδώνονται με την παρουσία μεταβατικών μετάλλων και δίνουν τις θειωλικές ρίζες (R-S<sup>•</sup>) που έχουν ως κέντρο το θείο (Παπαγεωργίου 2005)

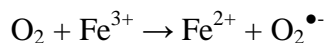


Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως ιδιαίτερα να σχολιαστεί η οξειδωτική ικανότητα του μοριακού οξυγόνου (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) το οποίο, μολονότι έχει άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων, έχει ασυνήθιστη μοριακή δομή γιατί δύο από τα ηλεκτρόνια του είναι ασύζευκτα με παράλληλη στροφορμή σε δύο διαφορετικά μοριακά τροχιακά. Έτσι, το μοριακό οξυγόνο, παρόλο που είναι ρίζα (O-O), παρουσιάζει περιορισμένη οξειδωτική ικανότητα αφού τα ηλεκτρόνια για να συζευχθούν θα πρέπει να αποσπαστούν από ένα άλλο άτομο ή μόριο δύο άλλα ηλεκτρόνια που να έχουν και αυτά παράλληλη στροφορμή. Ωστόσο, τα περισσότερα άτομα ή μόρια έχουν στο ατομικό ή μοριακό τους τροχιακό ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με αντιπαράλληλη στροφορμή. Όταν λοιπόν το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με άτομα ή μόρια που έχουν αντιπαράλληλο spin, έχει την τάση να πάρει ένα μόνο ηλεκτρόνιο. Θερμοδυναμικά όμως η αναγωγή ενός ηλεκτρονίου είναι δυσμενής και έτσι περιορίζεται και πάλι η οξειδωτική ικανότητα του μοριακού οξυγόνου.

Το μοριακό οξυγόνο μπορεί να αναχθεί από ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματιστεί το ανιόν της ρίζας του σουπεροξειδίου του οξυγόνου (O<sub>2</sub>).

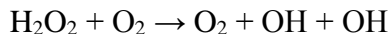


Σε οργανικούς διαλύτες, το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> είναι ισχυρή βάση και ισχυρό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο. Σε υδατικά διαλύματα, όμως, είναι λιγότερο δραστικό, αν και μπορεί να δράσει ως ασθενές οξειδωτικό αντιδραστήριο σε ενώσεις όπως είναι το ασκορβικό οξύ και οι θειόλες. Ως αναγωγικό αντιδραστήριο είναι περισσότερο δραστικό και ανάγει τις ενώσεις του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή σίδηρο,

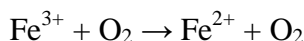


Το μοριακό οξυγόνο μπορεί, επίσης, να αναχθεί από δύο ηλεκτρόνια και να σχηματιστεί υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο, όμως, στα βιολογικά συστήματα παράγεται, συνήθως, από O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Δύο μόρια O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, όπως είδαμε παραπάνω, μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους αυθόρμητα ή ενζυμικά παρουσία της δεσμουτάσης του σουπεροξειδίου και να σχηματίσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που δεν έχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έτσι δεν είναι

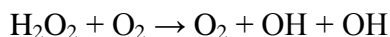
ελεύθερη ρίζα, μπορεί εύκολα να διασπαστεί, ειδικά παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων, και να σχηματίσει την υδροξυλική ρίζα (OH). Στα βιολογικά συστήματα, η ρίζα OH μπορεί, ακόμη, να παραχθεί από διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με O<sub>2</sub> ή και με ιόντα μεταβατικών μετάλλων,



Η τελευταία αντίδραση ονομάζεται αντίδραση Fenton (Fenton 1894). Λαμβάνοντας υπόψη την αντίδραση αυτή, καθώς και το γεγονός ότι το O<sub>2</sub> μπορεί να δώσει ένα ηλεκτρόνιο στο F<sup>3+</sup> ανακυκλώνοντας την αναγωγική μορφή του (Fe<sup>2+</sup>)



προκύπτει από το άθροισμα των παραπάνω αντιδράσεων η αντίδραση Haber-Weiss



Λαμβάνοντας υπόψη ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχηματίζεται από το O<sub>2</sub>, ο συνδυασμός των δύο παραπάνω αντιδράσεων δείχνει ότι ίχνη ιόντων σιδήρου (Fe<sup>2+</sup> ή Fe<sup>3+</sup>) μπορούν να καταλύσουν μεγάλες ποσότητες O<sub>2</sub> προς OH. Επομένως, ο σίδηρος και γενικότερα τα μεταβατικά μέταλλα διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ριζών του υδροξυλίου.

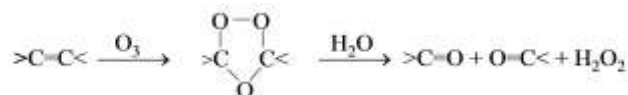
Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο θα μπορούσε να παρακαμφθεί ο περιορισμός της οξειδωτικής ικανότητας του μοριακού οξυγόνου είναι η μετακίνηση ενός από τα δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια του σε μια άλλη στιβάδα. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται το μονήρες οξυγόνο (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα, επειδή όλα τα ηλεκτρόνια του είναι συζευγμένα. Παρόλα αυτά, επειδή βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση, είναι περισσότερο δραστικό από το μοριακό οξυγόνο.

Η μετάβαση του μοριακού οξυγόνου στη διεγερμένη κατάσταση (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλες χρωστικές ουσίες, οι οποίες φθορίζουν με την παρουσία του μοριακού οξυγόνου (Foote et al. 1985). Οι χρωστικές αυτές ουσίες, που ονομάζονται φωτοευαισθητοποιητές, όταν απορροφήσουν ακτινοβολία από συγκεκριμένο μήκος κύματος μεταβαίνουν από τη βασική κατάσταση στη διεγερμένη απλή και, στη συνέχεια, στην τριπλή κατάσταση που έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και μπορεί να προκαλέσει στα βιολογικά συστήματα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

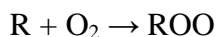
Ο σχηματισμός της διεγερμένης κατάστασης του οξυγόνου είναι πιθανόν να συμβεί σε πολλά συστήματα χρωστικών που είναι εκτεθειμένα στο φως. Τέτοια παραδείγματα είναι οι

φακοί των ματιών και οι χλωροπλάστες (Zigler & Goosey 1981, Halliwell 1984). Στο σχηματισμό υπερβολικά μεγάλων ποσοτήτων  $^1\text{O}_2$  μπορούν να οδηγήσουν και ορισμένες ασθένειες, όπως είναι οι πορφυρίες, που είναι συνήθως γενετικές ανωμαλίες στο μεταβολισμό των πορφυρινών. Η υπερπαραγωγή πορφυρινών και η εναπόθεσή τους στο δέρμα προκαλεί φωτοευαισθησία και καταστροφή του δέρματος από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται (Τρακατέλλης 1992). Μονήρες οξυγόνο μπορεί επίσης να σχηματιστεί ενζυμικά με τις υπεροξειδάσες, τις λιποοξυγονάσες, με την αντίδραση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με  $\text{HOCl}$  και με την αναπνευστική έκρηξη των φαγοκυτάρων (Steinbeck 1993).

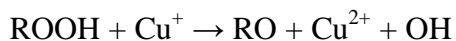
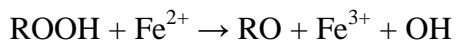
Σε αντίθεση με το μοριακό οξυγόνο που περιέχει δύο άτομα οξυγόνου, το μόριο του όζοντος περιέχει τρία άτομα οξυγόνου ( $\text{O}_3$ ), είναι διαμαγνητικό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το όζον προσβάλλει το διπλό δεσμό των λιπιδίων και σχηματίζει οζονίδια τα οποία υδρολύονται εύκολα σε τοξικές αλδεΐδες και υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell & Gutteridge 1999),



Το μοριακό οξυγόνο μπορεί, ακόμη, να προστεθεί σε οργανικές ελεύθερες ρίζες ( $\text{R}^\bullet$ ), δηλαδή σε ρίζες με κέντρο τον άνθρακα, και να σχηματιστούν υπεροξειδικές ρίζες ( $\text{ROO}$ )



Οι ρίζες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των κυττάρων, επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξειδίωση. Στο σημείο αυτό αξίζει, ίσως, ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός ότι ο δεσμός οξυγόνου-οξυγόνου ( $\text{O}-\text{O}$ ) μπορεί να διασπαστεί ομολυτικά σε ορισμένες περιπτώσεις και να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου πολύ πιο τοξικές από τις υπεροξειδικές ρίζες. Έτσι, ιόντα και σύμπλοκα μεταβατικών μετάλλων με την αναγωγική τους μορφή, όπως είναι ο  $\text{Fe}^{2+}$  και ο  $\text{Cu}^+$ , μπορεί να προκαλέσουν διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων ( $\text{ROOH}$ ) και να σχηματιστούν αλκοξυλικές ρίζες ( $\text{RO}$ )<sup>2</sup>,



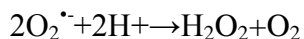
## 2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου στο κρέας

Το μοριακό οξυγόνο βρίσκεται στον ατμοσφαιρικό αέρα με τη μορφή του διατομικού μορίου του ( $\text{O}_2$ ), σε αναλογία 21%. Οι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο για να

οξειδώσουν τον άνθρακα και το υδρογόνο των τροφίμων, προκειμένου να λάβουν τη θερμική και χημική ενέργεια, που είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους (Freeman & Grapo 1981). Όμως, η φυσιολογική χρησιμοποίηση του οξυγόνου από τους ζωικούς οργανισμούς έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή διαφόρων ειδών ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου στα κύτταρα ως αποτέλεσμα του αερόβιου μεταβολισμού. Τα σημεία παραγωγής ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε όλα τα συστατικά των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, των λιποσωματιδίων και των μεμβρανών του κυτταροπλάσματος. Άλλες πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου είναι το ενδοπλασματικό δικτυωτό, οι πυρηνικές και οι κυτταρικές μεμβράνες.

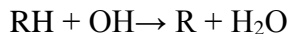
Τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα) ενεργοποιούνται όταν έρθουν σε επαφή με ξένα σωματίδια ή βακτήρια και αρχίζουν και προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου με στόχο την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου με τις οποίες καταστρέφουν τα παθογόνα μικρόβια. Οι ποσότητες οξυγόνου είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιούν τα μιτοχόνδριά τους για παραγωγή ενέργειας με οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η επιπλέον κατανάλωση οξυγόνου ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη. Οι δραστικές μορφές παράγονται από τέσσερα ένζυμα και συγκεκριμένα την NADPH οξειδάση, τη δεσμουτάση του σουπεροξειδίου, τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και την μυελοϋπεροξειδάση (Clark et al. 1990).

Ο σχηματισμός του  $O_2^{\cdot-}$  γίνεται αυθόρμητα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου το περιβάλλον είναι πλούσιο σε ηλεκτρόνια (Raha and Robinson, 2000). Εξαιτίας του γεγονότος ότι το  $O_2$ , όπως όλες οι ρίζες, παρουσιάζει την τάση να ζευγαρώνει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό του, όταν δυο ρίζες  $O_2^{\cdot-}$  βρεθούν σε υδατικό διάλυμα με ουδέτερο pH αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζεται  $H_2O_2$  που μεταβολίζεται σε νερό και οξυγόνο,

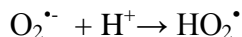


Αυτή η οξειδοαναγωγική αντίδραση μπορεί να γίνει είτε αυθόρμητα οπότε ολοκληρώνεται με αργούς ρυθμούς, ή να καταλυθεί ενζυμικά, πριν προκληθεί βλάβη στα κύτταρα, από την παρουσία της δεσμουτάσης του σουπεροξειδίου η οποία βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες μέσα στη μιτοχόνδρια ουσία (Fridovich 1995). Συνεπώς, η ημιπερίοδος ζωής του  $O_2^{\cdot-}$  εξαρτάται από την ενεργότητα του ενζύμου αυτού στα διάφορα κύτταρα. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι σε ένα βιολογικό σύστημα στο οποίο σχηματίζονται ρίζες  $O_2$  μπορεί, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται και  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  μπορεί εύκολα να διασπαστεί, ειδικά παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων, και να σχηματίσει την υδροξυλική ρίζα (HO) που είναι ιδιαίτερα δραστική αλλά και πολύ τοξική για τα κύτταρα αφού έχει την

ικανότητα να αφαιρεί υδρογόνο από γειτονικές οργανικές ενώσεις παράγοντας, έτσι, μία ποικιλία νέων ριζών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η αφαίρεση υδρογόνου από τα λιπίδια των μεμβρανών (RH) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ριζών με κέντρο τον άνθρακα (R) και την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης,



Επίσης, το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  παράγεται και ενδογενώς από φλαβοένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης που ενεργοποιείται κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση, καθώς και από άλλα ένζυμα όπως η λιποοξυγενάση, η κυκλοοξυγενάση και η NADPH-οξειδάση των φαγοκυττάρων (Zimmerman et al. 1994). Σε υδατικά, πάλι, διαλύματα και με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου, το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  μπορεί να μετατραπεί στην περισσότερο δραστική υδροξυπεροξειδική ρίζα ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ). Η τελευταία διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες, επειδή δεν έχει ηλεκτρικό φορτίο σε αντίθεση με το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  που έχει φορτίο (Breen et al. 1995),



Αντίθετα, το  $\text{O}_2$  περνά τις κυτταρικές μεμβράνες πάρα πολύ αργά, επειδή το αρνητικό του φορτίο περιορίζει πολύ τη διάχυση δια μέσου αυτών (Takahashi & Asada 1983). Φορτισμένα μόρια έχουν, γενικά, μικρότερη διαλυτότητα στα λιπίδια από εκείνα που δεν φέρουν φορτία. Έτσι τα μόρια αυτά διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες πολύ αργά, εκτός βέβαια αν υπάρχει κανάλι ανιόντων, όπως είναι αυτό που υπάρχει στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (Lynch & Fridovich 1978). Σε αυτή την περίπτωση το  $\text{O}_2$  μπορεί να περάσει από το κανάλι των ανιόντων από όπου περνούν τα χλωριούχα ιόντα ( $\text{Cl}^-$ ) και τα ανθρακικά ιόντα ( $\text{HCO}_3^+$ ).

Η σπουδαιότητα του ελευθέρου σιδήρου στην κατάλυση της οξειδωσης των λιπιδίων των μυών έχει επισημανθεί από τους Kanner et al. (1988). Μερικές υψηλού μοριακού βάρους πηγές σιδήρου όπως η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη, μπορούν απευθείας να καταλύουν την οξειδωση των λιπιδίων (Harel & Kanner 1985, Decker et al. 1993, Monahan et al. 1993). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου τα 2/3 της ολικής ποσότητας του σιδήρου του σώματος ανευρίσκονται στην αιμοσφαιρίνη και μικρότερες ποσότητες στη μυοσφαιρίνη. Μια μικρή ποσότητα σιδήρου υπάρχει επίσης στο μόριο διαφόρων ενζύμων και πρωτεϊνών όπως η τρανσφερίνη, η φερριτίνη και η αιμοσιδηρίνη. Ο σίδηρος που ελευθερώνεται από την φερριτίνη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, της κατεργασίας και της θέρμανσης είναι ίσως υπεύθυνος για την κατάλυση της οξειδωσης των λιπιδίων στο κρέας (Kanner & Doll 1991). Επισημαίνεται, πάντως, ότι η σχετική συνεισφορά των διαφόρων μορφών του σιδήρου στην κατάλυση της λιπιδικής υπεροξειδωσης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Decker

et al. 1993, Monahan et al. 1993).

Η φωτεινή ακτινοβολία μπορεί επίσης να προσδώσει αρκετή ενέργεια για την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Φαίνεται ότι το φως μπορεί να ενεργοποιεί τις χρωστικές του κρέατος και να ανυψώνει το οξυγόνο σε υψηλότερες στάθμες ενέργειας αυξάνοντας έτσι την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε οξειδώσεις (Jadhav et al. 1996). Σε ό,τι αφορά την επιτάχυνση της οξείδωσης, μερικά είδη φωτός όπως αυτό των λυχνιών φθορισμού, είναι πιο δραστικά από άλλα όπως αυτό των λυχνιών πυρακτώσεως.

Το οξυγόνο του αέρα μπορεί, επίσης, να επιταχύνει σημαντικά την οξείδωση. Μηχανικές κατεργασίες όπως είναι ο τεμαχισμός, η αποστέωση, η ανάμιξη και η αναδιαμόρφωση αυξάνουν την επιφάνεια της έκθεσης του κρέατος στον αέρα και επιταχύνουν, έτσι, σε μεγάλο βαθμό την οξείδωση (Kanner 1994).

### 3. Οξείδωση λιπιδίων

Η οξείδωση των λιπιδίων, ειδικότερα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στα ουδέτερα λιπίδια και τα φωσφολιπίδια, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων, γιατί συμβάλει στην εμφάνιση ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μειώνει τη διάρκεια συντήρησης και τη θρεπτική αξία τους και τελικά καθιστά τα τρόφιμα ακατάλληλα προς κατανάλωση. Στους ζωικούς οργανισμούς, η οξείδωση των PUFAs έχει, επιπλέον, συσχετιστεί με μία μεγάλη ποικιλία από παθολογικές καταστάσεις στις οποίες περιλαμβάνονται όλοι οι τύποι καρκίνου, οι ασθένειες του νευρικού, ανοσοποιητικού και γαστρεντερικού συστήματος, το σύνδρομο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης των νεφρών, της καρδιάς, του ήπατος, του εντέρου και του εγκεφάλου, κ.ά. (Cordis et al. 1993). Η οξείδωση των PUFAs λαμβάνει χώρα τόσο απουσία φωτός οπότε έχουμε το μηχανισμό της αυτοοξειδωσης, όσο και παρουσία φωτός, οπότε έχουμε το μηχανισμό της φωτοευαισθητοποιημένης οξείδωσης.

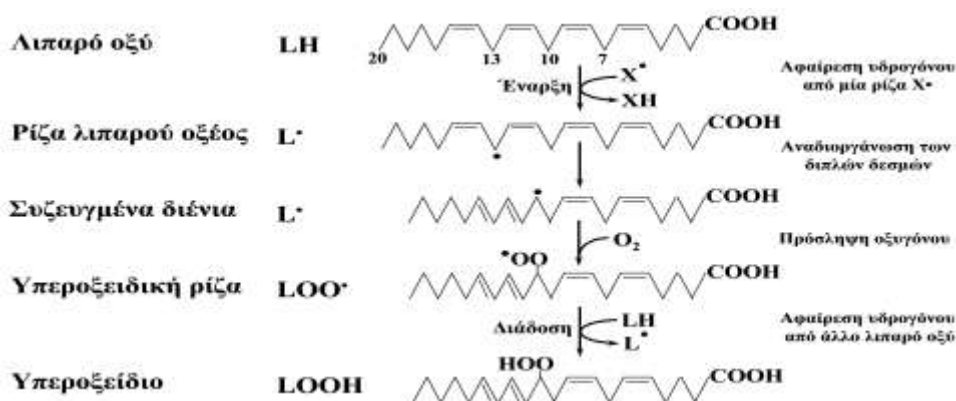
#### 3.1 Αυτοοξείδωση των PUFAs

Η απευθείας οξείδωση των PUFAs των τροφίμων από το μοριακό οξυγόνο είναι ενεργειακώς αδύνατη, εξαιτίας της υψηλής τιμής ενεργοποίησης της αντίδρασης αυτής που φθάνει τα 35 Kcal/mol. Έτσι, κατά την αυτοοξείδωση το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με τα PUFAs των ουδέτερων λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων διαμέσου μιας αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών που εξελίσσεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις, που είναι γνωστές ως έναρξη, διάδοση και τερματισμός.



Κατά τη φάση της έναρξης, οι ελεύθερες ρίζες που έχουν σχηματιστεί κατά τις μεταβολικές διεργασίες μέσα στον ζωϊκό οργανισμό, προσβάλλουν τα PUFAs των κυτταρικών μεμβρανών στη θέση του ατόμου του άνθρακα που βρίσκεται μεταξύ δύο διπλών δεσμών και αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου. Επειδή στα PUFAs των βιολογικών συστημάτων ο διπλός δεσμός έχει την τάση να βρίσκεται σε κάθε τρίτο άτομο άνθρακα ( $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ), η αφαίρεση του ατόμου του υδρογόνου γίνεται κυρίως από τη μεθυλενική ομάδα ( $-\text{CH}_2-$ ) που βρίσκεται ανάμεσα στους δύο διπλούς δεσμούς των PUFAs (Gardner 1989, Voet & Voet 1995). Και αυτό γιατί οι διπλοί δεσμοί κοντά στη μεθυλενική ομάδα διευκολύνουν την απομάκρυνση του υδρογόνου ελαττώνοντας την ισχύ του δεσμού άνθρακα-υδρογόνου (Horton & Fairhurst 1987). Η επιδεκτικότητα των PUFAs στην οξείδωση αυξάνεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών, ενώ κορεσμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρά οξέα με ένα διπλό δεσμό αντιστέκονται πολύ περισσότερο στην οξείδωση από τα PUFAs (Parthasarathy et al. 1990).

Το άτομο του υδρογόνου με την απομάκρυνσή του αφήνει στη μεθυλενική ομάδα το μοναδικό του ηλεκτρόνιο (Εικόνα 1) και έτσι σχηματίζεται μία αλκυλορίζα ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ ). Στην αλκυλορίζα προκαλείται, στη συνέχεια, αναδιοργάνωση των διπλών δεσμών σε μία διαμόρφωση συζευγμένων διενίων, η οποία είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερή. Διευκρινίζεται ότι συζευγμένοι διπλοί δεσμοί ή συζευγμένα διένια (conjugated dienes) ονομάζονται δύο διπλοί δεσμοί που χωρίζονται με έναν απλό δεσμό ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ). Ακολουθεί αντίδραση της αλκυλορίζας με  $\text{O}_2$  και μετατροπή της σε υπεροξειδική ρίζα ( $\text{LOO}\cdot$ ),

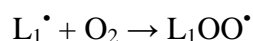
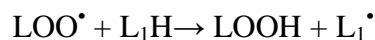


Εικόνα 1. Μηχανισμός οξείδωσης πολυακόρεστου λιπαρού οξέος.

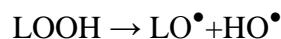
Οι υπεροξειδικές ρίζες  $\text{LOO}\cdot$  που σχηματίζονται από την πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση

μπορούν στη συνέχεια να αφαιρέσουν υδρογόνο από ένα άλλο γειτονικό λιπαρό οξύ και να αρχίσουν μία νέα αλυσιδωτή αντίδραση προωθώντας τη διάδοση της οξειδωσης των PUFAs (Gutteridge 1995, Halliwell & Gutteridge 1999). Έναρξη της οξειδωσης μπορεί να προκαλέσει κάθε ουσία που έχει ικανοποιητική ενέργεια για να αφαιρέσει ένα άτομο υδρογόνου από τα PUFAs. Γνωστές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που μπορούν να αφαιρέσουν άτομο υδρογόνου από τα PUFAs, είναι η υδροξυλική ρίζα ( $\cdot\text{OH}$ ), η αλκοξυλική ρίζα ( $\text{RO}\cdot$ ), η υπεροξειδική ρίζα ( $\text{ROO}\cdot$ ) και πιθανόν η πρωτονιομένη μορφή του σουπεροξειδίου ( $\text{HO}_2\cdot$ ), όχι όμως και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ή η ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (Comporti 1993, Gutteridge 1998).

Κατά τη φάση της διάδοσης, οι ρίζες τύπου  $\text{LOO}\cdot$  των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που σχηματίστηκαν κατά την προηγούμενη φάση, αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο λιπαρό οξύ ( $\text{L}_1\text{H}$ ) και η ρίζα που σχηματίζεται ( $\text{L}_1\cdot$ ) αντιδρά με  $\text{O}_2$  και σχηματίζεται η ρίζα  $\text{L}_1\text{OO}\cdot$ ,

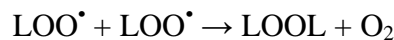


Στη συνέχεια, η νέα ρίζα τύπου  $\text{L}_1\text{OO}\cdot$  αφαιρεί, με την ίδια διαδικασία, ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο λιπαρό οξύ ( $\text{L}_2\text{H}$ ) και οι αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξειδωσης των PUFAs συνεχίζονται με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται διάφορα μονοϋδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων ( $\text{LOOH}$ ). Τα μονοϋδροϋπεροξειδία είναι σταθερές, σχετικά, ενώσεις με μεγάλη ημιπερίοδο ζωής, αλλά μπορούν εύκολα να διασπαστούν από ουσίες που χαρακτηρίζονται ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, ή από μεταλλικά ιόντα ή και από θερμική ακτινοβολία και να σχηματίσουν αλκοξειδικές ( $\text{LO}\cdot$ ), υδροξυλικές ( $\text{HO}\cdot$ ) και υπεροξειδικές ρίζες,



Οι αλυσιδωτές αυτές αντιδράσεις στις κυτταρικές μεμβράνες, θεωρητικά, θα μπορούσαν να είναι εκατοντάδες, πρακτικά, όμως, δεν μπορούν να προχωρήσουν και πολύ, επειδή ή θα αντιδράσουν μεταξύ τους ή θα συναντήσουν κάποια πρωτεΐνη των μεμβρανών την οποία θα τροποποιήσουν οξειδωτικά. Μερικές φορές οι βλάβες που προκαλούνται στις πρωτεΐνες των μεμβρανών από τις ελεύθερες ρίζες είναι πολύ πιο σημαντικές για τη λειτουργία των μεμβρανών από αυτές που προκαλούνται στα λιπίδια (Davies 1987, Minotti 1993).

Κατά τη φάση του τερματισμού, οι παραπάνω ρίζες συνεχίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν στην εξουδετέρωσή τους,



Από τις αντιδράσεις αυτές, η αντίδραση μεταξύ δύο υπεροξειδικών ριζών είναι η πιο σημαντική γιατί υπερισχύει σε συνθήκες κανονικής ατμοσφαιρικής πίεσης (Chan 1987). Σε συνθήκες, πάλι, χαμηλής μερικής πίεσης οξυγόνου και μεγάλες θερμοκρασίες, οι ρίζες τύπου  $\text{LO}^\bullet$  μπορεί να αντιδράσουν με ρίζες τύπου  $\text{L}^\bullet$  προς τις αντίστοιχες αιθερικές ενώσεις,



Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι αλυσιδωτές αντιδράσεις της φάσης τερματισμού μπορούν και να σταματήσουν πριν ολοκληρωθούν αν παρεμβληθεί κάποια ουσία εκκαθαριστής (scavenger) όπως η βιταμίνη E, που εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες (Parcker 1991). Εξαιτίας μάλιστα, της μεγάλης, σχετικά, ημιπεριόδου ζωής των LOO είναι αρκετά εύκολο να σταματήσει η οξειδωση των λιπαρών οξέων με τη χρήση μιάς ποικιλίας διαφορετικών εκκαθαριστών.

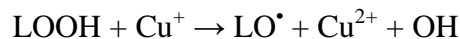
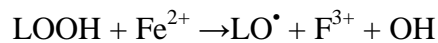
### 3.1.1 Προϊόντα της αυτοοξειδωσης των PUFAs

Η αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των ουδέτερων λιπών και φωσφολιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό ενός μίγματος πολλών ισομερών μορφών μονοϋδροϋπεροξειδίων και κυκλικών υδροϋπεροξειδίων τα οποία αντανακλούν τον αριθμό και τη θέση των διπλών δεσμών στα λιπίδια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μονοϋδροϋπεροξειδία και κυκλικά υδροϋπεροξειδία προέρχονται από διαφορετικά PUFAs και, επιπλέον, τα PUFAs αυτά περιέχουν συνήθως περισσότερες από μία μεθυλενικές ομάδες από τις οποίες οι ελεύθερες ρίζες θα μπορούσαν να αφαιρέσουν ένα άτομο υδρογόνου.

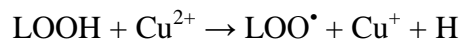
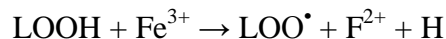
Τα μονοϋδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι σχετικά σταθερά σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, άοσμα και άγευστα, ανήκουν στα πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης των PUFAs. Αποικοδομούνται όμως προς πτητικά και μη πτητικά προϊόντα, από τα οποία τα πρώτα, κυρίως, ευθύνονται για τα ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οξειδωμένων τροφίμων (Grosch 1987). Η αποικοδόμηση των μονοϋδροϋπεροξειδίων των ακόρεστων λιπαρών οξέων αρχίζει αμέσως μετά το σχηματισμό τους αν και η ταχύτητα σχηματισμού τους στα αρχικά στάδια της αυτοοξειδωσης υπερβαίνει αυτήν της αποικοδόμησής τους. Πλήθος παραγόντων, όπως είναι η παρουσία ιόντων μετάλλων,

κυρίως του Fe και Cu, ενώσεων της αίμης, καθώς και η αυξημένη θερμοκρασία, καταλύουν τις αντιδράσεις αποικοδόμησης των μονοϋδροϋπεροξειδίων και συμβάλουν στην ταχύτερη υποβάθμιση των λιπιδίων.

Έτσι, ιόντα και σύμπλοκα μεταβατικών μετάλλων με την αναγωγική τους μορφή, όπως είναι ο  $\text{Fe}^{2+}$  και ο  $\text{Cu}^+$ , προκαλούν αναγωγική διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων και παράγουν αλκοξυλικές ρίζες ( $\text{LO}^\bullet$ ),



Ενώ ιόντα και σύμπλοκα μεταβατικών μετάλλων με την οξειδωτική τους μορφή, όπως είναι ο  $\text{Fe}^{3+}$  και ο  $\text{Cu}^{2+}$ , προκαλούν οξειδωτική διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων,



Όπως φαίνεται από τις παραπάνω αντιδράσεις, η διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων με ιόντα σιδήρου ή χαλκού παράγει της ρίζες  $\text{LO}^\bullet$  και  $\text{LOO}^\bullet$  που έχουν την ικανότητα να αφαιρέσουν υδρογόνο από τα PUFAs και να ξαναρχίσουν νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Έτσι τα μονοϋδροϋπεροξειδία με την παρουσία ιόντων σιδήρου ή χαλκού προωθούν τη λιπιδική υπεροξείδωση.

Διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων μπορούν να προκαλέσουν και ορισμένες πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο (Halliwell & Gutteridge 1999). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν καταλύουν απευθείας τη διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων (αντίδραση Fenton) αλλά μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να ελευθερώσουν ιόντα σιδήρου, τα οποία, στη συνέχεια, να προκαλέσουν τη διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων προωθώντας έτσι, έμμεσα, την οξείδωση των λιπιδίων.

Στη λιπιδική υπεροξείδωση, κατά το στάδιο του τερματισμού, όλες οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται αντιδρούν μεταξύ τους και εξουδετερώνονται σχηματίζοντας προϊόντα που δεν είναι πια ελεύθερες ρίζες. Έτσι, από τις υπεροξειδικές ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κυκλικά υπεροξειδία και κυκλικά ενδοϋπεροξειδία (Halliwell & Gutteridge 1999). Τα κυκλικά ενδοϋπεροξειδία με θέρμανση υφίστανται περαιτέρω διάσπαση με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας πληθώρας από ενδιάμεσα και τελικά σταθερά προϊόντα όπως είναι οι αλκανάλες, οι αλκενάλες, οι υδροξυαλκενάλες, οι αλκαδιενάλες, οι κετόνες, οι μικρής ανθρακικής αλυσίδας υδρογονάνθρακες και άλλες ενώσεις (Esterbauer et al. 1991).

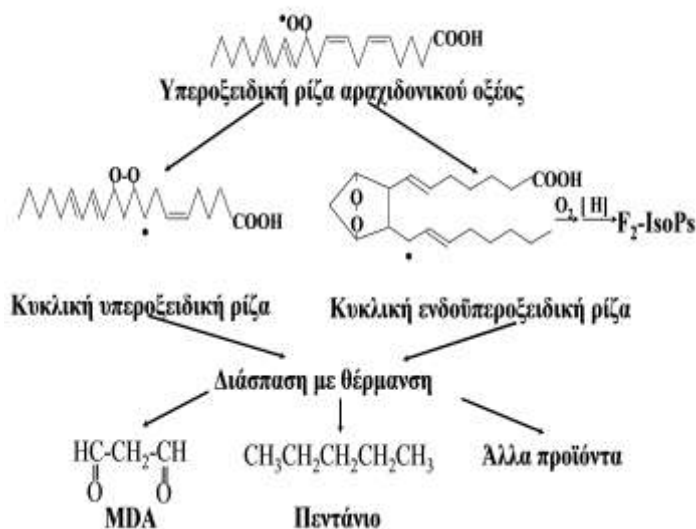
Η δομή του μορίου των πτητικών, καρβονυλικών κυρίως, προϊόντων που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των μονοϋδροϋπεροξειδίων των ακόρεστων λιπαρών οξέων

επηρεάζεται από το είδος των λιπαρών οξέων και εξαρτάται από παράγοντες όπως ο βαθμός οξειδωσης του λιπαρού υποστρώματος, η θερμοκρασία, η μερική πίεση του οξυγόνου και η παρουσία καταλυτών. Σε πολυφασικά συστήματα τροφίμων, η αλληλεπίδραση μεταξύ των υδροϋπεροξειδίων και των δευτερογενών προϊόντων οξειδωσης με τις πρωτεΐνες και άλλα συστατικά διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα του τροφίμου και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τόσο κατά τη διάρκεια διεργασιών, όπως η θερμική επεξεργασία, όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησής του. Ανάλογα προϊόντα προκύπτουν και κατά την αποικοδόμηση των κυκλικών υδροϋπεροξειδίων.

Έτσι, η διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία παράγει ένα πολύπλοκο μίγμα από τελικά σταθερά προϊόντα, όπως εποξειδία, κορεσμένες και ακόρεστες αλδεύδες, κετόνες, καθώς και υδρογονάνθρακες όπως πεντάνιο, αιθάνιο και αιθυλένιο (Esterbauer et al. 1991). Περαιτέρω διάσπαση των μονοϋδροϋπεροξειδίων με την παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων (β-διάσπαση) παράγει μία ποικιλία τελικών προϊόντων των οποίων η σύσταση εξαρτάται από τη δομή των λιπιδικών υπεροξειδίων (Halliwell & Gutteridge 1999). Έτσι από το λινολεϊκό οξύ και αραχιδονικό οξύ σχηματίζεται πεντάνιο, ενώ από το α-λινολεϊκό οξύ αιθάνιο και αιθυλένιο.

Τα δευτερογενή μη πτητικά προϊόντα της αποικοδόμησης των μονοϋδροϋπεροξειδίων διακρίνονται κυρίως σε μονομερή και ολιγομερή (Paquette et al. 1985). Στα μονομερή περιλαμβάνονται υδροξυ- και εποξυ-παράγωγα που προκύπτουν από κυκλοποίηση μίας αλκοξειδικής ρίζας που προέρχεται από το αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο. Τα ολιγομερή σχηματίζονται κατά την αυτοξειδωση των μεθυλεστέρων του λινελαϊκού και του α-λινολεϊκού οξέος σε συνθήκες περιβάλλοντος. Επισημαίνεται ότι τα υδροϋπεροξειδία του λινελαϊκού οξέος μπορούν να σχηματίσουν διμερείς ενώσεις με υπεροξειδικούς, αιθερικούς και δεσμούς C-C.

Διμερή και ολιγομερή προϊόντα αποτελούν επίσης σημαντικά δευτερογενή προϊόντα κατά την οξειδωση του μεθυλεστέρα του α-λινολεϊκού οξέος απουσία φωτός. Τα ολιγομερή που προκύπτουν από την αποικοδόμηση του λινολεϊκού οξέος και κυρίως αυτά που προέρχονται από μονομερείς ενώσεις ενωμένες με υπεροξειδικό δεσμό μπορούν να υποστούν περαιτέρω διάσπαση προς πτητικά προϊόντα, ενισχύοντας την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των λιπαρών υλών.



**Εικόνα 2.** Μετατροπές και διάσπαση μίας από τις τρεις υπεροξειδικές ρίζες του αραχιδονικού οξέος.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα δευτερογενούς μη πτητικού προϊόντος αποικοδόμησης αποτελεί η μηλονική διαλδεΰδη (MDA) η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί χρησιμοποιείται ως δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Botsoglou et al. 1994). Η σχάση των πενταμελών κυκλικών υδροϋπεροξειδίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με περισσότερους από τρεις διπλούς δεσμούς (Εικόνα 2) έχει προταθεί ως ο κύριος μηχανισμός σχηματισμού της μηλονικής διαλδεΰδης κατά την διάρκεια της αυτοξειδωσης (Pryor et al. 1976). Οι κυριότερες πρόδρομες ενώσεις της MDA είναι τα 1,3-δισ-υδροϋπεροξειδία του λινολενικού οξέος, τα υδροϋπεροξυδικυκλοενδοϋπεροξειδία του λινολενικού και του αραχιδονικού οξέος και τα υδροϋπεροξυεπιδιοξειδία του λινολενικού οξέος (Frankel & Neff 1983). Η MDA είναι κορεσμένη διαλδεΰδη που μπορεί να αντιδράσει με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών και των βάσεων του DNA (Benamira et al. 1995) και να σχηματίσει βάσεις του Schiff, καθώς και με τις σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) των πρωτεϊνών. Ακόμη, ορισμένα προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων όπως οι α,β-ακόρεστες αλδεΰδες και ιδιαίτερα η 4-υδροξυ-2-εννεάλη που σχηματίζεται κατά την οξειδωση του λινελαϊκού οξέος των κυτταρικών μεμβρανών, παρουσιάζουν μεγάλη δραστικότητα ώστε να αντιδρούν πολύ γρήγορα με τις αμινομάδες των βάσεων του DNA και των πρωτεϊνών, αλλά και με φωσφολιπίδια, όπως την φωσφοαιθανολαμίνη και την φωσφοσερίνη (Munasinghe et al. 2003, Sakai et al. 2004, 2006).

### 3.2 Φωτοευαισθητοποιημένη οξείδωση των λιπιδίων

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών που είναι απαραίτητες για την έναρξη της οξείδωσης μπορεί να γίνει και διαμέσου του μηχανισμού της φωτοευαισθητοποιημένης οξείδωσης. Κατά την μηχανισμό αυτό, σχηματίζονται μονοϋδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσία οξυγόνου, ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας και ενός φωτοευαισθητοποιητή (Frankel 1998). Ως φωτοευαισθητοποιητές, θεωρούνται οι χημικές ουσίες που όταν απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία μεταπίπτουν από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ή το μοριακό οξυγόνο. Ορισμένες χρωστικές των τροφίμων όπως είναι η χλωροφύλλη, η μυοσφαιρίνη και η φαιοφυτίνη, καθώς και άλλες ενώσεις όπως η ριβοφλαβίνη μπορούν να δράσουν ως φωτοευαισθητοποιητές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια των ουσιών αυτών από την απλή διεγερμένη κατάσταση μπορούν με εκπομπή φθορισμού να επιστρέψουν στη βασική κατάσταση ή και να μεταπέσουν στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (Bradley & Min 1992).

Οι φωτοευαισθητοποιητές στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση μπορούν να δράσουν με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Κατά τον πρώτο μηχανισμό, φωτοευαισθητοποιητές όπως η ριβοφλαβίνη μπορούν να αντιδράσουν με λιπαρά οξέα σχηματίζοντας με μεταφορά ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου μια σύμπλοκη ένωση η οποία στη συνέχεια αντιδρά με μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας τα αντίστοιχα μονοϋδροϋπεροξειδία. Τα μονοϋδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό, είναι ανάλογα με εκείνα της αυτοοξείδωσης, αλλά ο σχηματισμός τους δεν παρεμποδίζεται από αντιοξειδωτικές ουσίες που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Chan 1987).

Κατά τον δεύτερο μηχανισμό, φωτοευαισθητοποιητές όπως η χλωροφύλλη αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο οπότε σχηματίζεται οξυγόνο στην απλή διεγερμένη κατάσταση ( $^1\text{O}_2$ ). Το οξυγόνο αυτό μπορεί να προσβάλλει απ' ευθείας τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και μάλιστα με μεγάλη ταχύτητα σχηματίζοντας τα αντίστοιχα μονοϋδροϋπεροξειδία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αντίδραση του οξυγόνου στην απλή διεγερμένη κατάσταση με το μεθυλεστέρα του λινελαϊκού οξέος είναι  $10^3$ - $10^4$  φορές ταχύτερη από αυτήν του μοριακού οξυγόνου (Chan 1987).

#### 3.2.1 Προϊόντα της φωτοευαισθητοποιημένης οξείδωσης των λιπιδίων

Αντίθετα προς την αυτοοξείδωση, ο σχηματισμός των μονοϋδροϋπεροξειδίων κατά την φωτοευαισθητοποιημένη οξείδωση βασίζεται στη δράση του οξυγόνου στην απλή

διεγερμένη κατάσταση που είναι ισχυρά ηλεκτρονιόφιλο και αντιδρά ταχύτατα με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Εξαιτίας της μεγάλης αυτής δραστηριότητας, τα μονοϋδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της οξειδωσης που προχωρά με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Το οξυγόνο στην απλή διεγερμένη κατάσταση προστίθεται στο διπλό δεσμό των ακόρεστων λιπαρών ο οποίος μετακινείται σε αλλυλική θέση και ταυτόχρονα αλλάζει γεωμετρία, μετατρέπόμενος από cis σε trans δεσμό. Τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται έχουν αλλυλικό διπλό δεσμό και είναι διαφορετικά από εκείνα που προκύπτουν κατά την αυτοοξειδωση.

Σε αντίθεση προς την αυτοοξειδωση, η φωτοευαισθητοποιημένη οξειδωση δεν παρεμποδίζεται από τις φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες που αναστέλλουν την αλυσιδωτή αντίδραση της αυτοοξειδωσης. Παρεμποδίζεται όμως από την παρουσία εκκαθαριστών του οξυγόνου στην απλή διεγερμένη κατάσταση ή φωτοευαισθητοποιητών διεγερμένων στην τριπλή κατάσταση, όπως είναι τα καροτενοειδή και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (Foote et al. 1985).

#### 4. Επίδραση της οξειδωσης των λιπιδίων στην ποιότητα του κρέατος

Η διατροφική αξία του κρέατος που συντηρείται σε οξειδωτικό περιβάλλον είναι ένα θέμα που ενδιαφέρει πολύ τόσο τους καταναλωτές όσο και τους παραγωγούς. Κρέας και κρεατοσκευάσματα που εκτίθενται σε έντονα οξειδωτικές συνθήκες αναμένεται να παρουσιάσουν απώλειες βιταμινών όπως οι βιταμίνες A, C και E, καθώς και απώλειες απαραίτητων αμινοξέων, όπως η λυσίνη και η μεθειονίνη, που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών. Δεν έχει, όμως, ακόμη διευκρινιστεί κατά πόσο οι απώλειες αυτές θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα αυτών των προϊόντων. Από την άλλη μεριά, δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών καταλήγει, συνήθως, σε αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα εξαιτίας αναδίπλωσης του μορίου των πρωτεϊνών, που έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη έκθεση των πεπτιδικών δεσμών στις πρωτεάσες (Agarwall & Sohal 1994).

Πρόσφατες μελέτες με τα ένζυμα πεψίνη, τρυψίνη και χυμοτρυψίνη, έδειξαν ότι η πεπτικότητα οξειδωμένης μυοσίνης μπορεί να αυξηθεί ή και να ελαττωθεί, ανάλογα με την έκταση της οξειδωσης και την παρουσία ενός αναγωγικού μέσου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της πέψης (Kamin-Belsky et al. 1996, Liu & Xiong 1997). Έτσι, η μυοσίνη που βρίσκεται σε ήπιο οξειδωτικό περιβάλλον, το οποίο προάγει σε μικρό μόνο βαθμό τις συζεύξεις ή το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων, παρουσιάζει αυξημένη ενζυμική πεπτικότητα εφόσον η πέψη λαμβάνει χώρα σε αναγωγικό περιβάλλον (Liu & Xiong 1997).



Αντίθετα, όταν η μυοσίνη βρεθεί σε έντονα οξειδωτικό περιβάλλον όπως είναι το σύστημα  $H_2O_2$ /αίμης το οποίο προάγει πολύ τις συζεύξεις, παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην πρωτεόλυση από τα πεπτικά ένζυμα (Kamin-Belsky et al. 1996).

Αν και οι αρνητικές επιπτώσεις της οξείδωσης των λιπιδίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων θεωρούνται ως οι πιο σημαντικές, μεγάλη προσοχή έχει δοθεί πρόσφατα στους κινδύνους που εγκυμονεί για την υγεία των καταναλωτών η οξείδωση των λιπιδίων. Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και τα προϊόντα της αποδόμησής τους θεωρούνται τοξικά και μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στις πρωτεΐνες, τις κυτταρικές μεμβράνες και τα βιολογικά συστατικά των κυττάρων, επηρεάζοντας έτσι τη ζωτική τους λειτουργία (Ladicos & Lougonois 1990). Η μηλονική διαλδεϋδη είναι ένα από αυτά τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων το οποίο πιστεύεται ότι έχει μεταλλαξιγόνες ιδιότητες και, επιπλέον, εμπλέκεται στον σχηματισμό των N-νιτροζαμινών. Ωστόσο, η σημασία αυτών των ενώσεων για την ανθρώπινη υγεία δεν έχει, ακόμη, πλήρως διευκρινιστεί.

Εκτός από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη είναι ένα άλλο λιπίδιο που μπορεί να επηρεάσει την υγεία του ανθρώπου. Στο σημείο αυτό αξίζει να διευκρινιστεί ότι η χημικώς καθαρή χοληστερόλη δεν είναι αθηρογόνα, ακόμη και σε ένα ευαίσθητο ζώο, όπως το κουνέλι (Taylor et al. 1979). Η οξείδωσή της, όμως, από υπεροξειδικές ρίζες γειτονικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στις μεμβράνες των φωσφολιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ενώσεων οι οποίες ευνοούν την αθηρογένεση (Addis & Park 1989).

Τα προϊόντα οξείδωσης της χοληστερόλης δεν βρίσκονται συνήθως στο νωπό κρέας, αλλά ανιχνεύονται σε μεγάλη ποικιλία από προψημένα και επεξεργασμένα κρέατα, ιδίως, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης (Park & Addis 1987). Ο σχηματισμός τους στο κρέας εξαρτάται συνήθως από τη μέθοδο μαγειρέματος και το είδος του ιστού. Ο σχηματισμός των προϊόντων οξείδωσης της χοληστερόλης είναι κυρίως πρόβλημα προϊόντων που εκτίθενται σε διαδικασίες αυξημένης οξείδωσης, όπως η θέρμανση, η άλεση, η έκθεση στο φως, και η παρατεταμένη αποθήκευση. Προϊόντα οξείδωσης της χοληστερόλης έχουν επίσης ανιχνευθεί σε σχετικά υψηλά επίπεδα και σε άλλα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως η σκόνη αυγού (Morgan & Armstrong 1987, Nourooz-Zadeh & Appelqvist 1987).

## 5. Μέθοδοι εκτίμησης της οξείδωσης των λιπιδίων

Από όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, προκύπτει ότι η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια

πολύπλοκη διαδικασία, που γίνεται σε πολλά στάδια και οδηγεί σε παραγωγή πολλών ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων. Επομένως, για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε την έκταση της οξειδωσης των λιπιδίων σε ένα τρόφιμο καθώς και τον προστατευτικό ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών που προστίθενται σε αυτό, χρειαζόμαστε αναλυτικές μεθόδους που να προσφέρουν ειδική και ευαίσθητη μέτρηση ενός ή περισσότερων πρωτογενών ή δευτερογενών προϊόντων που να μπορούν να αποτελούν αξιόπιστους «δείκτες» της οξειδωσης των λιπιδίων. Η επιλογή των δεικτών αυτών θα πρέπει να διασφαλίζει ότι η συγκέντρωσή τους θα παρουσιάζει καλή συσχέτιση με τον βαθμό οξειδωσης των λιπιδίων, ότι η παρουσία τους στα τρόφιμα θα είναι εύκολα ανιχνεύσιμη και ότι η σταθερότητά τους κατά την κατεργασία ή την συντήρηση των δειγμάτων θα είναι ικανοποιητική.

Εξαιτίας όλων αυτών των προϋποθέσεων, οι μέθοδοι που έχουν μέχρι τώρα διαμορφωθεί, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε ό,τι αφορά την ουσία-δείκτη καθώς και την αναλυτική διαδικασία προσδιορισμού κάθε ουσίας-δείκτη. Κάθε μία από τις διαθέσιμες μεθόδους μετρά κάτι διαφορετικό και αυτός, ουσιαστικά, είναι ο λόγος για τον οποίο πρέπει να εφαρμόζονται περισσότερες της μιας μέθοδοι, ώστε να επιτυγχάνεται ασφαλέστερη εκτίμηση του βαθμού οξειδωσης στο εξεταζόμενο δείγμα. Από τις διαθέσιμες μεθόδους, οι μέθοδοι που συνηθέστερα εφαρμόζονται για την εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα είναι οι παρακάτω:

- Μέθοδος αριθμού υπεροξειδίων
- Μέθοδος συζευγμένων διενίων
- Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (μηλονική διαλδεύδη)
- Μέθοδος εξανάλης

Από τις μεθόδους αυτές, οι δύο πρώτες χρησιμοποιούν ως ουσία-δείκτη πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων, συγκεκριμένα υπεροξείδια και συζευγμένα διένια, αντίστοιχα, ενώ οι άλλες δύο χρησιμοποιούν ως ουσία-δείκτη δευτερογενή προϊόντα όπως είναι η μηλονική διαλδεύδη και η εξανάλη, αντίστοιχα.

### **5.1 Μέθοδος αριθμού υπεροξειδίων**

Η μέθοδος αυτή είναι απλή στην εκτέλεσή της, έχει χαμηλό κόστος και δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό, αλλά η μεταβατική φύση των υδροϋπεροξειδίων, τα οποία αποικοδομούνται γρήγορα σε καρβονυλικές ενώσεις, περιορίζει την χρησιμότητά της. Εντούτοις, αυτή η ουσία-δείκτης χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία των τροφίμων αν και τα αποτελέσματά της είναι συχνά αμφιλεγόμενα εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσής

τους (Schaich 2012).

Οι αναλυτικές τεχνικές που είναι διαθέσιμες για τη μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων είναι πολυάριθμες αλλά συχνότερα χρησιμοποιείται η τεχνική της ιωδομετρικής τιτλοδότησης με θειοθειικό νάτριο, η τεχνική του θειοκυανικού σιδήρου και η τεχνική της πορτοκαλόχρους ξυλενόλης. Καθεμιά από τις τεχνικές αυτές παρουσιάζει θετικά και αρνητικά χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να συνυπολογίζονται πριν από την οριστική επιλογή της. Έτσι, μια τεχνική μπορεί να είναι απλή στην εφαρμογή της, αλλά αναξιόπιστη ή πολυδάπανη, ενώ κάποια άλλη μπορεί να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, αλλά δύσκολη στους χειρισμούς της (Hara & Totani 1988). Ακόμη, πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κατά την επιλογή της τεχνικής και η φύση του δείγματος, ο αριθμός των δειγμάτων προς ανάλυση καθώς και τα επιθυμητά ποιοτικά χαρακτηριστικά αυτής της ανάλυσης (Navas et al. 2004). Επομένως, η επιλογή της καλύτερης τεχνικής για μια συγκεκριμένη εφαρμογή μπορεί να αποδειχθεί τελικά αρκετά δύσκολη δοκιμασία (Dobarganes & Velasco 2002).

Η παραδοσιακή ιωδομετρική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων εδώ και 50 χρόνια έχει τυποποιηθεί και είναι δημοσιευμένη από το 1997 ως επίσημη μέθοδος της AOCS (μέθοδος Cd 8-53). Η τεχνική αυτή είναι στοιχειομετρική, γραμμική, και χρήσιμη για προσδιορισμούς υψηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίων. Είναι ακόμη η μόνη τεχνική που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδροϋπεροξειδίων. Εντούτοις δεν παρουσιάζει ικανοποιητική ευαισθησία ούτε παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Η τεχνική του θειοκυανικού σιδήρου καθώς και η τεχνική της πορτοκαλόχρους ξυλενόλης αρχικά αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό των υδροϋπεροξειδίων σε διαλύτες ή βιολογικούς ιστούς. Αργότερα χρησιμοποιήθηκαν και σε τρόφιμα μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις. Η τεχνική του θειοκυανικού σιδήρου στηρίζεται στην οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή, τον σχηματισμό συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με θειοκυανικά ιόντα και τη φωτομέτρηση αυτού του συμπλόκου. Αυτή η τεχνική έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την ιωδομετρική τιτλοδότηση και απαιτεί μικρότερα δείγματα (Frankel 1998, Dobarganes & Velasco 2002). Αυτός ίσως είναι και ο λόγος για τον οποίο παραλλαγή της τεχνικής αυτής έχει τυποποιηθεί από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος. Η παραλλαγή αυτή που είναι γνωστή ως IDF (74A:1991), εφαρμόστηκε κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία συνήθως έχουν χαμηλές τιμές υπεροξειδίων και έτσι χρειάζονται υψηλή ευαισθησία μέτρησης (Frankel 1998). Άλλοι ερευνητές προσάρμοσαν, στη συνέχεια, την παραλλαγή της IDF για μη γαλακτοκομικά προϊόντα όπως λίπος

κοτόπουλου, μαγειρεμένο βοδινό λίπος, ιχθυέλαιο και φυτικό έλαιο (Shantha & Decker 1994). Στις παραλλαγές αυτές, τα αποτελέσματα διαιρούνται δια δύο προκειμένου να εκφραστούν σε χιλιοστοισοδύναμα υπεροξειδίων αντί σε χιλιοστοισοδύναμα ατομικού οξυγόνου.

Η τεχνική πάλι της πορτοκαλόχροας ξυλενόλης που αρχικά αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων υδροϋπεροξειδίων σε ζωντανούς ιστούς, έγινε ευρύτατα γνωστή όταν διαπιστώθηκε ότι προσέφερε υψηλή ευαισθησία (Wolff 1994). Στηρίζεται στην οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή, τη σύζευξη του τρισθενούς σιδήρου με τη χρωστική της πορτοκαλόχροας ξυλενόλης και τη φωτομέτρηση αυτού του συμπλόκου. Αξίζει να διευκρινιστεί ότι στις δύο τελευταίες τεχνικές τα εκχυλίσματα των λιπιδίων των τροφίμων πρέπει να αραιώνονται εκτεταμένα πριν την ανάλυση. Με ανεπαρκή αραιώση, η ανάλυση μπορεί να δείξει πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υδροϋπεροξειδίων ακόμη και όταν αυτές είναι στην πραγματικότητα πολύ υψηλές. Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές έχουν το μειονέκτημα να δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα για υδροϋπεροξειδία με διαφορετική δομή. Οι τεχνικές, όμως, αυτές μπορεί να είναι χρήσιμες για την παρακολούθηση μεταβολών των υδροϋπεροξειδίων με την πάροδο του χρόνου ή τη σύγκριση εκχυλισμάτων με παραπλήσια σύνθεση λιπαρών οξέων.

Επισημαίνεται ότι συγκριτική μελέτη της μεθόδου προσδιορισμού του αριθμού υπεροξειδίων, που μετρά αρχικά προϊόντα, με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος που μετρά τελικά προϊόντα, οδηγεί, συχνά, σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, ανάλογα με το είδος του δείγματος. Έτσι, κάποιοι ερευνητές βρήκαν γραμμική συσχέτιση των δύο μεθόδων όταν αυτές εφαρμόστηκαν σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Dahle et al. 1962, Gray 1978), ενώ άλλοι βρήκαν σε κατεψυγμένο χοιρινό κρέας που είχε υποβληθεί σε θερμική κατεργασία, αυξημένες τιμές με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος και μειωμένες τιμές με τη μέθοδο του αριθμού υπεροξειδίων (Younathan & Watts 1960).

## 5.2 Μέθοδος συζευγμένων διενίων

Τα πρώτα ανιχνεύσιμα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων είναι τα συζευγμένα διένια τα οποία εμφανίζονται όταν ο σχηματισμός των ριζών και των υδροϋπεροξειδίων προκαλεί τη μετανάστευση του γειτονικού διπλού δεσμού. Τα συζευγμένα διένια συνιστούν το μόνο λιπιδικό χρωμοφόρο με σημαντική απορρόφηση στην περιοχή από 231-234 nm. Εξαιτίας της ευκολίας και της απλότητάς της, αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων. Ωστόσο,

παρουσιάζει και μειονεκτήματα, αφού ο συντελεστής απρροφητικότητας μπορεί να μεταβάλλεται με τον διαλύτη, τα συζευγμένα διένια να μην είναι σταθερά αλλά να δημιουργούνται ακόμη και ενώ η τεχνική είναι σε εξέλιξη ή να χάνονται αποικοδομούμενα σε δευτερογενή προϊόντα, και η παρουσία άλλων ουσιών να παρενοχλεί τις μετρήσεις. Ετσι, η τεχνική των συζευγμένων διενίων θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν εξετάζεται η εξέλιξη της οξειδωσης των λιπιδίων με την πάροδο του χρόνου στο ίδιο σύστημα. Τα συζευγμένα διένια μπορούν να θεωρηθούν γενικοί μόνο δείκτες της οξειδωσης και στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να συνδυάζονται με αναλύσεις και άλλων δεικτών της οξειδωσης των λιπιδίων.

### 5.3 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού οξέος (μηλονική διαλδεϋδη)

Από τις μεθόδους μέτρησης των τελικών προϊόντων της οξειδωσης των λιπιδίων, περισσότερο γνωστή είναι η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σήμερα ευρύτατα στις διάφορες παραλλαγές της, επειδή έχει χαμηλό κόστος, δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό και θεωρείται εύκολη στην εκτέλεσή της. Βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης στα 532 nm του κοκκινωπού συμπλόκου που σχηματίζεται από την αντίδραση του TBA με την μηλονική διαλδεϋδη (MDA), ενός υδρόφιλου τελικού σταθερού προϊόντος της οξειδωσης των λιπιδίων που προέρχεται από τη διάσπαση PUFAs με τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς όπως το αραχιδονικό οξύ.

Οι δημοφιλέστερες παραλλαγές της μεθόδου TBA για την εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων σε κρέας και κρεατοσκευάσματα είναι οι παρακάτω:

1. απευθείας θέρμανση του TBA με το δείγμα του κρέατος κάτω από όξινες συνθήκες, εκχύλιση του ερυθρού συμπλόκου με βουτανόλη και φωτομέτρηση στα 532 nm (Sinhuber & Yu 1958).
2. απευθείας θέρμανση του TBA με το δείγμα του κρέατος κάτω από όξινες συνθήκες, απόσταξη και φωτομέτρηση του αποστάγματος στα 532 nm (Tarladgis et al. 1960)
3. εκχύλιση του κρέατος με διάλυμα τριχλωροξικού οξέος, θέρμανση του εκχυλίσματος με TBA και φωτομέτρηση στα 532 nm (Witte et al. 1970, Pikul et al. 1989), και
4. εκχύλιση του κρέατος με διάλυμα τριχλωροξικού οξέος παρουσία εξανίου και βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου, θέρμανση του εκχυλίσματος με TBA και μέτρηση με διαφορική φασματοφωτομετρία τρίτης παραγώγου (Botsoglou et al. 1994) .

Από τις παραλλαγές αυτές, οι δύο τελευταίες στις οποίες το κρέας δεν υποβάλλεται σε

απευθείας θέρμανση με TBA μπορεί να θεωρηθούν ως οι πλέον αξιόπιστες. Και αυτό γιατί αποφεύγεται έτσι η περαιτέρω οξείδωση του δείγματος. Εντούτοις, και η παραλλαγή N<sup>ο</sup> 3, παρά την απλότητά της, παρουσιάζει σημαντικά αναλυτικά προβλήματα, μερικά από τα οποία οφείλονται στην κατεργασία του δείγματος, ενώ άλλα στον τρόπο φωτομέτρησης του συμπλόκου. Εξαιτίας, μάλιστα, των αναλυτικών αυτών προβλημάτων που συχνά έχουν οδηγήσει σε εσφαλμένες εκτιμήσεις, η αξιοπιστία αυτού του δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης έχει κατά καιρούς αμφισβητηθεί (Salih et al. 1987). Τα προβλήματα που οφείλονται στην κατεργασία του δείγματος σύμφωνα με την παραλλαγή N<sup>ο</sup> 3, συνήθως, οφείλονται,

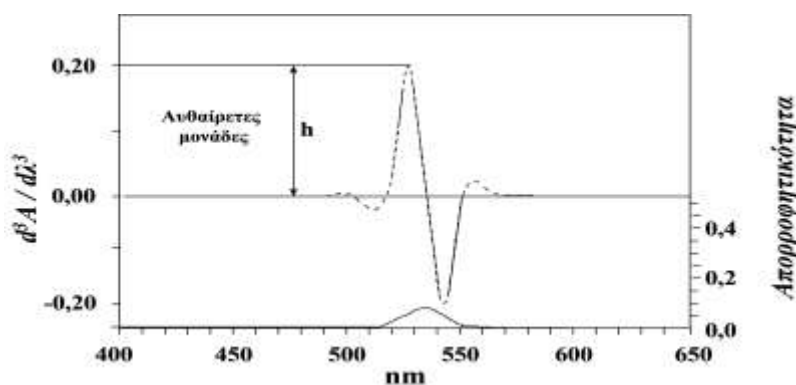
- σε αποδόμηση, κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, υπεροξειδίων και κυκλικών υπεροξειδίων που υπάρχουν άθικτα στο δείγμα που αναλύεται. Επειδή η αποδόμηση αυτή δεν είναι ελεγχόμενη και οδηγεί σε σχηματισμό MDA, οι συγκεντρώσεις MDA στα δείγματα που αναλύονται παρουσιάζουν συνήθως χαρακτηριστικά μεγάλη διακύμανση.
- σε μερική ή ολική οξείδωση όσων PUFAs έχουν μείνει άθικτα από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Στην περίπτωση αυτή η μέθοδος μπορεί να οδηγεί σε σημαντικές υπερεκτιμήσεις της MDA και χαμηλή επαναληψιμότητα μετρήσεων αν προηγουμένως δεν διασφαλιστεί η προστασία των PUFAs από τη δράση των ελευθέρων ριζών κατά την διάρκεια της κατεργασίας.
- στη μεγάλη τάση σύζευξης που παρουσιάζει η MDA με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ιδιότητα που δυσχεραίνει σε μεγάλο βαθμό την ανάκτησή της από τα εκχυλίσματα του κρέατος και, επομένως, και τον ποσοτικό προσδιορισμό της (Verbunt et al. 1995, Janero 1990, Draper et al. 1993).

Τα προβλήματα, πάλι, που οφείλονται στον τρόπο φωτομέτρησης του συμπλόκου σύμφωνα με την παραλλαγή No 3, οφείλονται,

- σε παρενοχλήσεις ουσιών, όπως η χολερυθρίνη, που συνήθως απαντούν στο κρέας και παρουσιάζουν απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος με αυτό του συμπλόκου TBA-MDA.
- σε παρενοχλήσεις ουσιών, όπως ορισμένοι υδατάνθρακες, αμινοξέα και νουκλεϊνικά οξέα, που έχουν την τάση να σχηματίζουν με το TBA παράγωγα που είναι ανάλογα με αυτά της MDA και, έτσι, να παρενοχλούν τη μέτρηση. Εξαιτίας αυτών των παρενοχλήσεων, οι περισσότεροι από τους ερευνητές που χρησιμοποιούν τη φωτομετρική αυτή δοκιμή αναφέρουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε TBARS

(TBA Reactive Substances), δηλαδή σε ουσίες που αντιδρούν με το TBA. Και αυτό επειδή δεν γνωρίζουν επακριβώς ποιες είναι οι ουσίες που ουσιαστικά προσδιορίζονται, παρ'όλο που χρησιμοποιούν σαν πρότυπη ουσία καθαρή MDA.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, έμπειροι ερευνητές στο πεδίο των ελευθέρων ριζών επεσήμαναν ότι η εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων σύμφωνα με την παραλλαγή N° 3 πρέπει να γίνεται με επιφυλακτικότητα, γιατί είναι δυνατόν να οδηγεί σε λανθασμένα συμπεράσματα. Έτσι, προτάθηκαν διάφορες τροποποιήσεις τόσο στη διαδικασία της κατεργασίας όσο και στην τελική μέτρηση, ώστε να περιοριστούν κατά το δυνατόν οι υπερεκτιμήσεις και οι μεγάλες διακυμάνσεις των μετρήσεων και, παράλληλα, να εξουδετερωθούν οι παρενοχλήσεις κατά τη μέτρηση, από ουσίες ξένες προς την MDA (Botsoglou et al. 1994).



**Εικόνα 3.** Κανονικό φάσμα απορρόφησης (-) και φάσμα τρίτης παραγώγου (---) του προϊόντος της αντίδρασης 32 ng MDA/ml με TBA. Το ύψος της κορυφής h σε αυθαίρετες μονάδες χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της MDA.

Από τις παραλλαγές που προτάθηκαν, η παραλλαγή N° 4 στην οποία η εκχύλιση του κρέατος γίνεται με διάλυμα τριγλωροξεϊκού οξέος παρουσία εξαίνιου και βουτυλιωμένου ύδροξυτολουολίου, ενώ η μέτρηση διενεργείται με διαφορική φασματοφωτομετρία τρίτης παραγώγου δηλαδή, με παραγωγή του φάσματος του συμπλόκου TBA-MDA στην περιοχή 400-650 nm και, στη συνέχεια, ποσοτική εκτίμηση της MDA με βάση το ύψος της κορυφής στα 521,5 nm, φαίνεται ως η πλέον κατάλληλη για το κρέας (Εικόνα 3).

Η παραλλαγή αυτή διασφαλίζει αξιόπιστη μέτρηση του συμπλόκου MDA-TBA χωρίς παρεμβολές από άλλες ενδογενείς ουσίες που απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος. Βέβαια, μέτρηση του συμπλόκου MDA-TBA χωρίς παρεμβολές από άλλες ουσίες μπορεί επίσης να γίνει και με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Carbonneau et al. 1991, Jentsch et al. 1996, Volpi & Tarugi 1998). Μάλιστα, η τεχνική αυτή επιτρέπει ακόμη

και απευθείας μέτρηση της MDA, δηλαδή χωρίς προηγούμενο σχηματισμό του παραγώγου της με TBA (Largilhere & Melancon 1988). Θα πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι αυτή η τεχνική, ενώ βελτιώνει την εκλεκτικότητα, είναι σχετικά χρονοβόρα και απαιτεί υψηλού κόστους εξοπλισμό.

#### **5.4 Μέθοδος εξανάλης**

Μια άλλη αρκετά διαδεδομένη μέθοδος που, επίσης, βασίζεται σε μέτρηση τελικού προϊόντος της οξειδωσης των λιπιδίων, είναι η μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης της εξανάλης (Shahidi et al. 1987). Η μέθοδος αυτή είναι σχετικά χρονοβόρα και απαιτεί υψηλού κόστους εξοπλισμό, αλλά μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες απαιτείται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων άλλων σχετικών μεθόδων.

Κατά τη μέθοδο αυτή, το δείγμα του κρέατος υποβάλλεται σε απόσταξη με υδρατμούς και η εξανάλη προσδιορίζεται σε μέρος του αποστάγματος με αεριοχρωματογραφική ανάλυση. Διάφοροι ερευνητές υποστήριξαν ότι η συγκέντρωση της εξανάλης που βρίσκεται με τη μέθοδο αυτή σε δείγματα κρέατος είναι σε γραμμική συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές TBA (Shahidi et al. 1987). Άλλοι, όμως, ερευνητές διαπίστωσαν ασυμφωνία των δύο αυτών μεθόδων σε δείγματα κρεατοσκευασμάτων (Ventanas et al. 2008, Armenteros et al. 2009). Η ασυμφωνία αυτή θα μπορούσε, ίσως, να αποδοθεί στο γεγονός ότι η τύχη της εξανάλης, η οποία σχηματίζεται από την οξείδωση ορισμένων PUFAs και κυρίως από το λινελαϊκό οξύ, είναι μάλλον πολύπλοκη, καθώς η εξανάλη μπορεί να συνεχίσει να εμπλέκεται σε περαιτέρω αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης των κρεατοσκευασμάτων.

#### **6. Οξείδωση πρωτεϊνών**

Μολονότι η οξείδωση των λιπιδίων απασχολεί τους ερευνητές εδώ και αρκετές δεκαετίες, το θέμα της οξείδωσης των πρωτεϊνών των τροφίμων ως αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου άρχισε να διερευνάται διεξοδικά τα τελευταία μόνο λίγα χρόνια. Και αυτό γιατί η έρευνα που έγινε τις τελευταίες δεκαετίες πάνω στο θέμα της οξείδωσης των πρωτεϊνών κατευθύνθηκε ως επί το πλείστον στη διερεύνηση των επιπτώσεων της οξειδωτικής καταπόνησης των μυικών ιστών στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών και περιορίστηκε ουσιαστικά στη συσχέτιση του ρόλου των οξειδωμένων πρωτεϊνών με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι το σύνδρομο Alzheimer, ο καρκίνος, το



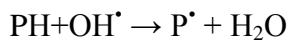
σύνδρομο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και η επιτάχυνση του γήρατος (Carney & Carney 1994, Stadman & Berlett 1997). Μόλις στα μέσα της δεκαετίας του 1990 και με βάση τη γνώση που προέκυψε από τις έρευνες των βιοϊατρικών επιστημών, εμφανίστηκαν οι πρώτες μελέτες σχετικά με την οξειδωση των πρωτεϊνών του κρέατος. Ακολούθησαν πολλές ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με την οξειδωτική τροποποίηση των μορίων των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της κατεργασίας και της συντήρησης του κρέατος και των προϊόντων του, με αποτέλεσμα, σήμερα, η οξειδωση των πρωτεϊνών να αποτελεί ένα από τα πλέον ελκυστικά θέματα έρευνας στην επιστήμη των τροφίμων.

### 6.1 Μηχανισμός οξειδωσης των πρωτεϊνών του κρέατος

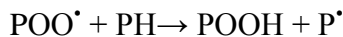
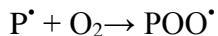
Οι ιδιαίτεροι μηχανισμοί και η χημική φύση των τελικών προϊόντων της οξειδωσης εξαρτώνται από το υπόστρωμα που οξειδώνεται, το οξειδωτικό σύστημα και την ένταση των οξειδωτικών συνθηκών (Davies 1987). Ακόμη, η μηχανική κατεργασία του κρέατος προκαλεί διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και φέρνει σε άμεση επαφή τις πρωτεΐνες και διάφορα από τα ενδογενή συστατικά με το μοριακό οξυγόνο που επιταχύνει την οξειδωση. Γενικά, συνηθισμένα επακόλουθα της οξειδωσης των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες είναι η οξειδωτική τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, η μετατροπή ορισμένων αμινοξέων σε άλλα, η θραύση του πεπτιδικού σκελετού και ο σχηματισμός σταυρωτών συζεύξεων εντός και μεταξύ των μορίων (Stadtman & Levine 2003).

Έχει διαπιστωθεί, ότι στην οξειδωση των πρωτεϊνών εμπλέκονται διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το ανιόν του σουπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\cdot-}$ ), η υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^{\cdot}$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων (LOOH) (Butterfield & Stadtman 1997). Πιθανές πρόδρομες ουσίες ή καταλύτες για το σχηματισμό των δραστικών αυτών μορφών οξυγόνου, είναι διάφορα φυσικά συστατικά των μυικών ιστών όπως τα ακόρεστα λιπίδια, οι χρωστικές της αίμης, ιόντα μεταβατικών μετάλλων και διάφορα ενζυμικά συστήματα (Xiong 2000).

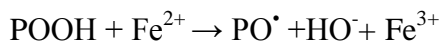
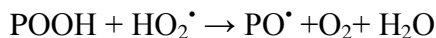
Συνήθεις στόχοι των δραστικών αυτών μορφών οξυγόνου, είναι ο πεπτιδικός σκελετός των πρωτεϊνών και οι υποκαταστάτες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Σε πρώτη φάση, μια ελεύθερη ρίζα ( $OH^{\cdot}$ ) αποσπά από την πρωτεΐνη (PH) ένα άτομο υδρογόνου και σχηματίζεται η αντίστοιχη ρίζα της πρωτεΐνης ( $P^{\cdot}$ ) (Stadtman & Levine 2003),



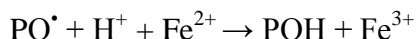
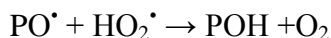
Η ρίζα αυτή μετατρέπεται, παρουσία οξυγόνου, σε υπεροξειδική ρίζα ( $POO^{\bullet}$ ) η οποία, στη συνέχεια, αποσπά από μια άλλη πρωτεΐνη (PH) ένα άτομο υδρογόνου και σχηματίζεται το αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο ( $POOH$ ) και η αντίστοιχη ρίζα της πρωτεΐνης ( $P^{\bullet}$ ),



Περαιτέρω αντιδράσεις του υδροϋπεροξειδίου με ελεύθερες ρίζες όπως η υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^{\bullet}$ ), ή με ανηγμένες μορφές μεταβατικών μετάλλων όπως τα ιόντα  $Fe^{2+}$  ή  $Cu^+$ , οδηγούν σε σχηματισμό της αντίστοιχης αλκοξειδικής ρίζας ( $PO^{\bullet}$ ),



Η ρίζα αυτή αντιδρά, στη συνέχεια, με την υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $HO_2^{\bullet}$ ) ή με ιόντα μεταβατικών μετάλλων προς σχηματισμό του αντίστοιχου υδροξυλιωμένου παραγώγου της πρωτεΐνης (POH),



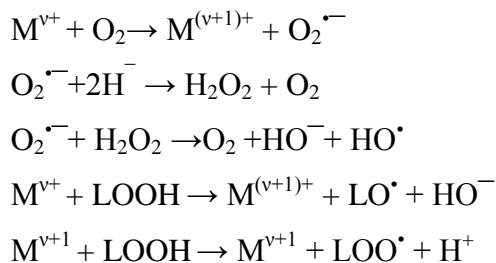
Σε συνθήκες ήπιας οξείδωσης δηλαδή με μικρές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, μερικά αμινοξέα όπως η κυστεΐνη που έχει στο μόριό της σουλφυδρυλική ομάδα, οξειδώνονται εύκολα (Viljanen et al. 2004, Estévez et al. 2008a, c). Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην άποψη ότι η γρήγορη και επιλεκτική οξείδωση ορισμένων αμινοξέων που παίζουν ασήμαντο ρόλο στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών σκοπεύει στην προστασία από την οξείδωση άλλων περισσότερο ευαίσθητων αμινοξέων (Levine et al. 1990).

Σε συνθήκες έντονης οξείδωσης όπως αυτές που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια οξειδώσεων από ιόντα μεταβατικών μετάλλων, παράγονται καρβονυλικές ενώσεις σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως να σημειωθεί, ότι εκτός από την ιδιαίτερη ευαισθησία του κάθε αμινοξέος στην οξείδωση, ακόμη και η ιδιαίτερη θέση του μέσα στην πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την οξείδωσή του και, επομένως, και την οξειδωτική του αποδόμηση. Ο σχηματισμός των καρβονυλικών ενώσεων προέρχεται κυρίως από την οξείδωση των αμινοξέων θρεονίνη, προλίνη, αργινίνη και λυσίνη (Stadtman & Levine 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, ο ρυθμός σχηματισμού καρβονυλικών ενώσεων κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία διαφόρων ενδογενών συστημάτων όπως είναι τα μεταβατικά μέταλλα, η μυοσφαιρίνη και τα

οξειδωμένα λιπίδια, καθώς και από παραμέτρους όπως το pH, η θερμοκρασία, ο φωτισμός, η ακτινοβολία και η παρουσία αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως είναι οι εξωγενείς φαινολικές ουσίες (Xiong 2000, Park et al. 2006a, b, Park & Xiong 2007, Viljanen et al. 2004, Estévez & Heinonen 2010).

Σε ό,τι αφορά την επίδραση των μεταβατικών μετάλλων, έχει βρεθεί ότι αυτά κυρίως ευθύνονται για το σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων από τις πλευρικές αλυσίδες της λυσίνης, της θρεονίνης, της αργινίνης και της προλίνης (Akagawa et al. 2006, Estévez et al. 2009). Έχει μάλιστα διαπιστωθεί ότι τόσο οι ανηγμένες (δότες ηλεκτρονίων) όσο και οι οξειδωμένες (δέκτες ηλεκτρονίων) μορφές των μεταβατικών μετάλλων είναι ικανές να προαγάγουν το σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων από πρωτεΐνες, διαμέσου αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Έτσι, παρουσία των μορφών αυτών, το μοριακό οξυγόνο ανάγεται και σχηματίζεται το ανιόν της ρίζας του σουπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\bullet -}$ ), το οποίο μετά από διαδοχικές αντιδράσεις σχηματίζει αρχικά  $H_2O_2$  και, στη συνέχεια, ρίζες υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), ενώ τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων (LOOH) διασπώνται και δίνουν αλκοξειδικές ή υπεροξειδικές ρίζες (Kanner et al. 1988),



Στη συνέχεια, οι ελεύθερες ρίζες, προσβάλλουν τις αμινομάδες των αμινοξέων λυσίνη, θρεονίνη, αργινίνη και προλίνη αφαιρώντας ένα άτομο υδρογόνου από το γειτονικό άτομο άνθρακα με ταυτόχρονο σχηματισμό της αντίστοιχης ρίζας της πρωτεΐνης (Akagawa et al. 2006).

Σε μια δεύτερη φάση, οι οξειδωμένες μορφές των μεταλλικών ιόντων ενώνονται με το μονήρες ηλεκτρόνιο της ρίζας της πρωτεΐνης με ταυτόχρονο σχηματισμό μιας ιμινομάδας, η οποία αυθόρμητα υδρολύεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης αλδεϋδομάδας. Με το μηχανισμό αυτό, η θρεονίνη μετατρέπεται σε α-αμινο-3-κετοβουτυρικό οξύ και η λυσίνη σε α-αμινοαδιπική ημιαλδεϋδη, ενώ η αργινίνη και προλίνη σε γ-γλουταμική ημιαλδεϋδη. Έχει διαπιστωθεί, ότι αυτές οι ημιαλδεϋδες μπορεί να αποτελούν το 23-60% του συνόλου των ολικών καρβονυλικών ενώσεων σε οξειδωμένο πλάσμα και πρωτεΐνες ήπατος (Requena et al. 2001, Akagawa et al. 2006) ή και μέχρι το 70% των ολικών καρβονυλικών ενώσεων σε μετρίως οξειδωμένα προϊόντα κρέατος (Utrera et al. 2012).

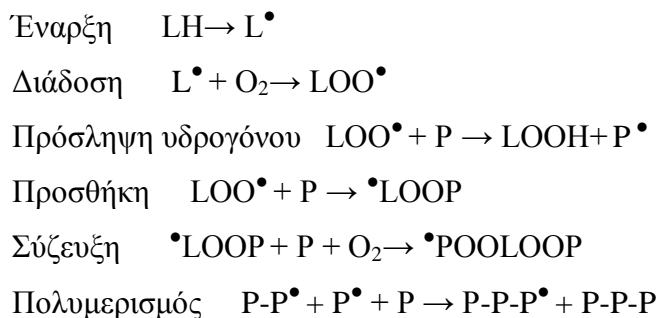
Σε ό,τι αφορά το ρόλο της μυοσφαιρίνης στην οξείδωση των πρωτεϊνών και, ιδιαίτερα, στο σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων, βρέθηκε ότι η εφαρμογή του συνδυασμού μυοσφαιρίνης και  $H_2O_2$  προκαλεί μεγαλύτερη παραγωγή α-αμινοαδипικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεύδης σε σχέση με τον συνδυασμό μυοσφαιρίνης και ιόντων  $Fe^{3+}$  ή  $Cu^{2+}$  (Estevez & Heinonen 2010). Άλλοι ερευνητές ανακοίνωσαν ότι ο συνδυασμός μεταμυοσφαιρίνης και  $H_2O_2$  ήταν περισσότερο αποτελεσματικός στην οξειδωτική αποδόμηση αμινοξέων όπως η λυσίνη, σε σχέση με οξειδωτικό σύστημα ιόντων σιδήρου (Park et al. 2006). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η οξείδωση της οξυμυοσφαιρίνης προς μεταμυοσφαιρίνη έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του ανιόντος της ρίζας του σουπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\bullet -}$ ), το οποίο ευνοεί την παραγωγή  $H_2O_2$ , μιας ουσίας η οποία είναι ικανή να προκαλεί την απελευθέρωση σιδήρου από το μόριο της αίμης και να επιταχύνει, έτσι, τις οξειδωτικές διεργασίες (Rhee et al. 1987).

## 6.2 Ο ρόλος των λιπιδίων στην οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος

Ο ρόλος των λιπιδίων στην οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος είναι ένα θέμα για το οποίο έχουν διατυπωθεί αντικρουόμενες απόψεις. Χρησιμοποιώντας διάφορα μοντέλα κρέατος, μερικοί ερευνητές διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση της οξειδωτικής κατάστασης των λιπιδίων με την οξείδωση των πρωτεϊνών (Mercier et al. 1998, Estevez et al. 2008), άλλοι (Liu et al. 1996) βρήκαν ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών επηρεάζεται ελάχιστα από την οξείδωση των λιπιδίων, ενώ κάποιιοι (Park et al. 2006) ανέφεραν ότι η οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών μπορεί να συσχετίζονται σε ορισμένα οξειδωτικά συστήματα όπως αυτά που παράγουν ρίζες υδροξυλίου, όχι όμως με άλλα που στηρίζονται στην παρουσία της μεταμυοσφαιρίνης. Αντίθετα, σε συστήματα τροφίμων, ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών διαπίστωσε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Viljanen et al. 2004, Ventanas et al. 2006, Ventanas et al. 2007, Estevez et al. 2008). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, δηλαδή ο τύπος του μυϊκού ιστού, το είδος του ζώου, κ.α., μπορεί να επηρεάζει σημαντικά την αλληλεπίδραση των δύο αυτών οξειδωτικών διεργασιών.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών παρουσία λιπιδίων προχωρά με αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών που είναι παρόμοιες με εκείνες της οξείδωσης των λιπιδίων και οδηγούν σε σχηματισμό ελευθέρων ριζών των πρωτεϊνών, πολυμερών, και συμπλόκων πρωτεϊνών και λιπιδίων (Park et al. 2006). Οι κύριοι στόχοι των ελευθέρων ριζών είναι οι πλευρικές

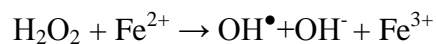
αλυσίδες των αμινοξέων καθώς και ο πεπτιδικός σκελετός των πρωτεϊνών. Η δράση αυτή συχνά καταλήγει σε πολυμερισμό ή κατακερματισμό του μορίου των πρωτεϊνών. Στην παρακάτω Εικόνα απεικονίζεται η πιθανή πορεία των αντιδράσεων οξειδωσης των πρωτεϊνών παρουσία λιπιδίων.



**Εικόνα 4.** Η πιθανή πορεία των αντιδράσεων οξειδωσης των πρωτεϊνών (P) παρουσία λιπιδίων (LH).

Αξίζει ίσως ιδιαίτερα να τονιστεί το γεγονός ότι η οξειδωση των λιπιδίων ολοκληρώνεται ταχύτερα από την οξειδωτική αποδόμηση των πρωτεϊνών και, επομένως, είναι περισσότερο πιθανόν η οξειδωση των πρωτεϊνών να προάγεται από τις ελεύθερες ρίζες και τα υδροϋπεροξειδία που προέρχονται από την οξειδωση των λιπιδίων (Viljanen et al. 2004, Estevez et al. 2008). Αυτός φαίνεται ότι είναι άλλωστε και ο λόγος για τον οποίο όταν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δευτερογενών προϊόντων της οξειδωσης των λιπιδίων καταγράφονται, η παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων των πρωτεϊνών δεν έχει φθάσει ακόμη τη μέγιστή της τιμή η οποία σημειώνεται αρκετές ημέρες αργότερα (Estevez et al. 2008).

Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί το γεγονός ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών και η αποδόμηση των αμινοξέων μπορεί να πραγματοποιηθούν και ανεξάρτητα από την παρουσία λιπιδίων. Η οξειδωση, μάλιστα, των πρωτεϊνών από ιόντα σιδήρου είναι ένα φαινόμενο που απαντάται συχνά απουσία λιπιδίων. Έχει διατυπωθεί, μάλιστα, η άποψη ότι η οξειδωση αυτή προχωρά διαμέσου σχηματισμού ριζών υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ), οι οποίες παράγονται από  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε περιοχές του μορίου των πρωτεϊνών όπου απαντούν ιόντα σιδήρου (Stadtman 1990),

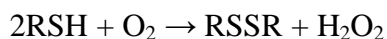
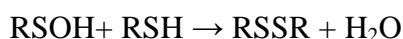
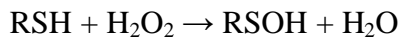


Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως, να επισημανθεί και η διαπίστωση ότι η οξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά απίθανο να εκδηλωθούν ανεξάρτητα σε συστήματα κρεάτων.

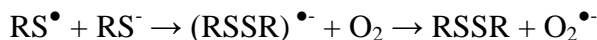
### 6.3 Προϊόντα της οξειδωσης των πρωτεϊνών

Μολονότι όλες οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών είναι θεωρητικά ευάλωτες στην προσβολή από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, στην πράξη όλα τα αμινοξέα δεν είναι εξίσου ευάλωτα. Περισσότερο ευάλωτα στην οξείδωση από ελεύθερες ρίζες είναι τα αμινοξέα που έχουν ως πλευρικές αλυσίδες σουλφυδρυλο- και αμινο-ομάδες, μιδαζολικούς και ινδολικούς δακτυλίους, καθώς και θειοαιθερικούς δεσμούς. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι πρωτεΐνες όπως η μυοσίνη, μπορεί να περιέχουν μέχρι και 40 ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες. Έτσι, αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η λυσίνη, η αργινίνη, η ιστιδίνη, η θρυπτοφάνη, η σερίνη και η προλίνη συνιστούν τους συνήθεις στόχους των δραστικών μορφών οξυγόνου που παράγονται μέσω της οξείδωσης των λιπιδίων (Gardner 1979, Stadtman & Berlett 1997).

Η οξείδωση θειούχων αμινοξέων όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, οδηγεί γρήγορα σε σχηματισμό θειούχων προϊόντων όπως σουλφονικά, σουλφοξειδικά και δισουλφιδικά παράγωγα (Vogt 1995, Stadtman & Levine 2003). Ιδιαίτερα η σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης είναι πολύ ευάλωτη στην οξείδωση από  $H_2O_2$ , το οποίο σχηματίζεται στα κύτταρα και συναθροίζεται μετά τη σφαγή στο κρέας (Harel & Kanner 1985). Εντούτοις, η ταχύτητα αντίδρασης του  $H_2O_2$  με πεπτιδία ή πρωτεΐνες που περιέχουν κυστεΐνη είναι, μάλλον, μικρή (Winterbourn & Metodiewa 1999). Γενικά, η οξείδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων των αμινοξέων οδηγεί σε μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων που καταλήγουν σε σχηματισμό διαφόρων προϊόντων όπως είναι το σουλφενικό οξύ (RSOH), το σουλφινικό οξύ (RSOOH) και οι δισουλφιδικές ενώσεις (RSSR) (Winterbourn & Metodiewa 1999).



Στο σημείο αυτό θα πρέπει ιδιαίτερα να επισημανθεί ότι κατά τη διάρκεια της οξείδωσης μπορεί να λάβουν χώρα και περισσότερο πολύπλοκες αντιδράσεις με διάφορες σουλφυδρυλικές ρίζες ( $RS^\bullet$ ,  $RSSR^\bullet$ ) (Davies 2005),



Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί ότι οι αναφερόμενες στη βιβλιογραφία απώλειες σουλφυδρυλικών ομάδων κατά την συντήρηση ιχθύων και κρεάτων παρουσιάζουν, συχνά, πολύ ευρύ φάσμα τιμών. Έτσι, μερικοί ερευνητές (Srinivasan & Xiong 1997, Wang et al. 1997) διαπίστωσαν ότι οι σουλφυδρυλικές ομάδες ενός συμπυκνώματος πρωτεΐνης παρουσίασαν μείωση μέχρι 33% μετά από ψύξη ή κατάψυξη.

Επίσης, απώλεια 6% βρέθηκε σε φέτες χοιρινού κατά την συντήρησή τους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα οξυγόνου για 14 ημέρες (Lund et al. 2007), ενώ απώλεια 37% διαπιστώθηκε σε χοιρινό κιμά που συντηρήθηκε για 7 ημέρες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα οξυγόνου (Lund et al. 2008). Παρόμοιες απώλειες σουλφιδρυλικών ομάδων ανάλογα με τον τύπο του μυϊκού ιστού, τις πειραματικές συνθήκες και το είδος του ζώου βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες (Martinaud et al. 1997), ενώ μεγαλύτερες απώλειες σουλφιδρυλικών ομάδων που έφθαναν το 92% ανάλογα με τις οξειδωτικές συνθήκες, καταμετρήθηκαν σε μυϊκά ινίδια ή απομονωμένη μυοσίνη (Liu et al. 2000, Lund et al. 2008). Τα αποτελέσματα όλων αυτών των μελετών υποδεικνύουν ότι οι σουλφιδρυλικές ομάδες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών.

Εκτός από την απώλεια των σουλφιδρυλικών ομάδων, η παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων όπως αλδεΰδες και κετόνες μικρού μοριακού βάρους, είναι μια ακόμη σημαντική μεταβολή που συνοδεύει την οξείδωση των πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός των καρβονυλικών ενώσεων συνιστά μια μη αντιστρεπτή και μη ενζυμική τροποποίηση των πρωτεϊνών, η οποία προχωρεί διαμέσου τεσσάρων διαφορετικών μεταβολικών οδών (Berlett & Stadtman 1997). Η πρώτη από αυτές τις οδούς, συνίσταται σε απευθείας οξείδωση των αμινομάδων των πλευρικών αλυσίδων της θρεονίνης, προλίνης, αργινίνης και λυσίνης (Requena et al. 2001). Η δεύτερη οδός αφορά τη μη ενζυμική αντίδραση των πρωτεϊνών με αναγωγικά σάκχαρα προς σχηματισμό βάσεων του Schiff και τελικό σχηματισμό δικαρβονυλικών ενώσεων (Akagawa et al. 2005). Η τρίτη οδός συνίσταται στην οξειδωτική διάρρηξη του πεπτιδικού σκελετού των πρωτεϊνών διαμέσου του α-αμιδικού μεταβολικού μηχανισμού ή διαμέσου της οξείδωσης των γλουταμινικών πλευρικών αλυσίδων (Garrison 1987, Berlett & Stadtman 1997). Τέλος, η τέταρτη οδός αφορά την ομοιοπολική σύζευξη των πρωτεϊνών με καρβονυλικές ενώσεις μη πρωτεϊνικής φύσεως όπως είναι η 4-υδροξυ-2-εννεάλη και η μηλονική διαλδεΰδη, δύο προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων (Feeney et al. 1975). Μεταξύ των τεσσάρων αυτών μεταβολικών οδών, η πρώτη, που προχωρά με αντιδράσεις απαμίνωσης, θεωρείται ως η κύρια οδός σχηματισμού καρβονυλικών ενώσεων από την άμεση οξειδωτική προσβολή των πρωτεϊνών του κρέατος (Stadtman & Levine 2000, Estévez et al. 2009, Estévez & Heinonen 2010). Η θεώρηση αυτή επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα των Levine et al. (1990) οι οποίοι διερευνώντας την οξείδωση των πρωτεϊνών *in vitro* διαπίστωσαν τη μετατροπή ορισμένων αμινομάδων σε καρβονυλικές ενώσεις.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μερικοί ερευνητές (Martinaud et al. 1997) ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε καρβονυλικές ομάδες παρουσίαζε βαθμιαία αύξηση κατά

τη διάρκεια της ωρίμανσης του κρέατος. Άλλοι ερευνητές (Xiong & Decker 1995) ανακοίνωσαν ότι οι συγκεντρώσεις καρβονυλικών ενώσεων σε μυϊκό ιστό γαλόπουλων που είχε υποβληθεί σε τεχνητή οξείδωση με ιόντα σιδήρου και ασκορβικό οξύ παρουσίαζαν αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η αύξηση των καρβονυλικών ενώσεων συνέπιπτε με μείωση κατά 24% των ε-αμινοομάδων στα ίδια δείγματα. Μάλιστα, κάποιοι ερευνητές (Mercier et al. 1998) παρατήρησαν και μειωμένη παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων σε κρέας γαλόπουλων μετά την προσθήκη στην τροφή τους βιταμίνης E. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι και οι καρβονυλικές ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της οξείδωσης των πρωτεϊνών (Levine et al. 1990).

Γενικά, οι καρβονυλικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές ουσίες ανεξαρτήτως του αν προέρχονται από πρωτεΐνες ή σχηματίζονται από μη πρωτεϊνικής φύσεως ουσίες. Μέχρι τα τελευταία λίγα χρόνια, η ακριβής σύνθεση των ενώσεων αυτών δεν ήταν γνωστή, γεγονός που εμπόδιζε κάθε προσπάθεια διερεύνησης της εμπλοκής τους σε περαιτέρω αντιδράσεις. Μόλις στις αρχές του 2000 διατυπώθηκε η άποψη ότι οι καρβονυλικές ενώσεις που ήταν συζευγμένες με πρωτεΐνες μπορεί να εμπλέκονταν σε αντιδράσεις με ελεύθερες αμίνες προς σχηματισμό κροσσωτών συζεύξεων μεταξύ των πολυπεπτιδίων. Διάφοροι, μάλιστα, ερευνητές (Stadtman & Levine 2000, Akagawa et al. 2006) υποστήριξαν την πιθανή εμπλοκή των καρβονυλικών ενώσεων σε αντιδράσεις συμπύκνωσης με αμινομάδες από γειτονικές πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων προς σχηματισμό κροσσωτών συζεύξεων διαμέσου δεσμών Schiff. Πρόσφατα, άλλοι ερευνητές (Estévez et al. 2009, Estévez & Heinonen 2010) διαπιστώνοντας ότι η αρχική αύξηση των συγκεντρώσεων της α-αμινοαδιπικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεύδης κατά την οξείδωση πρωτεϊνών από ιόντα μεταβατικών μετάλλων συνοδευόταν από σημαντική μείωση των συγκεντρώσεών τους, παρατήρησαν ότι η μείωση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε εμπλοκή των ενώσεων αυτών σε περαιτέρω αντιδράσεις. Γενικά θεωρείται ότι η αλδεϋδική ομάδα των καρβονυλικών ενώσεων μπορεί να εμπλέκεται σε,

- αντιδράσεις κατά τις οποίες η αλδεϋδομάδα οξειδώνεται προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (Sell et al. 2008)
- αντιδράσεις με αλδεϋδομάδες άλλων καρβονυλικών ενώσεων πρωτεϊνών προς σχηματισμό προϊόντων αλδολικής συμπύκνωσης (Eyre 1984, Dolz & Heidemann 1989),
- αντιδράσεις με α-αμινομάδες γειτονικών αμινοξέων πρωτεϊνών, κυρίως της



λυσίνης, προς σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών διαμέσου σχηματισμού βάσεων Schiff (Eyre 1984, Dolz & Heidemann 1989), και

- αντιδράσεις με α-αμινομάδες ελευθέρων αμινοξέων προς σχηματισμό αλδευδών τύπου Strecker διαμέσου οξειδωτικής απαμίνωσης και αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων παρουσία των καρβονυλικών ενώσεων (Estévez et al. 2011)

Έτσι όταν η καρβονυλική ομάδα μιας οξειδωμένης πρωτεΐνης βρεθεί σε άμεση γειτονία με την πυρηνόφιλη ομάδα άλλης πρωτεΐνης όπως η ελεύθερη αμινομάδα της λυσίνης, μπορεί να αντιδράσει μαζί της σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό (βάση Schiff) και προκαλώντας τη σύζευξη των δύο πρωτεϊνών. Τέτοιοι δεσμοί βάσεων Schiff συμβάλλουν στον πολυμερισμό, τη συσσωμάτωση και, σε ορισμένες περιπτώσεις, την απώλεια της ικανότητας διαλυτοποίησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών, γεγονός που παρατηρείται συχνά σε συμπυκνωμένα προϊόντα με βάση το κρέας και είναι μεγάλης σημασίας για τη βιομηχανία της επεξεργασίας του κρέατος (Xiong & Decker 1995). Επιπλέον, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ δύο οξειδωμένων πρωτεϊνών μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών καθώς και συζεύξεων μεταξύ των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (Gardner 1979). Ακόμη, η αναδίπλωση των μορίων των οξειδωμένων πρωτεϊνών και η έκθεση των υδρόφοβων αμινοξέων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υδρόφοβη σύζευξη των πρωτεϊνών. Πιστεύεται (Decker et al. 1993, Srinivasan & Xiong 1997), ότι η σύζευξη μιας οξειδωμένης πρωτεΐνης με μια άλλη μπορεί να προχωρήσει, όχι μόνο διαμέσου βάσεων Schiff, αλλά και με:

- οξείδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων των μορίων της κυστεΐνης προς σχηματισμό δισουλφιδικών συζεύξεων
- σύζευξη δύο οξειδωμένων μορίων τυροσίνης
- σχηματισμό δεσμού μεταξύ δύο ελευθέρων αμινομάδων λυσίνης δύο πρωτεϊνών διαμέσου μιας διαλδεύδης και,
- αντιδράσεις συμπύκνωσης των ελευθέρων ριζών δύο πρωτεϊνών

Η κροσσωτή σύζευξη μεταξύ και εντός των πρωτεϊνών των μυικών ιστών μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό μιας ποικιλίας κροσσωτά συζευγμένων προϊόντων οξείδωσης και, στη συνέχεια, τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός κροσσωτά συζευγμένων δισουλφιδικών ενώσεων έχει παρατηρηθεί σε φρέσκο κρέας, ενώ ο σχηματισμός κροσσωτά συζευγμένης διτυροσίνης, έχει επίσης παρατηρηθεί σε μοντέλα μυικού ιστού (Lund et al. 2008). Η διτυροσίνη σχηματίζεται από την οξείδωση της

τυροσίνης διαμέσου του σχηματισμού της ρίζας του τυροσυλίου (Davies et al. 2003). Αν και ο σχηματισμός της έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μελέτες (Bertram et al. 2007), πιστεύεται ότι η οδός σχηματισμού κροσσωτά συζευγμένων δισουλφιδικών ενώσεων είναι αυτή που κυριαρχεί στο κρέας, αφού οι δισουλφιδικές ενώσεις είναι οι μόνες κροσσωτά συζευγμένες ενώσεις που έχουν μέχρι τώρα ταυτοποιηθεί στο κρέας (Lund et al. 2007). Άλλωστε και οι περισσότερες σχετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο κύριος μηχανισμός προχωρά διαμέσου σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών και σε μικρότερο βαθμό διαμέσου σχηματισμού διτυροσίνης (Lund et al. 2011).

Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως να επισημανθεί ότι η έκταση των συζεύξεων μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει τη ζελατινοποίηση των κρεατοσκευασμάτων, ενώ η έκταση των συζεύξεων μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών και των λιπιδίων μπορεί να επηρεάσει τη γαλακτωματοποίηση των κρεατοσκευασμάτων. Επιπλέον, η έκταση των συζεύξεων μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών και του νερού μπορεί να επηρεάσει την ενυδάτωση ή την ικανότητα σύζευξης του νερού των κρεατοσκευασμάτων.

Πολλές *in vitro* μελέτες σχετικά με τη δράση των ελευθέρων ριζών στην οξειδωση των πρωτεϊνών, έδειξαν ότι ταυτόχρονα με το σχηματισμό των πολυμερών των πρωτεϊνών μπορεί να παρατηρηθεί και διάρρηξη των πεπτιδικών δεσμών (Garrison 1987, Ushida et al. 1992, Decker et al. 1993, Liu & Xiong 1997). Για τη διάρρηξη αυτή έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, των οποίων κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η ρίζα  $\text{OH}^\bullet$ . Έτσι σύμφωνα με έναν από αυτούς, η ρίζα  $\text{OH}^\bullet$  προσβάλλει τις πλευρικές αλυσίδες του γλουταμινικού και του ασπαρτικού οξέος, αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου από καθένα από τα δύο αυτά αμινοξέα. Η απόσπαση αυτή μπορεί να οδηγήσει τελικά σε διάρρηξη των πεπτιδικών δεσμών (Garrison 1987). Σύμφωνα με έναν άλλο μηχανισμό, η διάρρηξη των πεπτιδικών δεσμών οφείλεται στη δράση της ρίζας  $\text{OH}^\bullet$  επί της προλίνης και τη μετατροπή της σε παράγωγα της 2-πυρρολιδόνης (Ushida et al. 1992). Σύμφωνα πάλι με έναν τρίτο μηχανισμό, η διάρρηξη των πεπτιδικών δεσμών οφείλεται στη δράση της ρίζας  $\text{OH}^\bullet$  και την πρόσληψη ατόμων υδρογόνου από το α-άτομο άνθρακος του πεπτιδικού δεσμού (Stadtman & Berlett 1997).

Αξίζει, επιπλέον, να σημειωθεί ότι η έντονη οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε μετατροπή της ιστιδίνης σε οξοϊστιδίνη και παράγωγα της ιμιδαζολόνης, της θρυπτοφάνης σε κυνουρενίνη ή N-φορμυλοκυνουρενίνη και της λευκίνης και βαλίνης στα αντίστοιχα υδροξυλιωμένα παράγωγα (Stadtman & Levine 2000). Ακόμη μπορεί να σχηματιστούν και προϊόντα κροσσωτής σύζευξης που συνήθως αποδίδονται σε σχηματισμό

κυστίνης από δύο μόρια κυστεΐνης και διτυροσίνης από δύο μόρια τυροσίνης (Lund et al. 2011).

## **7. Επίδραση της οξείδωσης των πρωτεϊνών στην ποιότητα του κρέατος**

Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει πολλαπλές φυσικοχημικές μεταβολές όπως καταστροφή των αμινοξέων, μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών εξαιτίας του πολυμερισμού τους, απώλεια της δραστηριότητας των ενζύμων και μειωμένη πεπτικότητα των πρωτεϊνών (Xiong 2000). Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις μεταβολές, είναι εύκολο να υποθέσει κανείς ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του κρέατος μεταβάλλοντας τεχνολογικές και θρεπτικές ιδιότητές του, καθώς και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως είναι η υφή και η γεύση.

### **7.1 Τεχνολογικές ιδιότητες**

Οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων προσδιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του κρέατος καθώς και την επιτυχία των ποικίλων τεχνολογικών διαδικασιών που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια παρασκευής των προϊόντων κρέατος. Και αυτό, γιατί οι πρωτεΐνες των μυικών ινιδίων συνιστούν περίπου το 82-87% της ολικής μυικής μάζας, ενώ περικλείουν περίπου το 85% του περιεχόμενου νερού (Huff-Lonergan & Lonergan 2005, Puolanne & Halonen 2010).

Η σύνθεση και η αλληλουχία των αμινοξέων και των πεπτιδίων σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά και την κατανομή των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη δομή των μορίων των πρωτεϊνών, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τη λειτουργικότητά τους. Και αυτό γιατί ενώ οι πρωτεΐνες των μυικών ινιδίων του κρέατος περιβάλλονται από νερό, οι απολικές (υδρόφοβες) ομάδες εγκλωβίζονται μέσα στα μόρια των αμινοξέων και μόνο οι πολικές (υδρόφιλες) ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων είναι εκτεθειμένες στην υδατική φάση. Η αλληλεπίδραση των πολικών ομάδων των πρωτεϊνών με τα μόρια του νερού εντός των μυικών ινιδίων, είναι απαραίτητη για την εμφάνιση τεχνολογικών ιδιοτήτων, όπως η ικανότητα ζελατινοποίησης και γαλακτωματοποίησης και, ιδιαίτερα, η ικανότητα κατακράτησης νερού (Huff-Lonergan & Lonergan 2005, Puolanne & Halonen 2010). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ικανότητα κατακράτησης νερού, που εκφράζει την ικανότητα του κρέατος να συγκρατεί το δικό του ή το προστιθέμενο νερό κατά τη διάρκεια εφαρμογής κάποιας διαδικασίας, εμπλέκεται σε πολλές τεχνολογικές διαδικασίες στις οποίες η

κατακράτηση του νερού παίζει κύριο λόγο και μπορεί να επηρεάσει σημαντικές παραμέτρους ποιότητας μεταξύ των οποίων και το χυμώδες του κρέατος.

Οι πολικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών που είναι προσανατολισμένες προς την υδατική φάση, εκτίθενται περισσότερο στη δράση υδατοδιαλυτών οξειδωτικών παραγόντων όπως τα ιόντα μετάλλων και, επομένως, είναι περισσότερο δεκτικές σε οξείδωση (Puolanne & Halonen 2010). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων από βασικά αμινοξέα όπως η αργινίνη και η λυσίνη διαμέσου του μηχανισμού της οξειδωτικής απαμίνωσης και, τελικά, τη μεταβολή της κατανομής των ηλεκτρικών φορτίων των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων (Davies & Delsignore 1987, Stadtman 1990). Άμεση συνέπεια των χημικών αυτών μεταβολών είναι η απορρύθμιση της ισορροπίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών και του νερού, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας κατακράτησης νερού, τη μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών και, τελικά, τη μετουσίωσή τους.

Αρκετοί ερευνητές ανακοίνωσαν ότι η ελαττωμένη πρωτεολυτική ικανότητα και κροσσωτή σύζευξη των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων εξαιτίας της οξείδωσης των πρωτεϊνών μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την ικανότητα κατακράτησης νερού και το χυμώδες του κρέατος (Huff-lonergan & Lonergan 2005). Άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι η οξείδωση μυικών ινιδίων από  $H_2O_2$  είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της κατακράτησης του νερού καθώς και την παραγωγή διτυροσίνης, ενός προϊόντος της οξειδωτικής κροσσωτής σύζευξης των πρωτεϊνών (Bertram et al. 2007). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η αρνητική επίδραση της οξείδωσης των πρωτεϊνών στην ικανότητα κατακράτησης νερού του κρέατος θα μπορούσε να επηρεάσει ειδικές τεχνολογικές διαδικασίες όπως η κατεργασία του κρέατος πριν από το μαγείρεμά του (Liu et al. 2009, 2010). Έτσι, η μείωση της ικανότητας κατακράτησης νερού από μυικά ινίδια που είχαν υποβληθεί σε ισχυρή οξείδωση θεωρήθηκε υπεύθυνη για τις μεγάλες απώλειες νερού κατά το μαγείρεμα που οδήγησαν και σε μείωση του χυμώδους του κρέατος (Liu et al. 2009). Πρόσφατα, μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι η παρατεταμένη συντήρηση χοιρινού κρέατος σε ψύξη οδήγησε αρχικά σε αύξηση των καρβονυλικών ενώσεων και, στη συνέχεια, σε μείωσή τους καθώς και σε ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας κατακράτησης του νερού (Estévez et al. 2011). Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν την εμπλοκή των καρβονυλικών ενώσεων στη μείωση της ικανότητας κατακράτησης του νερού.

Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί ότι η μεταβολή της δομής των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων εξαιτίας της οξείδωσής τους, μπορεί να προκαλέσει αναδίπλωση των

πρωτεϊνών, να αυξήσει τον υδρόφοβο χαρακτήρα της επιφάνειας, να ευνοήσει το σχηματισμό συσσωματωμάτων και, τελικά, τη μη αντιστρεπτή μετουσίωση των πρωτεϊνών (Xiong 2000). Για τους λόγους αυτούς, οι οξειδωμένες πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές και περισσότερο ευαίσθητες στη θερμική μετουσίωση σε σύγκριση με τις μη οξειδωμένες (Parkington et al. 2000, Rowe et al. 2004, Park et al. 2006, Santé-Lhoutellier et al. 2007, Wang et al. 2009, Chan et al. 2011, Sun et al. 2011). Στο σημείο αυτό θα πρέπει ιδιαίτερα να επισημανθεί και η άποψη πολλών ερευνητών, ότι οι καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών, είναι δυνατόν να προκαλούν περαιτέρω απώλεια της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών, εξαιτίας της τάσης τους να εμπλέκονται σε κροσσωτές συζεύξεις μεταξύ και εντός των μορίων των πρωτεϊνών (Xiong 2000, Liu et al. 2009, Liu et al. 2010).

Αξίζει, ίσως, να αναφερθεί και η άποψη ότι η ήπια οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος και, ιδιαίτερα, ο σχηματισμός καρβονυλικών ενώσεων μπορεί να έχουν θετικές επιπτώσεις στην ικανότητα σχηματισμού πηκτής και γαλακτωμάτων των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων (Srinivasan et al. 1996, Xiong 2000). Οι θετικές αυτές επιπτώσεις έχουν αποδοθεί σε βελτίωση της σταθερότητας των πηκτών και των ρεολογικών τους ιδιοτήτων, διαμέσου του σχηματισμού συζεύξεων μετά από αντιδράσεις συμπύκνωσης των καρβονυλικών ενώσεων με αμινομάδες των αμινοξέων (Xiong 2000). Αντίθετα, η έντονη οξείδωση των πρωτεϊνών του κρέατος μπορεί να προκαλέσει μείωση των τεχνολογικών τους ιδιοτήτων εξαιτίας υπερβολικού και ανεξέλεγκτου σχηματισμού συσσωματωμάτων.

## 7.2 Θρεπτικές ιδιότητες

Η διατροφική αξία του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων που συντηρούνται σε οξειδωτικό περιβάλλον είναι ένα θέμα που χρήζει διερεύνησης σε βάθος, γιατί το κρέας αποτελεί κύρια πηγή πρωτεϊνών με μεγάλη βιολογική αξία για τον άνθρωπο (Xiong 2000, Lund et al. 2011). Είναι γνωστό, ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της θρεπτικής τους αξίας σε ό,τι αφορά τη διαθεσιμότητα των απαραίτητων αμινοξέων. Και αυτό, γιατί πολλά από τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οξειδώνονται και σχηματίζονται καρβονυλικές ενώσεις και παράγωγά τους των οποίων οι επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών δεν έχουν ακόμη πλήρως διερευνηθεί (Stadtman & Berlett 1997). Αμινοξέα με βασικές πλευρικές αλυσίδες που αποτελούν απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο όπως η λυσίνη, η ιστιδίνη και η αργινίνη, καθώς και η θρεονίνη οξειδώνονται, με αποτέλεσμα τη μείωση των συγκεντρώσεών τους στο κρέας και τα

προϊόντα του. Ακόμη, η φαινυλαλανίνη και η θρυπτοφάνη που, επίσης, αποτελούν απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο, οξειδώνονται και η απώλειά τους από το κρέας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της διαθεσιμότητάς τους για τον άνθρωπο (Ganhao et al. 2010).

Πέρα από την απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων, η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί, επίσης, να επηρεάσει και την πεπτικότητά τους μειώνοντας, έτσι, τη θρεπτική τους αξία. Η μετουσίωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών καταλήγει, πολλές φορές, σε αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα, εξαιτίας της αναδίπλωσης του μορίου τους και τη μεγαλύτερη έκθεση των πεπτιδικών δεσμών στη δράση των πρωτεασών (Agarwall & Sohal 1994). Έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι οι ήπιες οξειδώσεις προκαλούν μικρές αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών και, έτσι, διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τις πρωτεάσες με αποτέλεσμα αυξημένη πρωτεόλυση (Grune et al. 2004). Αντίθετα, οι έντονες οξειδώσεις προκαλούν σχηματισμό συσσωματωμάτων πρωτεϊνών και οξειδωτική αποδόμηση των πλευρικών αλυσίδων ορισμένων αμινοξέων που μεταβάλλουν τα σημεία αναγνώρισης και οδηγούν σε μείωση της πρωτεόλυσης. Πρόσφατες μελέτες με πρωτεΐνες μυικών ινιδίων επιβεβαίωσαν την άποψη ότι η έντονη οξείδωση μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωμένη πρωτεόλυση η οποία μειώνει την πεπτικότητα των πρωτεϊνών (Morzel et al 2006, Sante-Lhoytellier et al. 2008). Η μειωμένη πεπτικότητα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών, γιατί οι μη υδρολυμένες πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν ζύμωση από τη μικροχλωρίδα του εντέρου προς σχηματισμό φαινόλης και *para*-κρεσόλης, ουσιών με μεταλλαξιγόνες ιδιότητες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου.

Μεγάλη προσοχή έχει δοθεί πρόσφατα στους κινδύνους που εγκυμονεί για την υγεία των καταναλωτών η οξείδωση των πρωτεϊνών. Και αυτό, γιατί τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και τα προϊόντα της αποσύνθεσής τους θεωρούνται τοξικά και μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στις πρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες των καταναλωτών, επηρεάζοντας έτσι τις ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού (Ladicos & Lougonois 1990). Ωστόσο δεν έχει, ακόμη, διευκρινιστεί σε ποιο βαθμό η κατανάλωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών θα μπορούσε να επηρεάσει την υγεία του ανθρώπου, γιατί οι πραγματικές επιπτώσεις από την πρόσληψη οξειδωμένων πρωτεϊνών δεν έχουν ακόμη πλήρως διερευνηθεί (Evenepoel et al. 1998).

### 7.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Οι επιπτώσεις της οξειδωσης των πρωτεϊνών στα χαρακτηριστικά της υφής και της γεύσης του κρέατος και των προϊόντων του δεν έχουν ακόμη διεξοδικά μελετηθεί (Lund et al. 2011). Πολλές σχετικές μελέτες έχουν αναφερθεί στην συσχέτιση της οξειδωσης των πρωτεϊνών, όπως αυτή αποτιμάται με την αύξηση της συγκέντρωσης των καρβονυλικών ενώσεων, με τη μείωση της τρυφερότητας του βόειου κρέατος (Rowe et al. 2004, Zakrys et al. 2009), αλλά το αίτιο της συσχέτισης αυτής δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών επηρεάζει την τρυφερότητα του κρέατος (Rowe et al. 2004, Carlin et al. 2006, Huff-Lonergan et al. 2010) προκαλώντας,

- μείωση της πρωτεολυτικής αποδόμησης των πρωτεϊνών του κρέατος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του, και
- αύξηση των κροσσωτών συζεύξεων των πρωτεϊνών διαμέσου δισουλφιδικής σύζευξης.

Ο πρώτος από αυτούς τους μηχανισμούς αποτελεί, ίσως, τη συνισταμένη δύο άλλων επιπτώσεων της οξειδωσης των πρωτεϊνών και, συγκεκριμένα, την ανενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται με την τρυφερότητα του κρέατος, καθώς και την οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών των μυικών ινιδίων που οδηγεί σε μείωση της πρωτεολυτικής αποδόμησης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ένζυμα της καλπαϊνης έχουν στα ενεργά κέντρα του μορίου τους ιστιδίνη και κυστεΐνη, είναι προφανές ότι η οξειδωτική αποδόμηση αυτών των αμινοξέων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανενεργοποίηση των ενζύμων (Lametsch et al. 2008). Επιπλέον, μια αύξηση των κροσσωτών συζεύξεων των πρωτεϊνών θα ισχυροποιούσε τη δομή των μυικών ινιδίων προκαλώντας σκλήρυνση του κρέατος (Lund et al. 2007a, 2007b). Εξάλλου, μαζική συμμετοχή των καρβονυλικών ενώσεων των οξειδωμένων πρωτεϊνών σε κροσσωτές συζεύξεις κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του κρέατος, θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των καρβονυλικών ενώσεων των πρωτεϊνών και της μειωμένης τρυφερότητας του κρέατος.

Σε ό,τι αφορά τις επιπτώσεις της οξειδωσης των πρωτεϊνών στη γεύση του κρέατος και των προϊόντων του, μια πρόσφατη μελέτη (Estévez et al. 2011) κατέδειξε την πιθανή εμπλοκή της α-αμινοαδипικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεϋδης, καρβονυλικών ενώσεων που παράγονται κατά την οξειδωση των πρωτεϊνών, στον σχηματισμό αλδεϋδών κατά Strecker από τα αμινοξέα λευκίνη και ισολευκίνη. Η αποδόμηση των αμινοξέων κατά Strecker, είναι μια από τις κύριες αντιδράσεις που οδηγεί σε αρωματικές ενώσεις της αντίδρασης Maillard και στηρίζεται στην οξειδωτική απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση των ελευθέρων

αμινοξέων παρουσία των α-δικαρβονυλικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την αντίδραση Maillard. Αρκετές καρβονυλικές ενώσεις που προέρχονται από οξείδωση λιπιδίων, όπως οι αλκαδιενάλες και τα κετοδιένια, έχουν βρεθεί ότι είναι ικανές να προάγουν την οξειδωτική αποδόμηση των αμινοξέων και να σχηματίζουν τις αντίστοιχες αλδεύδες κατά Strecker, διαμέσου αντιδράσεων τύπου Strecker (Zamora & Hidalgo 2005). Σύμφωνα με τους Estévez et al. (2011), οι καρβονυλικές ομάδες της α-αμινοαδιπικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεύδης αντιδρούν με τις αμινομάδες των ελεύθερων αμινοξέων, συγκεκριμένα της λευκίνης και ισολευκίνης, προς σχηματισμό βάσεων Schiff και, στη συνέχεια, προκαλούν τον σχηματισμό των αντίστοιχων αλδευδών Strecker που μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση του κρέατος. Μολονότι η εμπλοκή των παραπάνω ημιαλδευδών στην αποδόμηση των ελεύθερων αμινοξέων Strecker δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, η ταυτόχρονη εμφάνιση μεγάλης πρωτεόλυσης, η παρουσία οξειδωτικών αντιδράσεων των πρωτεϊνών και ο σχηματισμός αλδευδών κατά Strecker κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των κρεατοσκευασμάτων, υποδεικνύουν ότι η α-αμινοαδιπική και η γ-γλουταμική ημιαλδεύδη μπορεί να εμπλέκονται στον σχηματισμό των αλδευδών Strecker αντιδρώντας με τα γειτονικά ελεύθερα αμινοξέα (Toldra 1998).

## 8. Μέθοδοι εκτίμησης της οξείδωσης των πρωτεϊνών

Η οξείδωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που συνοδεύεται από ποικίλες μετατροπές του μορίου τους, απώλειες κάποιων ενδογενών ενώσεων και παραγωγή νέων. Επομένως, για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών απαιτούνται αναλυτικές μέθοδοι που να προσφέρουν ειδική και ευαίσθητη μέτρηση μιας ή περισσότερων ενώσεων από αυτές που μειώνονται ή αυξάνονται ή/και δημιουργούνται κατά την οξείδωση. Η επιλογή των ουσιών αυτών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να διασφαλίζεται η συσχέτιση της συγκέντρωσής τους με την οξείδωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η παρουσία τους στα τρόφιμα θα πρέπει να είναι εύκολα ανιχνεύσιμη και η σταθερότητά τους κατά την αναλυτική διαδικασία ικανοποιητική. Εξαιτίας όλων αυτών των προϋποθέσεων, οι διαθέσιμες μέθοδοι για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε ό,τι αφορά τις ουσίες-δείκτες που χρησιμοποιούνται, καθώς και τις αναλυτικές διαδικασίες που εφαρμόζονται. Έτσι, καθεμιά από τις διαθέσιμες μεθόδους μετρά κάτι διαφορετικό και αυτός, ουσιαστικά, είναι ο λόγος για τον οποίο πρέπει να εφαρμόζονται περισσότερες της μίας από αυτές τις μεθόδους, ώστε να επιτυγχάνεται ασφαλέστερη εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης στο εξεταζόμενο δείγμα. Σήμερα, οι μέθοδοι



που εφαρμόζονται ευρύτερα για την εκτίμηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών στα τρόφιμα είναι οι παρακάτω:

- Μέθοδος προσδιορισμού των καρβονυλικών ομάδων
- Μέθοδος προσδιορισμού της α-αμινοαδипικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεύδης και
- Μέθοδος προσδιορισμού των σουλφιδρυλικών ομάδων

### **8.1 Μέθοδος προσδιορισμού των καρβονυλικών ομάδων**

Με βάση το γεγονός ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών συνοδεύεται από παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων, η συγκέντρωση των καρβονυλικών ομάδων σε ένα δείγμα επιλέχθηκε και χρησιμοποιείται ως δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών (Martinaud et al. 1997, Xiong & Decker 1995).

Η μέθοδος που, συνήθως, εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των καρβονυλικών ενώσεων σε δείγματα κρέατος βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων αυτών των ενώσεων με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη προς σχηματισμό των αντίστοιχων 2,4-δινιτροφαινυλδραζονών, οι οποίες παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 370 nm (Levine et al. 1990). Η συγκέντρωση των καρβονυλικών ενώσεων υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση στα 370 nm, χρησιμοποιώντας ως μοριακό συντελεστή απορροφητικότητας των 2,4-δινιτροφαινυλδραζονών τον συντελεστή  $21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε nmol 2,4-δινιτροφαινυλδραζονών/mg πρωτεΐνης, ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα προσδιορίζεται μετά από κατάλληλη εκχύλιση τους και φωτομέτρηση στα 280 nm, χρησιμοποιώντας βόεια οροαλβουμίνη ως πρότυπη ουσία.

Η μέθοδος αυτή αρχικά αναπτύχθηκε με σκοπό την εκτίμηση της οξειδωτικής καταπόνησης σε βιολογικά δείγματα, αλλά αργότερα τροποποιήθηκε ώστε να είναι κατάλληλη για το κρέας και τα προϊόντα του. Οι τροποποιήσεις αποσκοπούσαν κυρίως στην απομάκρυνση από το δείγμα χρωμοφόρων ουσιών όπως της αιμοσφαιρίνης, της μυοσφαιρίνης και των ρητινοειδών, καθώς και στη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με μεγάλη ιοντική ισχύ ώστε να διευκολύνεται η εναιώρηση των πρωτεϊνών του δείγματος (Estévez et al. 2009, Levine et al. 1990). Αν και η μέθοδος αυτή, εξαιτίας κυρίως της απλότητας των χειρισμών, χρησιμοποιείται ευρύτατα στην πράξη, πολλοί ερευνητές παραπονούνται συχνά για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Έχει, μάλιστα, διατυπωθεί η άποψη, ότι η μέθοδος αυτή είναι ακατάλληλη για την αξιόπιστη μέτρηση των καρβονυλικών ομάδων στους ζωικούς ιστούς, εξαιτίας της παρουσίας έντονων παρενοχλήσεων (Cao &

Cutler 1995). Επιπλέον, η μέθοδος έχει υποστεί έντονη κριτική και για την περιορισμένη αξία των πληροφοριών που παρέχει. Και αυτό, γιατί πολλές οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών δεν οδηγούν πάντα σε παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων. Ακόμη, είναι δυνατόν καρβονυλικές ενώσεις που εμφανίζονται στο δείγμα να είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης των λιπιδίων και όχι των πρωτεϊνών (Requena et al. 2003). Επομένως, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να υποεκτιμηθεί η ολική οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών ή και να υπερεκτιμηθεί η ολική συγκέντρωση των καρβονυλικών ενώσεων εξαιτίας παρενοχλήσεων και/ή καρβονυλικών ενώσεων που δεν προέρχονται από πρωτεΐνες αλλά από λιπίδια (Cao & Cutler 1995, Estévez et al. 2008b, Armenteros et al. 2009,). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή στερείται εξειδίκευσης, καθώς δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ακριβή φύση των καρβονυλικών ενώσεων. Επομένως, δεν είναι δυνατόν με τη μέθοδο αυτή να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με τους μηχανισμούς οξείδωσης των πρωτεϊνών (Xiong & Decker 1995). Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή, εξαιτίας κυρίως της απλότητας των χειρισμών και του μικρού κόστους, αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμη για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών στο κρέας ή τα προϊόντα του, υπό τον όρο ότι τα αποτελέσματα που εξάγονται θα επιβεβαιωθούν και από άλλες συμπληρωματικές αναλυτικές τεχνικές όπως είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σουλφιδρυλικών ομάδων, της θρυπτοφάνης, κ.α.

## **8.2 Μέθοδος προσδιορισμού της α-αμινοαδιπικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεΐδης**

Έχει διαπιστωθεί ότι το σύνολο της α-αμινοαδιπικής και γ-γλουταμικής ημιαλδεΐδης αποτελεί το 23-60% του συνόλου των καρβονυλικών ενώσεων σε οξειδωμένο πλάσμα και πρωτεΐνες ήπατος (Requena et al. 2001, Akagawa et al. 2006), ενώ μπορεί να ανέρχεται και μέχρι το 70% των ολικών καρβονυλικών ενώσεων σε μετρίως οξειδωμένα προϊόντα κρέατος (Utrera et al. 2012). Επομένως, οι δύο αυτές ημιαλδεΐδες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών (Daneshvar et al. 1997).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ημιαλδεΐδών αυτών σε βιολογικά δείγματα, αναπτύχθηκαν διάφορες υγροχρωματογραφικές ή αεριοχρωματογραφικές μέθοδοι, στις οποίες η ταυτοποίηση των ουσιών γίνεται με φασματογράφο μαζών (HPLC-MS ή GC-MS, αντίστοιχα). Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μεθόδων, είναι ένα πρώτο αναλυτικό στάδιο κατά το οποίο η καρβονυλική ομάδα των ημιαλδεΐδών αυτών τροποποιείται με αναγωγή (Requena et al. 2001) ή με εισαγωγή αμινομάδας (Climent et al. 1989). Αν και οι τροποποιήσεις αυτές βελτιώνουν την ευαισθησία των ενώσεων αυτών στην υδρόλυση από

οξέα, οι μέθοδοι αυτές εξακολουθούν να υφίστανται κριτική, γιατί οι ημιαλδεύδες εξακολουθούν να αποσυντίθενται μερικώς από το υδροχλωρικό οξύ (Akagawa et al. 2006). Έτσι, πρόσφατα προτάθηκε μια εναλλακτική διαδικασία η οποία προσφέρει σημαντική σταθερότητα έναντι της όξινης υδρόλυσης και συνίσταται σε αναγωγική εισαγωγή μιας αμινομάδας παρουσία κυανοβοριοϋδριδίου του νατρίου και παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος (Akagawa et al. 2006). Μετά τη διαδικασία αυτή, ο ποσοτικός προσδιορισμός και των δύο αυτών ημιαλδεύδων διενεργείται χρησιμοποιώντας HPLC–ESI–MS (Estévez et al. 2009). Η μέθοδος αυτή παρά το γεγονός ότι απαιτεί χρήση πολύπλοκων και δαπανηρών αναλυτικών τεχνικών/οργάνων, είναι χρήσιμη, γιατί επιτρέπει τη διευκρίνιση της ακριβούς φύσης των καρβονυλικών ενώσεων και, επομένως, καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παραγωγής τους.

### 8.3 Μέθοδος προσδιορισμού των σουλφυδρυλικών ομάδων

Τα αποτελέσματα πολλών μελετών υποδεικνύουν ότι οι σουλφυδρυλικές ομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της οξειδωσης των πρωτεϊνών. Πρόσφατα, απώλειες σουλφυδρυλικών ομάδων γύρω στο 37% έχουν παρατηρηθεί σε χοιρινό κιμά που συντηρήθηκε για 7 ημέρες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα οξυγόνου (Lund et al. 2008), ενώ μεγαλύτερες απώλειες σουλφυδρυλικών ομάδων που φθάνουν το 92%, ανάλογα με τις οξειδωτικές συνθήκες, έχουν βρεθεί σε μυικά ινίδια (Lund et al. 2008). Παρόμοιες απώλειες σουλφυδρυλικών ομάδων ανάλογα με τον τύπο του μυικού ιστού, τις οξειδωτικές συνθήκες και το είδος του ζώου έχουν αναφερθεί και σε προγενέστερες μελέτες (Martinaud et al. 1997, Liu et al. 2000).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών σουλφυδρυλίων στο κρέας χρησιμοποιείται, συνήθως, η μέθοδος Ellman (1959). Σύμφωνα με αυτήν, ένα υδατικό εκχύλισμα κρέατος επωάζεται επί 15 min με ποσότητα διαλύματος 5,5'-διθειο-δισ(2-νιτροβενζοϊκού οξέος), και το διάλυμα που προκύπτει φωτομετρείται στα 412 nm. Οι συγκεντρώσεις των ολικών σουλφυδρυλίων που εκφράζονται σε  $\mu\text{M}$  σουλφυδρυλίων/g κρέατος, υπολογίζονται από την τιμή της απορρόφησης χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας την τιμή  $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Eymard et al. 2009).

## 9. Παράγοντες που επιταχύνουν την ταχύτητα της οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος

Πολλοί είναι οι παράγοντες που θα μπορούσαν να επιταχύνουν την ταχύτητα με τη οποία

χωρεί η οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος. Μεταξύ αυτών, σημαντικότεροι θα μπορούσαν να θεωρηθούν η φρεσκότητα του κρέατος, το μέγεθος των τεμαχιδίων του κρέατος, η περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, η παρουσία μεταλλικών ιόντων, η τιμή του pH, η περιεκτικότητα σε αλάτι, η συγκέντρωση του οξυγόνου, η ενεργότητα του νερού, η θερμοκρασία μαγειρέματος και συντήρησης, καθώς και η εφαρμογή μεθόδων ακτινοβόλησης και υψηλής υδροστατικής πίεσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση κάθε παράγοντα στην ταχύτητα της οξείδωσης εξαρτάται, επίσης, σε μεγάλο βαθμό και από τη φύση των συνθηκών κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η οξείδωση.

### 9.1 Φρεσκότητα του κρέατος

Η φρεσκότητα του κρέατος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρεατοσκευασμάτων, επηρεάζει αποφασιστικά την ταχύτητα της οξείδωσης. Και αυτό, γιατί οι ζωικοί ιστοί περιέχουν *in vivo* μια μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η σουπεροξειδική δεσμουτάση, καθώς και διάφορες ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η καρνοσίνη, η γλουταθειόνη και η α-τοκοφερόλη, οι οποίες συνεχίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση και μετά τη σφαγή του ζώου, περιορίζοντας την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στο φρέσκο κρέας. Επισημαίνεται, ότι στο φρέσκο κρέας η ενζυμική οξείδωση είναι πολύ περιορισμένη ιδιαίτερα, μάλιστα, μετά την αδρανοποίηση των ενζύμων από θερμική επεξεργασία. Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί, ότι η αποτελεσματικότητα των παραπάνω ουσιών ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου και τη μείωση της φρεσκότητας του κρέατος.

### 9.2 Μέγεθος των τεμαχιδίων του κρέατος

Μηχανικές διαδικασίες όπως ο τεμαχισμός, η ανάμειξη και η μάλαξη, που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία του κρέατος, μπορεί να αποβούν επιζήμιες για τη σταθερότητα των λιπιδίων και το χρώμα του κρέατος. Και αυτό, γιατί η θραύση των ιστών και η μείωση του μεγέθους των τεμαχιδίων αυξάνει την επιφάνεια της λιπαρής ύλης που είναι εκτεθειμένη στην επίδραση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Σε άθικτα τεμάχια κρέατος, η διάχυση του οξυγόνου είναι σχετικά αργή, ενώ σε λεπτοτεμαχισμένο κρέας είναι σχετικά γρήγορη. Έτσι, όσο ο λόγος της εκτεθειμένης επιφάνειας προς την συνολική ποσότητα της λιπαρής ύλης αυξάνεται, τόσο αυξάνεται και η ταχύτητα της οξείδωσης. Ακόμη και η διαδικασία μάλαξης που χρησιμοποιείται σε μεγάλα τεμάχια μυϊκού ιστού, μπορεί να

προκαλέσει επιτάχυνση της οξειδωσης των λιπιδίων, η οποία επιδεινώνεται με παράταση του χρόνου μάλαξης (Cheng & Ockerman 2003). Επίσης, και η διαδικασία μετατροπής του κρέατος σε κιμά επιδεινώνει την οξειδωτική καταπόνηση του κρέατος, αφού προκαλεί κατακερματισμό των κυττάρων και αποδέσμευση διαφόρων ενδογενών ουσιών που δρουν οξειδωτικά (Gray et al. 1996).

### 9.3 Περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα

Το οξυγόνο προσβάλλει ευκολότερα τα ακόρεστα σε σχέση με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα, μάλιστα, όσο αυξάνεται ο αριθμός των διπλών δεσμών στο μόριο τους. Η ταχύτητα της προσβολής επηρεάζεται, επίσης, και από την θέση και τη γεωμετρία των διπλών δεσμών. Και αυτό, γιατί τα λιπαρά οξέα με *cis* διπλό δεσμό οξειδώνονται ευκολότερα από ό,τι τα *trans* ισομερή τους, ενώ οι συζυγείς διπλοί δεσμοί οξειδώνονται ταχύτερα από τους μη συζυγείς. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι οι σχετικές ταχύτητες οξειδωσης του αραχιδονικού,  $\alpha$ -λινολενικού, λινελαϊκού και ελαϊκού οξέος είναι 40, 20, 10 και 1, αντίστοιχα.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα οξειδώνονται με ταχύτερους ρυθμούς όταν απαντούν σε ελεύθερη μορφή παρά σε μορφή τριγλυκεριδίων. Έτσι, προσθήκη μικρών ποσοτήτων (0,1%) ελεύθερων λιπαρών οξέων επιταχύνει την οξειδωση του κρέατος, ενώ περιορίζει και την αποτελεσματικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών όπως οι τοκοφερόλες. Το γεγονός αυτό οφείλεται, πιθανώς, σε επιτάχυνση της αποικοδόμησης των υδροϋπεροξειδίων σε βαθμό που οι φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες δεν μπορούν πλέον να δράσουν αποτελεσματικά. Η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί, επίσης, να προκαλέσει αύξηση της μετακίνησης των μεταλλικών ιόντων από τα μεταλλικά υλικά συσκευασίας ή τον εξοπλισμό, προς το κρέας ή τα προϊόντα του, γεγονός που συνοδεύεται από αύξηση της ταχύτητας οξειδωσης.

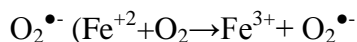
Η οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του κρέατος παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εξαιτίας των προσπαθειών παραγωγής κρέατος και κρεατοσκευασμάτων εμπλουτισμένων σε  $\omega$ -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που θεωρούνται ωφέλιμα για την υγεία (Connor 2000). Και αυτό, γιατί η ιδιαίτερα ακόρεστη φύση των λιπαρών αυτών οξέων προδιαθέτει στην οξειδωση (Moghadasian 2008). Οι Muguerza et al. (2004) ανέφεραν ότι η άμεση προσθήκη ιχθυελαίων σε ξηρά αλλαντικά στο σχετικά υψηλό επίπεδο των 10,7 g/kg οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή μηλονικής διαλδεύδης. Άλλοι ερευνητές ελαχιστοποίησαν την οξειδωση αλεσμένου βόειου κρέατος που είχε εμπλουτιστεί

σε  $\omega$ -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας ένα μείγμα αντιοξειδωτικών ουσιών (Djorđejevic et al. 2004, Lee et al. 2005).

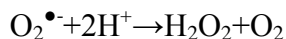
Σε ό,τι, πάλι, αφορά την οξείδωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, επισημαίνεται ότι είναι εξαιρετικά αργή σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες όπως αυτές που επικρατούν στο τηγάνισμα, προχωρεί με αρκετά μεγάλη ταχύτητα (Kochhar 1993).

#### 9.4 Παρουσία μεταλλικών ιόντων

Τα μεταλλικά ιόντα μεταβατικών στοιχείων όπως του Fe, Cu, Mn, Co και Ni, μπορούν να δράσουν καταλυτικά στην οξείδωση των λιπιδίων. Μολονότι η απευθείας αντίδραση του μοριακού οξυγόνου με μόρια στη βασική κατάσταση είναι ενεργειακά αδύνατη λόγω της υψηλής ενέργειας ενεργοποίησης, τα μεταλλικά ιόντα μεταβατικών στοιχείων όπως ο  $\text{Fe}^{2+}$ , μπορούν να αντιδράσουν αυθόρμητα με το μοριακό οξυγόνο προς παραγωγή της ανιοντικής ρίζας του σουπεροξειδίου του οξυγόνου,



Η ανιοντική ρίζα  $\text{O}_2^{\bullet-}$  μπορεί να χάσει ένα ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας οξυγόνο στην απλή διεγερμένη κατάσταση ( $^1\text{O}_2$ ), ή να σχηματίσει υπεροξείδιο του υδρογόνου, με τη δράση του ενζύμου υπεροξειδική δεσμουτάση ή αυθόρμητα αντιδρώντας με ένα πρωτόνιο



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί, στη συνέχεια, να αντιδράσει (αντίδραση Fenton) με ένα άλλο άτομο  $\text{Fe}^{2+}$  προς παραγωγή μιας ρίζας υδροξυλίου

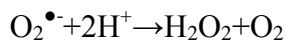


Η ρίζα υδροξυλίου είναι μία από τις δραστικότερες ρίζες οξυγόνου με δυνατότητα όχι μόνο να προκαλεί την έναρξη της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, αλλά και να επιφέρει βιολογικές βλάβες λόγω της δυνατότητας αντίδρασης με το DNA.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι ο δισθενής σίδηρος είναι αυτός που συμμετέχει καθοριστικά στην έναρξη και διάδοση των αντιδράσεων της οξείδωσης, η ύπαρξη του τρισθενούς σιδήρου στα κύτταρα καθιστά τη δυνατότητα αναγωγής του σε δισθενή σίδηρο καθοριστικό παράγοντα για την πορεία της οξείδωσης. Τη δυνατότητα αυτή παρέχει ένα πλήθος συστατικών του κυττάρου που μπορούν να δράσουν ως αναγωγικά μέσα. Μερικά από τα σημαντικότερα αναγωγικά συστήματα, είναι η ανιοντική ρίζα του σουπεροξειδίου του οξυγόνου, η ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) και οι ενώσεις του ασκορβικού οξέος (Decker & Hultin 1990a).

Επισημαίνεται ότι η ομάδα των ενζύμων της υπεροξειδικής δεσμουτάσης που απαντάται

στο σύνολο σχεδόν των αερόβιων οργανισμών, χαρακτηρίζεται, επίσης, από την παρουσία μετάλλων που είναι απαραίτητα για εκδήλωση καταλυτικής δράσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αντίδραση,



η οποία σε pH 7,4 χωρεί με σχετικά μικρή ταχύτητα, επιταχύνεται κατά 10.000 φορές παρουσία της ομάδας αυτής των ενζύμων (Gutteridge & Halliwell 1996). Η συσσώρευση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  ως προϊόντος της αντίδρασης αυτής, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου ή να προκαλέσει αδρανοποίηση του ίδιου του ενζύμου. Έτσι, η ομάδα ενζύμων της υπεροξειδικής δεσμουτάσης μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση παρουσία της καταλάσης, ενός ενζύμου το οποίο καταλύει την διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Μία άλλη ομάδα ενζύμων της οποίας ο ρόλος στην οξείδωση των λιπιδίων έχει τύχει ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος είναι οι λιποξυγενάσες. Η λιποξυγενάση είναι μία διοξυγενάση η οποία ενσωματώνει δύο άτομα οξυγόνου σε συγκεκριμένη θέση στο μόριο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα μονοϋδροϋπεροξειδία που παράγονται από τα ένζυμα αυτά, αποικοδομούνται παρουσία μετάλλων όπως Fe και Cu, προς σχηματισμό πτητικών καρβονυλικών ενώσεων οι οποίες συνεισφέρουν στην εμφάνιση ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών οσμής και γεύσης. Μετά από θερμική επεξεργασία, οι λιποξυγενάσες όπως και άλλα ένζυμα, απενεργοποιούνται, δρώντας ως μη ενζυμικοί μεταλλο-πρωτεϊνικοί καταλύτες, οι οποίοι ενεργοποιούνται από αναγωγικούς παράγοντες (Hultin 1994).

Επίσης, και η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών της αίμης και των ακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους λόγους τάγγισης των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Η μυοσφαιρίνη που συνιστά την κύρια πρωτεΐνη αίμης στο κρέας, περιέχει 153 αμινοξέα και αίμη, η οποία αποτελείται από ένα άτομο σιδήρου δεσμευμένο από τέσσερα άτομα άζωτου στο κέντρο του πρωτοπορφυρινικού δακτυλίου. Το άτομο του σιδήρου μπορεί να σχηματίσει δύο επιπρόσθετους δεσμούς, έναν από κάθε πλευρά του επιπέδου της αίμης και απαντάται σε δισθενή (σιδηρο-), τρισθενή (σιδηρι-) ή τετρασθενή κατάσταση οξείδωσης. Η σιδηρο-μυοσφαιρίνη ( $\text{Fe}^{2+}$ ) είναι η «ενεργός» φυσιολογική οξειδοαναγωγική μορφή της πρωτεΐνης *in vivo*. Με τη μορφή αυτή, η μυοσφαιρίνη απαντά, επίσης, στην επιφάνεια της τομής των κρεάτων, όπου η έκθεση στην ατμόσφαιρα επιτρέπει τη δέσμευση του οξυγόνου και τη μετατροπή της στη μορφή της οξυμυοσφαιρίνης η οποία παρέχει μια επιθυμητή βυσσινοκόκκινη χρώση στο κρέας. Η οξείδωση της σιδηρο-μυοσφαιρίνης ( $\text{Fe}^{2+}$ ) σε σιδηρι-μυοσφαιρίνη ( $\text{Fe}^{3+}$ ) είναι θερμοδυναμικά ευνοούμενη και προκαλεί αποχρωματισμό των νωπών κρεάτων. Η καστανή χρώση που αποκτά το κρέας και

τα κρεατοσκευάσματα, είναι συνέπεια της συσσώρευσης της σιδηρι-μυοσφαιρίνης (μεταμυοσφαιρίνη) στην επιφάνειά τους. Η συσσώρευση αυτή εξαρτάται από την ταχύτητα οξείδωσης της οξυμυοσφαιρίνης προς μεταμυοσφαιρίνη και την ενζυμική ή μη αναγωγή της τελευταίας (Renerre & Labas 1987).

Στο σημείο αυτό αξίζει, ίσως, ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός, ότι η διαδικασία της οξείδωσης της οξυμυοσφαιρίνης προς μεταμυοσφαιρίνη μπορεί να ενισχύσει την οξείδωση των λιπιδίων διαμέσου του σχηματισμού του ανιόντος του σουπεροξειδίου και τη μετατροπή του σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Chan et al. 1997, Baron & Ersen 2002). Η αντίδραση του  $H_2O_2$  με τη μεταμυοσφαιρίνη και τη μεθαιμοσφαιρίνη έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενεργών αιμοπρωτεϊνών, στις οποίες ο σίδηρος μεταπίπτει σε μία υψηλότερη οξειδωτική κατάσταση, με σχηματισμό μίας κατιονικής πορφυρινικής ρίζας (Rhee et al. 1987). Οι ενεργές αυτές αιμοπρωτεΐνες αν και βραχύβιες, είναι πολύ δραστικές, αποτελούν ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες, αλλά δεν μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τη χρώση του κρέατος (Baron & Ersen 2002).

### 9.5 Τιμή pH

Αν και το τελικό pH του κρέατος είναι περίπου 5,6, τα διάφορα είδη των μυικών ιστών παρουσιάζουν διάφορες τιμές pH που κυμαίνονται από 5,54 έως 6,2 (Tarrant & Sherington 1980) ή 5,69 έως 5,93 (McKenna et al. 2005). Σε σχετική πρόσφατη μελέτη, ανακοινώθηκε ότι οι τιμές pH στήθους και μηρών γαλόπουλων είναι χαμηλότερες από εκείνες σε πάπιες και κοτόπουλα (Gong et al. 2008). Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η καταπόνηση του ζώου πριν από τη σφαγή (Juncher et al. 2001) ή η επεξεργασία του κρέατος (Stetzer et al. 2007) μπορούσαν να προκαλέσουν μεταβολές του pH οι οποίες είχαν και επιπτώσεις στην οξείδωση της οξυμυοσφαιρίνης και τη σταθερότητα της χρώσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα με την οποία χωρεί η αυτοοξείδωση της οξυμυοσφαιρίνης μπορεί να επιταχυνθεί σε χαμηλές τιμές pH, αφού βρέθηκε ότι η πτώση του pH κατά μία μονάδα έχει ως συνέπεια την επιτάχυνση της αντίδρασης κατά 10 φορές (Ledward et al. 1986). Ενδεικτικά αναφέρονται τα ευρήματα των Srinivasan et al. (1996) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι σουρίμι από βόειο κρέας με pH 5,5 παρουσίαζε εντονότερη οξείδωση πρωτεϊνών και μεγαλύτερη παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων σε σχέση με σουρίμι με pH 7,0.

### 9.6 Περιεκτικότητα σε αλάτι

Το αλάτι προστίθεται κατά την επεξεργασία των κρεατοσκευασμάτων για την



παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και τη βελτίωση της γεύσης. Η χρήση, όμως, αυτή προάγει την οξείδωση των λιπιδίων ακόμη και σε συνθήκες κατάψυξης (Rhee & Ziprin 2001, Cheng et al. 2007). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ενώ αλατισμένος κιμάς βρέθηκε να εμφανίζει οξείδωση λιπιδίων μετά από 2- 4 μήνες κατάψυξης, κιμάς χωρίς αλάτι απαιτούσε τουλάχιστον 12 μήνες κατάψυξης για εμφάνιση οξείδωσης (Decker et al. 2005). Έτσι, μερικοί ερευνητές (Chen et al. 1984) ανέφεραν ότι η προσθήκη αλατιού ευνοούσε την ανάπτυξη ταγγίσματος σε ωμό και μαγειρεμένο βόειο κρέας, τόσο κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος όσο και κατά την επακόλουθη συντήρησή του (Chen et al. 1984), ενώ άλλοι ερευνητές (Trout 1990, Sørheim et al. 2009) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη αλατιού σε αλεσμένο βόειο κρέας προκαλούσε αύξηση της οξείδωσης της μυοσφαιρίνης. Ο μηχανισμός της προοξειδωτικής δράσης του αλατιού στα προϊόντα κρέατος δεν έχει μέχρι τώρα πλήρως διευκρινιστεί. Έχει, όμως, διατυπωθεί η άποψη ότι η προσθήκη του αλατιού μπορεί να οδηγεί σε απελευθέρωση του σιδήρου από τις πρωτεΐνες του κρέατος και ότι ο συνδυασμός του με τα ιόντα χλωρίου ενισχύει την καταλυτική του δραστηριότητα (Kanner et al. 1991, Osinchak et al. 1992).

### 9.7 Συγκέντρωση του οξυγόνου

Το οξυγόνο είναι ένας κρίσιμος παράγοντας των αντιδράσεων οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών και πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη συσκευασία των κρεάτων. Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι υψηλή, η ταχύτητα οξείδωσης των λιπιδίων είναι ανεξάρτητη από τη μερική πίεσή του, ενώ όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή όπως στις συσκευασίες σε συνθήκες υποπίεσης, η ταχύτητα οξείδωσης είναι περίπου ανάλογη της μερικής πίεσης του οξυγόνου. Έτσι, συσκευασία σε συνθήκες υποπίεσης ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα ( $N_2/CO_2$ ) μπορεί να αυξήσει την οξειδωτική σταθερότητα του κρέατος και των προϊόντων του (McMillin 2008, Baron et al. 2009).

Μερικοί ερευνητές ανέφεραν ότι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου επιτάχυναν την οξείδωση των πρωτεϊνών σε μοσχαρίσιες μπριζόλες (Zakrys et al. 2008) και σε αλεσμένο βόειο κρέας (Lund et al. 2007a). Άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι χοιρινό κρέας σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρουσίαζε μεγαλύτερες απώλειες σουλφιδρυλικών ενώσεων αλλά ίδιες συγκεντρώσεις καρβονυλικών ενώσεων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου (Lund et al. 2007b). Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως να σημειωθεί, ότι η πλήρης απομάκρυνση του οξυγόνου από το συσκευασμένο κρέας ελαχιστοποιεί την οξείδωση των λιπιδίων, αλλά δεν οδηγεί σε πλήρη μετατροπή της

μυοσφαιρίνης στην οξυγονωμένη της μορφή, την οξυμυοσφαιρίνη, οπότε προκύπτει ένας ερυθροϊώδης χρωματισμός ο οποίος δεν είναι επιθυμητός από τους καταναλωτές. Ατελής αφαίρεση του οξυγόνου από τη συσκευασία, μπορεί, επίσης, να είναι προβληματική, γιατί ευνοείται ο σχηματισμός της μεταμυοσφαιρίνης που δίνει στο κρέας καφέ χρωματισμό (Faustman & Cassens 1990). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι για έναν σταθερά κόκκινο χρωματισμό του κρέατος απαιτείται η παρουσία ποσότητας οξυγόνου ικανής να οξειδώσει όλη τη μυοσφαιρίνη σε οξυμυοσφαιρίνη. Αυτό έχει οδηγήσει σε μεθόδους συσκευασίας όπως η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, που παρέχουν, σε μια προσπάθεια να ελαχιστοποιήσουν τον σχηματισμό της μεταμυοσφαιρίνης, ποσότητα οξυγόνου ικανής να οξειδώσει όλη τη μυοσφαιρίνη σε οξυμυοσφαιρίνη (Faustman & Cassens 1990). Αξίζει, όμως, να επισημανθεί ότι αντιδράσεις που καταναλώνουν οξυγόνο όπως αυτές από τη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και υπομιτοχονδρίων, της αερόβιας ανάπτυξης των βακτηριδίων και της οξείδωσης των λιπιδίων, μπορεί να μειώσουν τη μερική πίεση του οξυγόνου στο κρέας και να οδηγήσουν σε οξειδοαναγωγική αστάθεια της σιδηρομυοσφαιρίνης.

### 9.8 Ενεργότητα του νερού

Η ενεργότητα του νερού σε ένα τρόφιμο ορίζεται ως ο λόγος της μερικής πίεσης του νερού προς την τάση των ατμών του στην ίδια θερμοκρασία. Διαπιστώθηκε ότι σε χαμηλές τιμές ενεργότητας (0,1-0,2), η ταχύτητα οξείδωσης αυξάνεται σημαντικά για να μειωθεί, στη συνέχεια, προσεγγίζοντας την ελάχιστη τιμή με την αύξηση της ενεργότητας του νερού σε τιμές 0,2-0,4. Σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας (>0,4), η ταχύτητα της οξείδωσης αυξάνεται εκ νέου προσεγγίζοντας την μέγιστη τιμή σε ενεργότητες νερού στην περιοχή τιμών 0,6-0,8 (Labuza et al. 1970).

Για την εξήγηση της επίδρασης της ενεργότητας του νερού στην οξείδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί (Nelson & Labuza 1992). Σύμφωνα με έναν από αυτούς, τα μεταλλικά ιόντα κυρίως του Fe και του Cu που δρουν σαν καταλύτες της οξείδωσης, καθίστανται πιο ενεργά σε χαμηλές τιμές ενεργότητας. Όταν τα επίπεδα του νερού αυξάνονται, η ταχύτητα της οξείδωσης μειώνεται, εξαιτίας, πιθανώς, του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ του νερού και των υδροϋπεροξειδίων, οπότε επιβραδύνεται η αποικοδόμηση των τελευταίων στις ελεύθερες ρίζες που ενισχύουν την οξείδωση.

Άλλος πιθανός μηχανισμός, είναι η μείωση της προ-οξειδωτικής δραστηριότητας των

μεταλλικών ιόντων, εξαιτίας ενυδάτωσης και αλλαγής του βαθμού συναρμογής τους. Τα ενυδατωμένα μεταλλικά άλατα που σχηματίζονται είναι λιγότερο λιποδιαλυτά και συνεπώς λιγότερο ενεργά. Σε υψηλές τιμές ενεργότητας, ο ρυθμός της οξειδωσης επιταχύνεται εξαιτίας της αύξησης της διάχυσης και της κινητικότητας των μεταλλικών ιόντων στην υδατική φάση, καθώς και τον προσανατολισμό τους στη διεπιφάνεια νερού και λιπιδίων, όπου τα πολικά υδροϋπεροξειδία είναι συναθροισμένα.

Το νερό διαδραματίζει, επίσης, έναν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των προϊόντων οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών με άλλα συστατικά των τροφίμων, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και ενώσεις της αίμης. Έτσι, σε τρόφιμα με ενεργότητα 0,3-0,7, καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, καθώς και υδατοδιαλυτά σάκχαρα των τροφίμων αντιδρούν με αμινοξέα και πρωτεΐνες διαμέσου μίας σειράς πολύπλοκων αντιδράσεων που οδηγεί σε προϊόντα της αντίδρασης Maillard, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Bell 1996).

### 9.9 Θερμοκρασία μαγειρέματος και συντήρησης

Η ταχύτητα της οξειδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών αυξάνεται με τη θερμοκρασία. Επειδή όμως με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η διαλυτότητα του οξυγόνου στα λιπίδια, η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της οξειδωσης είναι μικρότερη της αναμενόμενης. Ωστόσο, στην περίπτωση της οξειδωσης πολύπλοκων λιπιδικών συστημάτων όπως στα πολυφασικά συστήματα των τροφίμων, η επίδραση της θερμοκρασίας δεν είναι ένα απλό φαινόμενο. Και αυτό γιατί η ταχύτητα των επιμέρους αντιδράσεων δεν μεταβάλλεται στον ίδιο βαθμό με τη θερμοκρασία (Kochhar 1993).

Η οξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών είναι ταχύτερη στο μαγειρεμένο από ό,τι στο νωπό κρέας. Και αυτό γιατί η θέρμανση μετουσιώνει τις πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο (Schricker et al. 1982) και διαρρηγνύει τις μεμβράνες. Ακόμη, απενεργοποιεί τα ένζυμικά αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα των μυικών ιστών (Igene et al. 1979). Η μέθοδος μαγειρέματος που χρησιμοποιείται για τα προμαγειρεμένα κρεατοσκευάσματα μπορεί, επίσης, να επηρεάσει την έκταση της οξειδωσης. Έτσι, ενώ θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι το ψήσιμο του κρέατος στη σχάρα επιταχύνει την οξειδωση εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών στις οποίες υποβάλλονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, αυτό δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα, αφού οι θερμικές διεργασίες στις οποίες εφαρμόζονται ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, παρακωλύουν, πολλές φορές, την οξειδωση μέσω του σχηματισμού ενώσεων Maillard (Van Ruth et al. 1998).

Μια μελέτη των επιπτώσεων του μαγειρέματος στην οξείδωση των πρωτεϊνών, έδειξε ότι το μαγειρεμένο κρέας παρουσίαζε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση καρβονυλικών ενώσεων από ό,τι το ωμό κρέας (Santé-Lhoutellier et al. 2008a). Μερικοί ερευνητές ανέφεραν ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών εξαιτίας του μαγειρέματος, εντοπιζόταν στις περιφέρειες των κυττάρων και, απέδωσαν αυτήν την οξείδωση, κυρίως στις πρωτεΐνες των μεμβρανών (Astruc et al. 2007). Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η θέρμανση ευνοούσε τη διαδικασία ζελατινοποίησης που προκαλείται από την οξείδωση των πρωτεϊνών (Parkington et al. 2000), ενώ άλλοι διαπίστωσαν ότι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης ευνοούσαν την οξειδοαναγωγική σταθερότητα της σιδηρομυοσφαιρίνης σε βόειο (Pietrasik et al. 2006) και χοιρινό κρέας (Hansen et al. 2004).

Σε ό,τι αφορά την επίδραση του μαγειρέματος και της συντήρησης στην οξείδωση των λιπιδίων του κρέατος, οι Keller και Kinsella (1973) παρατήρησαν αυξημένες τιμές μηλονικής διαλδεύδης κατά το μαγείρεμα στους 70 °C και περαιτέρω αύξηση κατά τη συντήρηση των μαγειρεμένων δειγμάτων επί 36 ημέρες στην κατάψυξη. Ακόμη, οι Kingston et al. (1998) διαπίστωσαν ότι η ταχύτητα οξείδωσης κατά τη συντήρηση ψυμένου χοιρινού κρέατος σε συνθήκες ψύξης ήταν μεγαλύτερη για μεγαλύτερους χρόνους μαγειρέματος, μικρότερους ρυθμούς μαγειρέματος και υψηλότερες θερμοκρασίες μαγειρέματος.

### **9.10 Μέθοδοι ακτινοβόλησης και υψηλής υδροστατικής πίεσης**

Οι διαδικασίες ακτινοβόλησης του κρέατος καθώς και έκθεσής του σε υψηλή υδροστατική πίεση χρησιμοποιούνται συχνά για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών. Κατά τη διαδικασία ακτινοβόλησης του κρέατος χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια, η οποία, όμως, επιταχύνει την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών μέσω αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα την αλλοίωση του χρωματισμού των ακτινοβολημένων δειγμάτων κρέατος (Jo et al. 1999, Ahn et al. 2000, Jo & Ahn 2000, Du et al. 2002). Η έκταση των επιπτώσεων εξαρτάται από τη δόση ακτινοβόλησης, την παρουσία οξυγόνου, την περιεκτικότητα σε λίπος και το προφίλ των λιπαρών οξέων (Ahn et al. 1998, Jo et al. 1999, Jo & Ahn 2000). Ενδεικτικά αναφέρονται τα ευρήματα των Rowe et al. (2004a), οι οποίοι βρήκαν ότι μοσχαρίσιες μπριζόλες παρουσίαζαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καρβονυλικών ενώσεων και χαμηλότερη διαλυτότητα πρωτεϊνών μετά την ακτινοβόλησή τους. Ακόμη οι Ahn et al. (1998) διαπίστωσαν ότι χοιρινά μπιφτέκια από επιμήκεις ραχιαίους μύες (*Longissimus dorsi*, LD) παρουσίαζαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις

μηλονικής διαλδεύδης, προπανάλης και πεντανάλης μετά την ακτινοβολήση από ό,τι μπιφτέκια από ψωίτες μύες. Ωστόσο, οι Houben et al. (2000) δεν βρήκαν διαφορά στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης μεταξύ ακτινοβολημένου άπαχου (<1% λίπος) και λιπαρού (> 20% λίπος) κιμά από βόειο κρέας.

Η έκθεση κρεατοσκευασμάτων σε υψηλές πιέσεις έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών και τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων (Rastogi et al. 2007). Ο κύριος τρόπος με τον οποίο η επεξεργασία αυτή ασκεί την επίδρασή της είναι μέσω της καταστροφής των βιομεμβρανών. Αυτή, όμως, η φυσική διάρρηξη οδηγεί επίσης σε απελευθέρωση σιδήρου και αυξημένη οξείδωση των λιπιδίων του κρέατος (Cheah & Ledward 1995, Cheah & Ledward 1997).

#### **10. Μέθοδοι προστασίας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του κρέατος και των προϊόντων του από την οξείδωση**

Η επεξεργασία του κρέατος με μηχανική αφαίρεση των οστών, τεμαχισμό, άλεση και αναδιαμόρφωσή του καθώς και το μαγείρεμα, προκαλούν διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και επιτρέπουν στους καταλύτες της οξείδωσης των λιπιδίων να αντιδράσουν με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα προκαλώντας την έναρξη των αντιδράσεων οξείδωσης. Με σκοπό την προστασία των λιπιδίων και των πρωτεϊνών από την οξείδωση, εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι για τη διασφάλιση της οξειδωτικής σταθερότητας του κρέατος.

Η εντύπωση ότι η οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών διέπεται από τους ίδιους μηχανισμούς, δικαιολογεί το γεγονός ότι οι περισσότερες μέθοδοι ελέγχου της οξείδωσης των πρωτεϊνών στο κρέας και τα προϊόντα του ήταν αρχικά αυτές που είχαν αναφερθεί ως αποτελεσματικές έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων. Γρήγορα όμως διαπιστώθηκε ότι ορισμένες αντιοξειδωτικές στρατηγικές με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων δεν παρουσίαζαν αντίστοιχη αποτελεσματικότητα έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών (Gatellier et al. 2000, Mercier et al. 2004, Haak et al. 2009) ή, ακόμη χειρότερα, εμφάνιζαν και προ-οξειδωτική δράση (Estévez & Cava 2006). Επομένως, η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων απαιτεί την όσο το δυνατόν καλύτερη κατανόηση των ειδικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην οξειδωτική αποδόμηση τόσο των λιπιδίων όσο και των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, οι μέθοδοι ελέγχου της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στο κρέας και τα προϊόντα του μπορεί να διακριθούν σε διατροφικές και τεχνολογικές.

### 10.1 Διατροφικές μέθοδοι

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η οξειδωση των λιπιδίων στο κρέας επικεντρώνεται κυρίως στο ιδιαίτερα ακόρεστο κλάσμα των πολικών φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτός άλλωστε είναι και ο λόγος για τον οποίο κρέατα από τα οποία έχει αφαιρεθεί το λίπος εξακολουθούν να είναι ευάλωτα σε οξειδωση, γιατί η μείωση του λίπους αντανακλά κυρίως τη μείωση σε τριακυλογλυκερίδια, ενώ η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων επηρεάζεται πολύ λιγότερο (Monahan 2000). Από τα παραπάνω, συνάγεται ότι η περιοχή συνάθροισης των αντιοξειδωτικών ουσιών στο κρέας είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα αυτής της χρήσης και μπορεί, πιθανώς, τα δικαιολογήσει τα αντιφατικά αποτελέσματα διαφόρων σχετικών μελετών (Wills et al. 2007). Έτσι, οι Wills et al. (2007) εξετάζοντας την επίδραση του διαλύτη στην κατανομή της δ-τοκοφερόλης όταν προστίθεται εξωγενώς σε βόειο κρέας ανέφεραν ότι η χρήση πολικότερων διαλυτών όπως της αιθανόλης έναντι ενός φυτικού ελαίου, προκάλεσε σημαντική μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων σε μαγειρεμένο κρέας.

Συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική δραστηριότητα της α-τοκοφερόλης που χορηγείται σε βοοειδή με την τροφή ή προστίθεται εξωγενώς σε βόειο κρέας σε ισοδύναμη ποσότητα, οι Mitsumoto et al. (1993) διαπίστωσαν ότι η διατροφική προσέγγιση ήταν ανώτερη σε αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα σε σχέση με την εξωγενή προσθήκη. Οι συγγραφείς απέδωσαν το γεγονός αυτό στην συνάθροιση της α-τοκοφερόλης στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, ένας στόχος που δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την εξωγενή προσθήκη της α-τοκοφερόλης. Επομένως, η οξειδωτική σταθερότητα του κρέατος και των προϊόντων του μπορεί να βελτιωθεί αισθητά με τη χορήγηση στα παραγωγικά ζώα των κατάλληλων ζωοτροφών, δηλαδή με εφαρμογή διατροφικών μεθόδων (Decker et al. 2000). Και αυτό γιατί ο μυϊκός ιστός των μονογαστρικών ζώων αντανακλά, ουσιαστικά, τη σύνθεση των λιπαρών οξέων στις ζωοτροφές, ενώ περιέχει στις μεμβράνες των κυττάρων και όλες τις αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο ή η τοκοφερόλη, που έχουν προστεθεί στις ζωοτροφές. Κατά την εφαρμογή διατροφικών στρατηγικών με στόχο τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας του κρέατος πρέπει πρώτα να ελέγχεται η σχέση των πολυακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στις ζωοτροφές και, στη συνέχεια, να προτείνεται η προσθήκη στις ζωοτροφές των κατάλληλων αντιοξειδωτικών ουσιών στις κατάλληλες δόσεις.

Άλλη διατροφική μέθοδος προς την ίδια κατεύθυνση αποτελεί και η βόσκηση των ζώων, εξαιτίας των σημαντικών συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης και άλλων φυσικών

αντιοξειδωτικών ουσιών στη χλωρές νομές παρά την μεγάλη, σχετικά, περιεκτικότητά τους σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Ventanas et al. 2006). Μολονότι με τη βόσκηση αυξάνεται η σχέση στο κρέας των πολυακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, η τροποποίηση αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την οξειδωση των πρωτεϊνών εξαιτίας, πιθανώς, των μεγάλων συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης και των άλλων φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών στη χλωρές νομές. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, διάφοροι ερευνητές ανέφεραν ότι η ακορεστότητα των λιπιδίων των ζωοτροφών δεν επηρέαζε την παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων σε κρέας χοίρων (Lund et al. 2007) και βοοειδών (Gatellier et al. 2010). Κάποιοι ερευνητές, μάλιστα, ανακοίνωσαν ότι η ακορεστότητα των λιπιδίων που προσθέτονταν στις τροφές γαλόπουλων επηρέαζε πολύ περισσότερο την οξειδωση των λιπιδίων παρά των πρωτεϊνών (Gatellier et al. 2000). Πρόσφατα, οι Baron et al. (2009) ανέφεραν ότι ο τύπος του ελαίου (ιχθυέλαιο έναντι φυτικού ελαίου) που προσθετόταν στις ιχθυοτροφές δεν επηρέαζε την οξειδωση των πρωτεϊνών σε κρέας πέστροφας. Οι ίδιοι ερευνητές, επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η προσθήκη κανθαξανθίνης στις ιχθυοτροφές ελάττωνε σημαντικά την οξειδωση των πρωτεϊνών σε κρέας πέστροφας κατά την συντήρησή του (Baron et al. 2009). Διάφοροι ερευνητές επιβεβαίωσαν την ευεργετική δράση της προσθήκης στις ζωοτροφές αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η τοκοφερόλη και η βιταμίνη C έναντι της οξειδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών σε κρέας βοοειδών (Rowe et al. 2004), γαλόπουλων (Mercier et al. 1998) και χοίρων (Ventanas et al. 2006) κατά τη συντήρησή του σε ψύξη. Επιπλέον, άλλοι ερευνητές ανακοίνωσαν ότι η προσθήκη στις πτηνοτροφές φρούτων και λαχανικών όπως είναι τα μήλα και τα μπρόκολα, που είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής καρβονυλικών ενώσεων σε κρέας κοτόπουλων (Young et al. 2002).

Προς την ίδια κατεύθυνση, οι Cortinas et al. (2005) ανέφεραν ότι μετά από χορήγηση σε ορνίθια ζωοτροφής εμπλουτισμένης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και  $\alpha$ -τοκοφερόλη, η οξειδωση των λιπιδίων αυξανόταν γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο νωπό κρέας, αλλά η αύξηση αυτή ήταν μικρότερη όταν αυξανόταν το επίπεδο προσθήκης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Επίσης, οι Galvin et al. (1998) παρατήρησαν ότι μαγειρεμένα μπιφτέκια από κρέας κοτόπουλων στα οποία χορηγούνταν με την τροφή 800 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλη/kg επί 42 μέρες, παρουσίαζαν μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, οι Botsoglou et al. (2003) επίσης ανέφεραν ότι νωπό και μαγειρεμένο κρέας από γαλόπουλα που τρέφονταν επί τέσσερις εβδομάδες με τροφή εμπλουτισμένη με 200 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλη/kg, παρουσίαζαν

μειωμένη οξείδωση των λιπιδίων τους.

## 10.2 Τεχνολογικές μέθοδοι

Η προσθήκη στο κρέας ουσιών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες συνιστά την συνηθέστερη τεχνολογική στρατηγική για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών. Σύμφωνα με την Οδηγία 95/2/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ως αντιοξειδωτικές ορίζονται οι ουσίες οι οποίες παρατείνουν τον χρόνο συντήρησης των τροφίμων προστατεύοντας αυτά από τις αλλοιώσεις που προκαλούνται από οξειδωτικές διεργασίες, όπως το τάγγισμα του λίπους και οι μεταβολές της χρώσης. Στην επιστήμη των τροφίμων, ως αντιοξειδωτικές ορίζονται οι ουσίες οι οποίες μπορούν να παρεμποδίσουν τις αντιδράσεις των ασταθών και ιδιαίτερα δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας έτσι τα συστατικά των τροφίμων από την οξείδωση, η οποία συνεπάγεται μεταβολές βασικών παραμέτρων ελέγχου ποιότητας, όπως είναι η χρώση, το άρωμα, η γεύση και η διατροφική αξία του τροφίμου (Donelli & Robinson 1995). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες προστίθενται στο κρέας και τα κρεατοσκευάσματα για να επιβραδύνουν την οξείδωση και να καταστήσουν, έτσι, τα τρόφιμα αποδεκτά για κατανάλωση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η προσθήκη των ουσιών αυτών, ωστόσο, δεν μπορεί να αντιστρέψει την οξείδωση των ήδη ταγγισμένων τροφίμων.

Οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι φαινολικές ενώσεις που μπορεί να διακριθούν σε συνθετικές ή φυσικές. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο (BHT), η βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA), ο γαλλικός προπυλεστέρας (PG) και η τεταρτοταγής βουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ) που χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και με χαμηλό κόστος, για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων σε ευάλωτα κρεατοσκευάσματα. Οι Yun et al. (1987) ανέφεραν ότι οι ουσίες TBHQ και BHA ήταν πιο αποτελεσματικές μεταξύ των διαφόρων ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως εναλλακτικές λύσεις αντί των νιτροδών. Ακόμη, οι Formanek et al. (2001) ανακοίνωσαν ότι η προσθήκη BHA και BHT σε μπιφτέκια από βόειο κρέας είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων. Επιπλέον, οι Hettiarachchy et al. (1996) βρήκαν ότι η προσθήκη BHA και BHT οδηγούσε σε τουλάχιστον διπλάσια μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων. Οι Biswas et al. (2004) υποστήριξαν, αντίθετα, ότι η επίστρωση 100 ppm BHA και 100 ppm BHT σε μπιφτέκια από χοιρινό κρέας, δεν προκάλεσε μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε θερμοκρασία 4 °C επί 35 ημέρες. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί,



ότι μολονότι η χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών σε προϊόντα κρέατος όπως τα λουκάνικα ελέγχεται και το ανώτατο όριο προσθήκης μίγματος BHA και BHT ανέρχεται σε 0,02% των λιπιδίων (Gray & Weiss 1988), έχουν εκδηλωθεί ανησυχίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους από τη χρήση αυτών των αντιοξειδωτικών για την υγεία των καταναλωτών, οι οποίες έχουν οδηγήσει, τα τελευταία χρόνια, σε αυξημένο ενδιαφέρον για φυσικές εναλλακτικές αντιοξειδωτικές ουσίες (Saint Angelo 1996).

Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει αθροιστική ή συνεργό δράση όταν συνδυάζονται αντιοξειδωτικές ουσίες που δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς (McBride et al. 2007). Οι Ansorena και Astiasaran (2004) έδειξαν ότι η χρήση BHA και BHT σε συνδυασμό με συσκευασία σε κενό αέρος ελαχιστοποίησε την οξείδωση των λιπιδίων σε ξηρά ζυμούμενα χοιρινά λουκάνικα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους σε θερμοκρασία 4 ° C επί 5 μήνες. Ακόμη, δείγματα ακτινοβολημένου βόειου κιμά στα οποία είχε προστεθεί μίγμα BHA και BHT και ξεχωριστά ή σε συνδυασμό ασκορβικό οξύ, ερυθροβικό οξύ ή φωσφορικά άλατα εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη οξείδωση των λιπιδίων και μεγαλύτερη ερυθρότητα σε σχέση με μάρτυρες, κατά τη διάρκεια συντήρησης επί 9 ημέρες σε συνθήκες προσομοίωσης εκθετηρίου λιανικού εμπορίου (Duong et al. 2008). Οι Jayathilakan et al. (2007a) διερευνώντας το ρόλο φυσικών αντιοξειδωτικών όπως το γαρύφαλλο, η κανέλα, το ασκορβικό οξύ και τα προϊόντα αντίδρασης Maillard (MRPs), καθώς και συνθετικών αντιοξειδωτικών όπως το BHA, TBHQ και PG, σε μαγειρεμένα και συντηρημένα βοδινά, χοιρινά και αρνίσια κρέατα, παρατήρησαν ότι η οξείδωση των λιπιδίων στα διάφορα είδη κρεάτων ακολουθούσε τη σειρά χοιρινό > βόειο > αρνίσιο, ενώ η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών τη σειρά MRPs > γαρύφαλλο > ασκορβικό οξύ > κανέλα και των συνθετικών αντιοξειδωτικών τη σειρά TBHQ > BHA > PG.

Άλλες συνθετικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι τα νιτρικά και τα νιτρώδη άλατα που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παραγωγή των κρεατοσκευασμάτων σε όλο τον κόσμο. Μολονότι ο κύριος σκοπός της προσθήκης τους είναι η πρόληψη της αλλαντίασης, έχει επίσης αποδειχθεί ότι αποφέρουν την χαρακτηριστική χρώση των αλλαντικών και αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων (Gray et al. 1981, Honikel 2004). Τα νιτρικά χρησιμοποιούνται κυρίως στην παρασκευή ζυμούμενων κρεατοσκευασμάτων, στα οποία η αργή απελευθέρωση των νιτρωδών είναι απαραίτητη. Η απελευθέρωση των νιτρωδών είναι το αποτέλεσμα της αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη από τους μικροοργανισμούς που περιέχονται στο κρέας. Η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και ο επακόλουθος

σχηματισμός μονοξειδίου του αζώτου είναι οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την έναρξη της δράσης των ουσιών αυτών (Moller & Skibsted 2002). Το μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να αντιδράσει άμεσα με το σίδηρο της αίμης προς σχηματισμό μονο- και δι-νιτροσυλαιοχρώμης. Αυτή η αντίδραση μαζί με τον σχηματισμό νιτροζο-ενώσεων που δρουν αντιοξειδωτικά, πιστεύεται ότι είναι η βάση για την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση (Kanner et al. 1984, Pegg & Shahidi 2000).

Τα επίπεδα των νιτροδών που χρησιμοποιούνται στα κρεατοσκευάσματα είναι πολύ χαμηλά και κυμαίνονται συνήθως από 100 έως 150 ppm (Cassens 1997). Τα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης ελέγχονται από κρατικούς φορείς, εξαιτίας της πιθανότητας παραγωγής νιτροζαμίνης και παραγώγων, μερικά από τα οποία θεωρούνται καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετές προτάσεις έχουν γίνει για την εξάλειψη ή τη μείωση των νιτροδών από προϊόντα με βάση το κρέας, αλλά καμμία από αυτές δεν έχει τύχει ευρείας αποδοχής.

Πολλοί καταναλωτές αντιδρούν αρνητικά σε μια ετικέτα που δηλώνει ως συστατικό το νιτρώδες νάτριο. Αγνοούν, ωστόσο, ότι ορισμένα κοινά φυσικά τρόφιμα όπως το σέλινο και το πράσο, αποτελούν πλούσιες πηγές νιτρώδους νατρίου. Επιπλέον, τα επίπεδα των νιτροδών μπορεί να μειωθούν σημαντικά κατά το μαγείρεμα των αλλαντικών και άλλων προϊόντων με βάση το κρέας, λόγω της μετατροπής τους σε νιτρικό οξύ. Ακόμη, κατά τη διάρκεια της συντήρησης, μπορεί να υπάρξει περαιτέρω μείωση των νιτροδών και, τη στιγμή που το προϊόν καταναλώνεται, τα επίπεδα των νιτροδών μπορεί να είναι στο επίπεδο των 10-30 ppm. Εξάλλου, στα προϊόντα κρέατος όπως τα βραστά λουκάνικα, που υποβάλλονται σε επεξεργασία αμέσως μετά την προσθήκη νιτροδών, προστίθενται αναγωγικά μέσα όπως τα ασκορβικά και ερυθροβικά άλατα για γρήγορη μετατροπή των νιτροδών σε μονοξείδιο του αζώτου και τη μείωση, έτσι, της πιθανότητας σχηματισμού νιτροζαμίνης.

Ο Shahidi (1989) ανέφερε ότι κρέας που είχε υποβληθεί σε κατεργασία με νιτρώδη παρουσίαζε τη φυσική γεύση του κρέατος χωρίς άλλες γεύσεις από ενώσεις των αντιδράσεων οξειδωσης των λιπιδίων. Σε συμφωνία με αυτήν την αναφορά, οι Marco et al. (2006) ανέφεραν ότι λουκάνικα με προσθήκη νιτροδών αλάτων, που είχαν υποστεί ζύμωση, παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης σε σχέση με λουκάνικα στα οποία είχαν προστεθεί αντί των νιτροδών νιτρικά άλατα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η οξειδωση των λιπιδίων επιβραδυνόταν από την παρουσία των νιτρικών. Αντίθετα, οι Navarro et al. (2001) ανέφεραν ότι ο αριθμός υπεροξειδίων και οι

συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης ήταν μεγαλύτερες σε λουκάνικα με προσθήκη νιτρικών παρά με προσθήκη νιτρωδών αλάτων.

Εναλλακτική λύση της χρήσης των συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών είναι η βιταμίνη E, μια λιποδιαλυτή ουσία που δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Με την ονομασία «βιταμίνη E» περιγράφονται τουλάχιστον οκτώ διαφορετικές ενώσεις με βιολογική δράση ανάλογη αυτής της α-τοκοφερόλης, όπως οι α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες και α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλες. Άλλες σημαντικές εναλλακτικές λύσεις είναι διάφορα καροτενοειδή, όπως το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, καθώς και ορισμένες φαινολικές ουσίες των φυτών οι οποίες έχουν διεξοδικά μελετηθεί για τη δράση τους έναντι των λιπιδίων (Viljanen et al. 2004, Estevez & Cava 2004). Οι μελέτες, όμως, αυτές κατέδειξαν ότι ουσίες οι οποίες παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων δεν είναι πάντα ικανές να παρεμποδίζουν και την οξείδωση των πρωτεϊνών. Βέβαια, η παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων αναμένεται να παρεμποδίζει σε κάποιο βαθμό και την οξείδωση των πρωτεϊνών, εξαιτίας της ελαχιστοποιημένης παραγωγής δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων που θα ήταν σε θέση να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες. Πρόσφατα, όμως, διαπιστώθηκε ότι ενώ η υδρόφιλη αντιοξειδωτική ουσία Trolox που αποτελεί το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, μπορούσε να παρεμποδίζει την οξείδωση τόσο των πρωτεϊνών όσο και των λιπιδίων, διάφορες λιπόφιλες αντιοξειδωτικές ουσίες δεν βρέθηκαν ικανές να παρεμποδίσουν την οξείδωση των πρωτεϊνών (Baron et al. 2005).

Οι φαινολικές ουσίες των φυτών μπορεί να είναι τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες και, επομένως, μπορεί να κατανέμονται τόσο στην υδατική όσο και στην λιπιδική φάση των τροφίμων (Shahidi & Wanasundara 1992). Η ικανότητα των ουσιών αυτών να δρουν ως αντιοξειδωτικές εξαρτάται από τη χημική τους δομή, τη σύνθεση και τα χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων, τη φάση και την ένταση των χημικών αντιδράσεων, καθώς και το σημείο συνάθροισής τους (Frankel & Meyer, 2000). Η ιδιαίτερη δράση των ουσιών αυτών καθορίζεται, επιπλέον, από το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται από την ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική σύζευξή τους με τις πρωτεΐνες των τροφών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται από την συγκέντρωση και τη χημική κατάσταση της φαινολικής ουσίας, καθώς και από το μέγεθος και το ολικό ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης (Kroll & Rawel, 2001). Οι ιδιαίτεροι μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών, η φύση του στόχου, το σημείο και το είδος της προσβολής, επηρεάζουν την οξείδωση και, επομένως, την ικανότητα της ουσίας να παρεμποδίζει την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών (Dean et al. 1991).

Έχει αποδειχθεί ότι μερικά εκχυλίσματα φυτών και φρούτων πλούσιων σε φαινολικές ουσίες ασκούσαν αντιοξειδωτική προστασία στις πρωτεΐνες μπιφτεκιών από κρέας χοίρων και ορνιθίων που είχαν υποστεί θερμική κατεργασία (Rababah et al. 2004, Vuorela et al. 2005, Ganhaio et al. 2010), αλλά το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα βρέθηκε να εξαρτάται και από τη χημική δομή και τη συγκέντρωση της φαινολικής ουσίας. Επιπλέον αναφέρθηκε ότι ενώ ένα εκχύλισμα δενδρολίβανου ασκούσε προστασία έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών σε μπιφτέκια από βόειο κρέας και ένα μίγμα ασκορβικού και κιτρικού οξέος προήγαγε αυτήν την οξείδωση, ο συνδυασμός των δύο αυτών συστημάτων ασκούσε προστασία έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων (Lund et al. 2007). Ακόμη, ανακοινώθηκε ότι ενώ η προσθήκη αιθερίου ελαίου δενδρολίβανου σε λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης παρεμπόδιζε την οξείδωση των πρωτεϊνών, η προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων προήγαγε, αντίθετα, την οξείδωση (Estevez & Cava 2006). Επίσης, βρέθηκε ότι ενώ ορισμένες πολυφαινολικές ενώσεις καθώς και η βιταμίνη E ήταν αποτελεσματικές έναντι της οξείδωσης της μυοσφαιρίνης, άλλες πολυφαινολικές ενώσεις προήγαγαν, αντίθετα την οξείδωση αυτής της πρωτεΐνης (Estevez et al. 2008, Estevez & Heinonen 2010).

Άλλες τεχνολογικές μέθοδοι για την παρεμπόδιση των οξείδωσης του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων είναι η κάπνιση και η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η κάπνιση κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας παρέχει μοναδικές γεύσεις και επίσης έχει τη δυνατότητα να μειώσει την εμφάνιση οξειδωτικού ταγγίσματος κατά την συντήρηση. Πάνω από 400 ενώσεις έχουν απομονωθεί από τον καπνό ξύλου (Maga 1988). Τα ενεργά συστατικά του καπνού περιλαμβάνουν πτητικά οξέα που μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση, το pH καθώς και τη σταθερότητα του προϊόντος. Ακόμη περιλαμβάνουν καρβονυλικές ενώσεις που μπορούν να αντιδράσουν με πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις για την ανάπτυξη της χρώσης, καθώς και φαινόλες που θεωρούνται ότι είναι τα κυριότερα συστατικά της γεύσης και, επίσης, κυρίως υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Cadwallader 2007). Επιπλέον, η ατελής πυρόλυση κατά την παραγωγή του καπνού, μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό πρόσθετων οξειδίων του αζώτου που μπορούν να δράσουν ως νιτρώδη. Σχετικές μελέτες σε φρέσκο, προμαγειρεμένο και επεξεργασμένο κρέας έχουν δείξει ότι ορισμένα συστατικά του καπνού μπορεί να επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών. Έχει, μάλιστα, αναφερθεί ότι η ενσωμάτωση των συστατικών του καπνού στο κρέας μπορεί να μειώσει την οξείδωση των λιπιδίων από 20 έως 39% (Barbut 2000).

Σε ό,τι αφορά τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, αυτή είναι ένα μέσο

παρεμπόδισης της οξειδωσης του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων με την αποφυγή έκθεσής τους στο οξυγόνο. Ρυθμίζοντας τη μερική πίεση του οξυγόνου στο περιβάλλον της συσκευασίας, μπορεί κανείς να ελαχιστοποιήσει την οξειδωση των λιπιδίων και τον αποχρωματισμό του κρέατος (McMillin 2008), συχνά σε συνδυασμό με διάφορα προσθετικά (Lund et al. 2007a, Mohamed et al. 2008). Επίσης, η συσκευασία σε κενό έχει αποδειχθεί αποτελεσματική γιατί απομακρύνει το οξυγόνο από την επιφάνεια του κρέατος και, συνεπώς, ελαχιστοποιεί την οξειδωση των λιπιδίων. Αξίζει ίσως να επισημανθεί ότι η πρόσφατη χρήση του μονοξειδίου του άνθρακα για την ανάπτυξη μιας σταθερής κόκκινης χρώσης σε συσκευασμένα νωπά κρέατα έχει προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Το μονοξείδιο του άνθρακα ενώνεται με τον σίδηρο της αίμης της μυοσφαιρίνης και παρέχει μια χρώση σχεδόν ίδια με εκείνη της οξυμυοσφαιρίνης (Laury & Sebranek 2007).

Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί ότι σημαντικό ενδιαφέρον εκδηλώθηκε τα τελευταία χρόνια για τα βρώσιμα υλικά συσκευασίας, εξαιτίας περιβαλλοντικών ανησυχιών και θεμάτων σχετικών με την αποδόμηση των πλαστικών υλών (Quattara et al. 2000). Βρώσιμα υλικά που αποτελούνται από τροποποιημένο άμυλο, πρωτεΐνες σόγιας ή γλουτένη σίτου, και περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά εξετάστηκαν ως ένα ακόμη μέσο για τον έλεγχο της οξειδωσης στα μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος, αλλά εμφανίστηκαν διάφορα προβλήματα που σχετίζονται με τη διαλυτότητα των ουσιών αυτών.

## **11. Αντιοξειδωτικές ουσίες ως προσθετικά τροφίμων. Ταξινόμηση και μηχανισμοί δράσης**

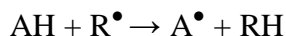
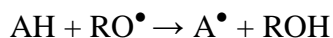
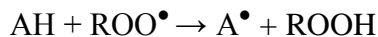
Οι αντιοξειδωτικές ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα, πρέπει να συνδυάζουν σε κάποιο βαθμό τις παρακάτω ιδιότητες (Corpen 1989):

- Να μην έχουν καμιά βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου
- Να είναι αποτελεσματικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις
- Να έχουν σχετικά χαμηλό κόστος
- Να μην προσδίδουν δυσάρεστη οσμή και γεύση ή χρώση στα τρόφιμα στα οποία προστίθενται
- Να μπορούν εύκολα να αναμιγνύονται με τα τρόφιμα.
- Να είναι όσο γίνεται πιο σταθερές στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου όπως το ψήσιμο και το τηγάνισμα

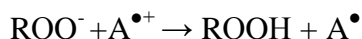
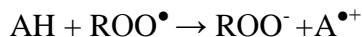
Οι ουσίες αυτές ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους μπορεί να διακριθούν σε πρωτοταγείς και δευτεροταγείς.

### 11.1 Πρωτοταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες

Οι ουσίες αυτές δρουν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, ενώ οι ίδιες μετατρέπονται σε σταθερά προϊόντα. Για τη δράση των ουσιών αυτών που μπορεί να είναι συνθετικές όπως το BHT, η BHA, ο PG και η TBHQ, ή φυσικές όπως διάφορες μορφές της βιταμίνης E, το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί (Gordon 1990). Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, που είναι και ο σημαντικότερος, η δέσμευση των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του σταδίου έναρξης γίνεται με προσφορά ατόμου H από το φαινολικό υδροξύλιο κάθε πρωτοταγούς αντιοξειδωτικής ουσίας (AH) προς τις υπεροξυρίζες ( $\text{ROO}^\bullet$ ), τις αλκοξυρίζες ( $\text{RO}^\bullet$ ) ή τις ρίζες τύπου ( $\text{R}^\bullet$ ), προκαλώντας την μετατροπή τους στα αντίστοιχα μονοϋδροϋπεροξειδία ( $\text{ROOH}$ ), υδροξυπαράγωγα ( $\text{ROH}$ ) και λιπαρά οξέα ( $\text{RH}$ ) με βάση τις αντιδράσεις,



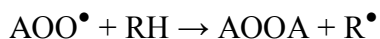
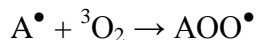
Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό, λαμβάνει χώρα αναγωγή της  $\text{ROO}^\bullet$  προς το αντίστοιχο ανιόν με απόδοση μονήρους ηλεκτρονίου και ακολουθεί μετατροπή του ανιόντος σε υδροϋπεροξειδίο.



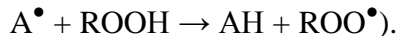
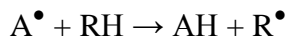
Οι ρίζες  $\text{A}^\bullet$  που σχηματίζονται, αντιδρούν, στη συνέχεια, με ομοειδείς ή άλλες ρίζες και σχηματίζονται σταθερά προϊόντα (Frankel 1998) σύμφωνα με τις αντιδράσεις,



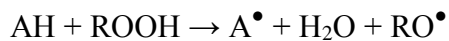
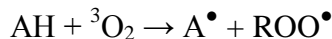
Στην περίπτωση αντιοξειδωτικών ουσιών με ασθενή δράση, είναι δυνατόν να λάβουν χώρα και άλλες παράπλευρες αντιδράσεις που είναι όμως, γενικά, πιο αργές. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η ρίζα  $\text{A}^\bullet$  μπορεί να αντιδράσει πρώτα με το μοριακό οξυγόνο ( $^3\text{O}_2$ ) και, στη συνέχεια, με τα λιπίδια,



Ακόμη, μπορεί να αντιδράσει απευθείας με τα λιπίδια και τα υδροϋπεροξειδία σύμφωνα με τις αντιδράσεις,



Επίσης, οι αντιοξειδωτικές ουσίες μπορεί να οξειδωθούν απευθείας από το μοριακό οξυγόνο ή και να αντιδράσουν με υδροϋπεροξειδία που έχουν ήδη σχηματιστεί και να εμφανίσουν έτσι, τελικά, προοξειδωτική δράση.



Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως να επισημανθεί ότι αντίθετα προς τις φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες, το β-καροτένιο δεν δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες με απόδοση ενός ατόμου υδρογόνου, αλλά σχηματίζοντας μια ένωση προσθήκης με τη ρίζα  $ROO^{\bullet}$  (Burton & Ingold 1984). Έτσι, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους, τα καροτενοειδή δρουν ως προ-οξειδωτικές ουσίες υπό ορισμένες συνθήκες, και ως αντιοξειδωτικές υπό άλλες συνθήκες. Η ισορροπία αυτή μεταξύ της προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής δράσης είναι πολύ λεπτή, και η αντιοξειδωτική συμπεριφορά είναι περισσότερο εμφανής σε συνθήκες χαμηλής μερικής πίεσης οξυγόνου (Jorgensen & Skibsted 1993).

Συνήθως, η αντιοξειδωτική δράση των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών ουσιών παρουσιάζεται σε μία συγκέντρωση που ονομάζεται «κρίσιμη» και είναι διαφορετική για κάθε αντιοξειδωτική ουσία. Όταν όμως το επίπεδο της προσθήκης γίνει πολύ υψηλό, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί αντί της αντιοξειδωτικής, προ-οξειδωτική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιοξειδωτικών ουσιών που μπορεί να εμφανίσουν προ-οξειδωτική δράση όταν αυξάνεται το επίπεδο της προσθήκης τους στα τρόφιμα είναι η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (Pokorny 1987).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της δομής του μορίου τους και, κυρίως, από τους υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο ( Gordon 1990, Yanishieva 2001). Έτσι, οι απλές φαινολικές ουσίες δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση παρά μόνο όταν υπάρχει υποκατάσταση σε *ορθο*- ή *παρα*-θέση με υδροξυ-, αλκυλο- και μεθοξυ-ομάδες που είναι δότες ηλεκτρονίων και προκαλούν αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του φαινολικού υδροξυλίου. Με μια τέτοια δομή, ελαττώνεται η ενέργεια του δεσμού υδρογόνου και οξυγόνου και διευκολύνεται η απόδοση ενός ατόμου υδρογόνου προς τις υπεροξυρίζες των λιπαρών οξέων. Η υποκατάσταση σε *μετα*-θέση δεν βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς σε μία τέτοια θέση οι υποκαταστάτες έχουν ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα. Επιπλέον, η σταθερότητα της ρίζας  $A^{\bullet}$  μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με την υποκατάσταση σε *ορθο*-

θέση υδροξυ- ή αλκυλο-ομάδων με μεγάλο όγκο. Στην πρώτη περίπτωση, η εισαγωγή δεύτερης υδροξυομάδας οδηγεί σε σταθεροποίηση της ρίζας  $A^\bullet$  λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Αυτό δεν μπορεί να γίνει με άλλου τύπου υποκαταστάτες και γι' αυτό οι μονοφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν, γενικά, χαμηλότερη δραστηριότητα.

Φαινολικές ενώσεις με ογκώδεις αλκυλοϋποκαταστάτες (BHT, BHA, TBHQ, PG και τοκοφερόλες) μπορούν να δράσουν ως αποτελεσματικά πρωτοταγή αντιοξειδωτικά με παραγωγή σταθερών ελευθέρων ριζών  $A^\bullet$ , οι οποίες δεν μπορούν να προκαλέσουν εκκίνηση ή και να προάγουν περαιτέρω την οξείδωση των λιπών. Η παρουσία στο μόριο ογκωδών υποκαταστατών, όπως στο BHT όπου υπάρχουν δύο τριτοταγείς βουτυλοομάδες, αν και δεν ευνοεί το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, εντούτοις προκαλεί φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης. Εξαιτίας αυτής της παρεμπόδισης, η αντίστοιχη φαινοξυρίζα  $A^\bullet$  δεν μπορεί να προσεγγίσει εύκολα τις λιπαρές ουσίες ή τα υδροϋπεροξειδία και να αλληλεπιδράσει μαζί τους. Το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της φαινολικής ένωσης.

Ακόμη, η υποκατάσταση της φαινολικής ομάδας από υδροξυομάδες έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της φαινολικής ένωσης. Εκτός από την πρόσθετη σταθεροποίηση που προσφέρει στη ρίζα  $A^\bullet$ , η ημικινοειδής ρίζα που παράγεται αρχικά μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω μετά από αντίδραση με δεύτερη  $ROO^\bullet$  προς κινόνη, παρέχοντας και δεύτερο άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, είναι δυνατή η αλληλεπίδραση δύο ριζών  $A^\bullet$  που μπορεί να οδηγήσει σε αναγέννηση ενός μορίου της αρχικής φαινολικής ένωσης. Η σημασία της παρουσίας πρόσθετων υδροξυομάδων παρατηρείται με την παρουσία και τρίτης ομάδας. Έτσι η πυρογαλλόλη και τα παράγωγά της όπως το γαλλικό οξύ, αποτελούν τις πλέον αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Ωστόσο περισσότερες από τρεις υδροξυομάδες στον αρωματικό δακτύλιο δεν ενισχύουν περαιτέρω τη δραστηριότητα. Αύξηση της αποτελεσματικότητας παρατηρείται επίσης όταν υπάρχει και δεύτερος δακτύλιος με κατεχολική ομάδα στο μόριο της φαινολικής ένωσης.

## 11.2 Δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες

Στην ομάδα των δευτεροταγών αντιοξειδωτικών ουσιών ανήκουν ενώσεις με διαφορετικές ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές προκαλούν μείωση του ρυθμού έναρξης της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με μηχανισμούς διαφορετικούς από αυτούς των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών. Οι δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες δρουν, συνήθως, παρουσία ενός προ-οξειδωτικού παράγοντα ή μιας άλλης πρωτοταγούς



αντιοξειδωτικής ουσίας (Gordon 1990), οπότε και εμφανίζουν συνεργό δράση. Αποτελούν, συνήθως, πολύ αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές ουσίες και η αποτελεσματικότητά τους αποδίδεται στο γεγονός ότι μπορεί να δρουν με ποικίλους μηχανισμούς που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Με βάση το μηχανισμό δράσης τους, μπορεί να διακριθούν σε ενώσεις που συμπλέκονται με μεταλλικά ιόντα, σε ενώσεις που εκκαθαρίζουν το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης, σε αναγωγικές ενώσεις που δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο και σε ενώσεις που έχουν διάφορους μηχανισμούς δράσης.

### 11.2.1 Ενώσεις που συμπλέκονται με μεταλλικά ιόντα

Ο σχηματισμός συμπλόκων ενώσεων προκαλεί μείωση του προ-οξειδωτικού χαρακτήρα των μεταλλικών ιόντων, γιατί αυξάνει την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων στο στάδιο της έναρξης. Όλες οι χηλικές ενώσεις που είναι ικανές να σχηματίζουν  $\sigma$ -δεσμούς με τα μεταλλικά ιόντα, μπορούν να δρουν ως δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες διαμέσου της μείωσης του δυναμικού οξειδοαναγωγής και της σταθεροποίησης με αυτόν τον τρόπο των ασταθών καταστάσεων οξείδωσης των μεταλλικών ιόντων. Αντίθετα, χηλικά μέσα όπως οι ετεροκυκλικές βάσεις που σχηματίζουν  $\pi$ -δεσμούς, αυξάνουν το δυναμικό οξειδοαναγωγής με συνέπεια την εμφάνιση προ-οξειδωτικών φαινομένων.

Συνθετικές ουσίες όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), το κιτρικό οξύ και τα παράγωγα του φωσφορικού οξέος, έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν τα λιπίδια από την οξείδωση μέσω του σχηματισμού συμπλόκων ενώσεων, μεταξύ των οποίων εκείνες που σχηματίζει το EDTA με τα ιόντα των μεταβατικών μετάλλων να είναι οι πιο σταθερές από θερμοδυναμική άποψη. Εκτός από τις συνθετικές, πολυάριθμες φυσικές ενώσεις με ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων, χρησιμοποιούνται, επίσης, ως δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι διάφορες φλαβονόλες, όπως η κερκετίνη και η μυρικετίνη (Ramanathan & Nagaratham 1993), το φυτικό οξύ (Nielsen et al. 2004) και η χιτίνη και τα παράγωγά της (Shahidi et al. 1999).

### 11.2.2 Ενώσεις που εκκαθαρίζουν το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης

Ορισμένα καροτενοειδή όπως το  $\beta$ -καροτένιο, το λυκοπένιο και η λουτεΐνη, δρουν αντιοξειδωτικά σε συνθήκες έμμεσης φωτοοξείδωσης, με το λυκοπένιο να παρουσιάζει την καλύτερη αποτελεσματικότητα, προκαλώντας εκκαθάριση τόσο του οξυγόνου της απλής διεγερμένης κατάστασης όσο και φωτοευαισθητοποιητών, τα μόρια των οποίων έχουν μεταπέσει στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (Hailla et al. 2000). Η διαδικασία της

εκκαθάρισης περιλαμβάνει τη μεταφορά της ενέργειας ενεργοποίησης από το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης ή τον φωτοευαισθητοποιητή στο μόριο του καρροτενοειδούς, το οποίο μεταπίπτει με τη σειρά του στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Το μόριο του καρροτενοειδούς μπορεί, στη συνέχεια, να μεταπέσει στη βασική του κατάσταση με εκπομπή θερμικής ενέργειας. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ του  $^1\text{O}_2$  και του  $^3\text{O}_2$  ανέρχεται σε 94 KJ/mol και γι' αυτό το λόγο η εκκαθάριση του  $^1\text{O}_2$  από την ομάδα των καρροτενοειδών είναι εφικτή μόνο όταν η ενέργεια που απαιτείται για τη μετάπτωσή τους στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση είναι χαμηλότερη από 94 KJ/mol. Μόρια καρροτενοειδών που πληρούν αυτήν την ιδιότητα, έχουν συνήθως 9 ή περισσότερους συζυγείς διπλούς δεσμούς (Viljanen et al. 2002).

### 11.2.3 Αναγωγικές ενώσεις που δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο

Η προσθήκη αναγωγικών ενώσεων όπως το ασκορβικό οξύ, το ισομερές του ερυθροβικό οξύ και τα άλατά τους, χρησιμοποιείται ευρύτατα για την προστασία των λιπιδίων από την οξείδωση. Η δραστηριότητα αυτή ενισχύεται από την προσθήκη κιτρικού οξέος και των αλάτων του, που παρεμποδίζουν αντιδράσεις οξείδωσης οι οποίες καταλύονται από ιόντα μεταβατικών μετάλλων. Το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται εύκολα προς δεϋδροασκορβικό οξύ και μπορεί να αποδώσει ένα άτομο υδρογόνου προς αλκοξυρίζες ή προς το μοριακό οξυγόνο (Porter 1993). Η απόδοση, όμως, του υδρογόνου δεν είναι εφικτή σε υπεροξυρίζες, με συνέπεια η αποτελεσματικότητά του ως αντιοξειδωτικού να εξαρτάται από την ταυτόχρονη παρουσία πρωτοταγών αντιοξειδωτικών ουσιών.

Το ασκορβικό οξύ αναστέλλει αποτελεσματικά την οξείδωση των περισσότερων φυτικών ελαίων, δρώντας αποτελεσματικότερα από ό,τι ένα μίγμα ΒΗΑ και ΒΗΤ, όταν προστίθεται σε συγκέντρωση 0,01% (Cort 1974). Η δράση του, αντίθετα, περιορίζεται δραστικά σε ζωικά λίπη, εκτός εάν προστεθεί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,1%. Και αυτό, γιατί σε χαμηλές συγκεντρώσεις που είναι σχεδόν ισοδύναμες με τις συγκεντρώσεις στις οποίες απαντώνται συνήθως τα ιόντα των μεταβατικών μετάλλων, το ασκορβικό οξύ μπορεί να επιταχύνει τις οξειδωτικές αντιδράσεις ανάγοντας ή διατηρώντας τα ιόντα αυτά στη χαμηλότερη και, ιδιαιτέρως, ενεργή βαθμίδα οξείδωσης (Kanner 1992). Επομένως, το ασκορβικό οξύ, ανάλογα με το επίπεδο της προσθήκης του, μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως αντιοξειδωτικό όσο και ως προ-οξειδωτικό. Το ασκορβικό οξύ σε χαμηλά επίπεδα προσθήκης (έως 250 ppm), μπορεί να επιταχύνει τις αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα (μέχρι 500 ppm), να αναστείλει τις αντιδράσεις αυτές,

μεταβάλλοντας, πιθανώς, την ισορροπία μεταξύ των δισθενών και τρισθενών ιόντων σιδήρου ή λειτουργώντας ως αποσβεστής οξυγόνου (Igene et al. 1985).

Το ασκορβικό οξύ, το ισομερές του ερυθροβικό οξύ και τα άλατά τους μπορούν, επίσης, να έχουν συνεργό δράση με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες και πολυφωσφορικά άλατα, παρέχοντας προστασία στο κρέας από την οξειδωτική υποβάθμιση. Προσθήκη α-τοκοφερόλης ή συνδυασμού κιτρικού οξέος, πολυφωσφορικών αλάτων, γαλλικού προπυλεστέρα και ΒΗΑ σε κρέας πάπιας πριν από το μαγείρεμά της, επιβράδυνε την οξειδωτική υποβάθμισή της κατά το μαγείρεμα, τη συντήρηση και την αναθέρμανσή της (Klinger & Stadelman 1975).

#### 11.2.4 Ενώσεις που δρουν με διάφορους μηχανισμούς δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση ορισμένων δευτεροταγών αντιοξειδωτικών ουσιών μπορεί να οφείλεται σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς. Έτσι, καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται κατά την διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, καθώς και υδατοδιαλυτά σάκχαρα των τροφίμων αντιδρούν με αμινοξέα και πρωτεΐνες διαμέσου μίας σειράς πολύπλοκων αντιδράσεων γνωστών ως αντίδραση Maillard. Τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μπορούν να δράσουν είτε αναγωγικά, ανάγοντας τα υδροϋπεροξειδία προς σταθερές αλλυλικές αλκοόλες, ή σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα μεταλλικά ιόντα που δρουν ως καταλύτες της οξείδωσης (Bell 1996).

Η δυνατότητα των φωσφολιπιδίων να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, καθώς και οι γαλακτωματοποιητικές τους ιδιότητες μπορεί να εξηγήσουν την ικανότητά τους να προκαλούν επιβράδυνση της οξείδωσης έχοντας, συνήθως, συνεργό δράση με τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και τα φωσφολιπίδια ως γαλακτωματοποιητές, βελτιώνουν την κατανομή τόσο των τοκοφερολών όσο και των πολικών φαινολικών αντιοξειδωτικών στο λιπαρό υπόστρωμα, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό, περαιτέρω, την αντιοξειδωτική τους δράση. Επίσης, διάφορα ένζυμα και θειούχες ενώσεις, μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων προς αλκοόλες, κάποια φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή μπορούν να προκαλέσουν ανενεργοποίηση των λιποξυγενασών, ενώ αρωματικές κετόνες μπορούν να προκαλέσουν απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας (Frankel 1998, Yanishlieva-Maslarova 2001).

## 12. Αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών

Η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του υποστρώματος, τις συνθήκες οξείδωσης και τις μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης. Και αυτό, γιατί η χρήση διαφορετικών μεθόδων εκτίμησης του βαθμού οξείδωσης, μπορεί να δώσει ποικίλα αποτελέσματα ανάλογα με τη συμβολή των αντιοξειδωτικών στο σχηματισμό και την αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων (Frankel 1998). Αξίζει να επισημανθεί, ότι η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών δεν μπορεί να εκτιμηθεί σε υποστρώματα στα οποία η υποβάθμιση των ακόρεστων λιπαρών οξέων λόγω της οξειδωτικής τάγγισης έχει ήδη ξεκινήσει, επειδή η προσθήκη τους δεν μπορεί να επιφέρει αναστροφή της υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και της σύστασης τους. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του σχηματισμού ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία παράγονται κατά την χημική υδρόλυση των λιπών, με αποτέλεσμα την υδρολυτική τάγγιση, διότι αποτελούν φαινόμενα τα οποία χωρούν ανεξάρτητα από την αποτελεσματικότητα, το είδος και την συγκέντρωση των χρησιμοποιούμενων αντιοξειδωτικών ουσιών.

Μολονότι η αποτελεσματικότητα των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών αναμένεται, γενικά, μεγαλύτερη από εκείνη των υδρόφιλων, τα πολικά φαινολικά αντιοξειδωτικά (PG, TBHQ) μπορεί να αποδειχθούν περισσότερο αποτελεσματικά από λιπόφιλα αντιοξειδωτικά σε συστήματα τροφίμων με χαμηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, όπως είναι τα φυτικά έλαια (Porter et al. 1989). Αντίθετα, σε συστήματα τροφίμων με υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο όπως είναι τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό (μαγιονέζα), τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (BHA, BHT) μπορεί να επιβραδύνουν αποτελεσματικότερα τις οξειδωτικές διεργασίες σε σχέση με τα πολικά αντιοξειδωτικά. Νεώτερες έρευνες έχουν δείξει ότι οι διαφορές αυτές που είναι ευρύτερα γνωστές ως πολικό παράδοξο, μπορούν να αποδοθούν στη συνάθροιση των αντιοξειδωτικών ουσιών, ανάλογα με την πολικότητά τους, στη διεπιφάνεια αέρα-λίπους των αμιγώς λιπαρών υλών ή στη διεπιφάνεια λιπαρής ύλης-νερού στα γαλακτώματα. Στην πρώτη περίπτωση, τα υδρόφιλα φαινολικά αντιοξειδωτικά προσανατολίζονται στη διεπιφάνεια αέρα-λίπους και καθίστανται περισσότερο αποτελεσματικά έναντι της οξείδωσης από ό,τι τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά τα οποία παραμένουν διαλυμένα στη λιπαρή φάση. Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια λιπαρής ύλης-νερού παρέχοντας μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία σε σχέση με τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, τα οποία επειδή είναι διαλυτά στην υδατική φάση καθίστανται ανεπαρκή στην παρεμπόδιση της

οξειδωσης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι τα φυσικά αντιοξειδωτικά αποτελούνται κυρίως από μίγματα φαινολικών και ομόλογων ενώσεων που διαφοροποιούνται ως προς τον υδρόφιλο χαρακτήρα και μπορούν να έχουν συνεργό δράση. Με αυτόν τον τρόπο, η συμπεριφορά ενός φυσικού εκχυλίσματος σε λιπαρές ύλες ή γαλακτώματα είναι συνάρτηση της αναλογίας του κάθε συστατικού με αντιοξειδωτική δράση καθώς και του τρόπου παραλαβής του εκχυλίσματος (Shahidi 2000). Σημαντικά φαινόμενα συνέργειας παρατηρούνται συνήθως όταν πρωτοταγή αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, συνδυάζονται με δευτεροταγή αντιοξειδωτικά (Frankel 1998).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συνεργός δράση του μίγματος της α-τοκοφερόλης με ασκορβικό οξύ, όπου η αναγωγή της ρίζας της τοκοφερόλης από το ασκορβικό οξύ οδηγεί σε αναγέννησή της. Ανάλογα φαινόμενα συνέργειας έχουν παρατηρηθεί μεταξύ της α-τοκοφερόλης και εκχυλίσματος δεντρολίβανου, όπως επίσης και μεταξύ εκχυλισμάτων διαφόρων φυτών ή μπαχαρικών και BHA (Lindberg-Madsen & Bertelsen 1995). Ένας άλλος μηχανισμός συνεργούς δράσης στηρίζεται στην ικανότητα ουσιών όπως το κιτρικό οξύ να σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις απενεργοποιώντας τα μεταλλικά ιόντα. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι ένα μίγμα τοκοφερολών και κιτρικού οξέος βρέθηκε να παρουσιάζει ποσοστό συνέργειας 285% σε υπόστρωμα σογιελαίου στους 60° (Frankel 1998).

### **13. Αντιοξειδωτικές ουσίες και ανθρώπινος οργανισμός**

Όπως είναι γνωστό, η ενέργεια που παράγεται στα μιτοχόνδρια από τα θρεπτικά συστατικά της τροφής, αποθηκεύεται στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Κατά τις διεργασίες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, το οξυγόνο μεταβολίζεται σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες όπως τη ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου του οξυγόνου και τη ρίζα του υδροξυλίου, οι οποίες αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια προκαλώντας βλάβες (Better Health Channel 2005).

Ελεύθερες ρίζες παράγονται επίσης εξωγενώς από ένζυμα κατά την καταλυτική λειτουργία τους, από βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο, από χημικές ουσίες που υφίστανται αποτοξίκωση στο ήπαρ, τους πνεύμονες και τους νεφρούς, καθώς και από ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία (Better Health Channel 2005). Η διαδικασία της οξειδωσης αυτής στο ανθρώπινο σώμα προκαλεί καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και άλλων δομών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του γενετικού υλικού των κυττάρων.

Μολονότι ο οργανισμός μπορεί να ανταπεξέλθει στην παρουσία των ελευθέρων ριζών, υπερφόρτωση του οργανισμού με τις δραστικές αυτές μορφές οξυγόνου, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τα νοσήματα του ήπατος και, ακόμη, και κάποια είδη καρκίνου. Και αυτό γιατί το αρχικό στάδιο δημιουργίας ελευθέρων ριζών εξελίσσεται σε μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που, αν δεν αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά, μπορεί να καταλήξει σε βλάβες των κυττάρων (Owen et al. 2000a, 2000b).

Σήμερα πιστεύεται, ότι η απώλεια της λειτουργικής ικανότητας των κυττάρων με την πάροδο της ηλικίας, είναι το αποτέλεσμα της αδυναμίας του οργανισμού να αντισταθεί στη δράση των ελευθέρων ριζών που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress). Οξειδωτική καταπόνηση καλείται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών διεργασιών σε βάρος των τελευταίων (Prior & Cao 1999).

#### **14. Φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες**

Μολονότι η χρήση των αρωματικών φυτών και των καρυκευμάτων με σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων είναι διαδεδομένη από τους αρχαίους χρόνους, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους πρωτοαναφέρθηκαν το 1943 όταν οι Dubois και Tressle έδειξαν ότι η χρήση φασκόμηλου, μοσχοκάρυδου και μαύρου πιπεριού προκαλούσε αναστολή της οξειδωτικής τάγγισης στο κατεψυγμένο κρέας. Σε μεταγενέστερες έρευνες, οι Chipault et al. (1956) διαπίστωσαν ότι τα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου και του θυμαριού εμφάνιζαν αντιοξειδωτική δράση. Έκτοτε, το ενδιαφέρον των καταναλωτών για την αύξηση της χρήσης των φυσικών πρόσθετων στα τρόφιμα, οδήγησε σε εντατική έρευνα για τον εντοπισμό νέων αντιοξειδωτικών ουσιών φυτικής προέλευσης.

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε πηγές αντιοξειδωτικών ουσιών όπως τα φύλλα αρωματικών και άλλων φυτών, τα αιθέρια έλαια, τα άνθη και οι πυρήνες καρπών. Συστατικά με αντιοξειδωτική δράση όπως το ασκορβικό οξύ, οι τοκοφερόλες, οι τοκοτριενόλες, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες, έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτά. Τα αποτελέσματα πολλών ερευνητικών εργασιών υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα φρούτα, λαχανικά, οι ελαιούχοι σπόροι, τα δημητριακά, το τσάι, το κρασί και οι αρτυματικές ύλες, περιέχουν φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες που προσφέρουν τη δυνατότητα ελαχιστοποίησης της οξείδωσης των νωπών και μεταποιημένων κρεατοσκευασμάτων (Shahidi et al. 1992).

Η αντιοξειδωτική δράση πολλών φυτικών εκχυλισμάτων συμπεριλαμβανομένου του

δεντρολίβανου, του φασκόμηλου, της ρίγανης, των κατεχινών του τσαγιού και του φλοιού του ρυζιού έχει μελετηθεί σε διάφορα κρεατοσκευάσματα (McCarthy et al. 2001, Kim et al. 2003). Η αντιοξειδωτική δράση των περισσότερων από αυτά τα εκχυλίσματα αποδόθηκε κυρίως στην ικανότητα των περιεχομένων πολυφαινολικών ενώσεων να αποσβένουν τις ελεύθερες ρίζες. Ένα σημαντικό μειονέκτημα των φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι ότι μπορούν να καταστούν αναποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης θέρμανσης σε υψηλές θερμοκρασίες όπως αυτές που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια του έντονου τηγανίσματος των τροφίμων (Gordon, 1990).

Οι Al-Jalay et al. (1987) ανέφεραν την αντιοξειδωτική δραστηριότητα 10 αποξηραμένων μπαχαρικών όπως το μπαχάρι, το μαύρο πιπέρι, το κάρδαμο, η κανέλα, το γαρύφαλο, ο κόλιαντρος, το κύμινο, η πιπερόριζα, το μοσχοκάρυδο και τα ροδοπέταλα, μετά την προσθήκη τους σε ζυμούμενα λουκάνικα. Το γαρύφαλο, τα ροδοπέταλα και το μπαχάρι παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Με βάση την οργανοληπτική αξιολόγηση, οι Chouliara et al. (2007) ανέφεραν παράταση της διάρκειας συντήρησης στήθους ορνιθίων κατά 3-4 ημέρες για δείγματα που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 2-3 ημέρες για δείγματα σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, και 5-6 ημέρες για δείγματα σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας που περιείχαν όμως 0,1 % αιθερίου ελαίου ρίγανης. Οι Lee et al. (2006) ανέφεραν ότι ο αποξηραμένος χυμός μούρων ήταν αποτελεσματικός στην παραμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων σε μηχανικώς αποστεωμένο γαλόπουλο. Οι Kathirvel et al. (2009) ταυτοποίησαν ως φλαβονόλες τις φαινολικές ουσίες στα μούρα που εμπόδιζαν την οξείδωση των λιπιδίων και την κερκετίνη ως το κύριο αντιοξειδωτικό συστατικό.

Αντιοξειδωτική δράση έχει, επίσης, αποδοθεί σε συστατικά καρδιάς και σπόρους σταφυλιών μετά την προσθήκη τους σε ωμό και μαγειρεμένο χοιρινό κρέας (O'Grady et al. 2008). Ακόμη, σε άλευρο δαμάσκηνων μετά την προσθήκη του σε προψημένο ροσμπίφ (Nunez de Gonzalez et al. 2008). Επίσης, σε κεράσια και μήλα μετά την προσθήκη τους σε μπιφτέκια από βόειο κιμά (Britt et al. 1998), καθώς και σε εκχύλισμα πράσινου τσαγιού μετά την προσθήκη του σε νωπά χοιρινά λουκάνικα (Valencia et al. 2008). Επιπλέον, σε αλόη, μάραθο, μουστάρδα, κατεχίνες τσαγιού και πιπερόριζα μετά την προσθήκη τους σε μαγειρεμένα χοιρινά μπιφτέκια (McCarthy et al. 2001).

Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και μάλιστα μεγαλύτερη από αυτή της βιταμίνης C έχει, επίσης, αποδοθεί σε κατεχίνες του τσαγιού μετά την προσθήκη τους σε μαγειρεμένο ή ωμό βόειο κρέας (Mitsumoto et al. 2005). Πρόσφατα, οι Hernandez et al. (2009) αξιολόγησαν την

αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων δεντρολίβανου και ρίγανης σε νωπό χοιρινό κρέας. Παρατήρησαν ότι το δεντρολίβανο παρουσίαζε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τη ρίγανη και απέδωσαν τη δράση αυτή στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης και άλλων ενώσεων. Οι ίδιοι ερευνητές, επίσης, ανέφεραν ότι τα εκχυλίσματα της ρίγανης που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις φαινολών, κυρίως ροζμαρινικού οξέος, εμπόδισαν αποτελεσματικά την αλλοίωση της χρώσης.

Αντιοξειδωτική δράση έχει επίσης αποδοθεί σε εκχυλίσματα λεμονιού και πορτοκαλιού μετά την προσθήκη τους σε βόειο κρέας (Fernandez-Lopez et al. 2004). Ακόμη, εκχυλίσματα από φλοιό πεύκου βρέθηκαν να είναι κατάλληλα αντιοξειδωτικά για διάφορα συστήματα τροφίμων (Vuorela et al. 2005). Επιπλέον, εκχυλίσματα δεντρολίβανου, μαντζουράνας, κύμινου, φασκόμηλου, βασιλικού, θυμαριού, πιπερόριζας και γαρίφαλου βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά σε νωπά χοιρινά λουκάνικα, νωπά και μαγειρεμένα μπιφτέκια από κιμά και ωμές μπριζόλες από κρέας βούβαλου (Abd El-Alim et al. 1999, Naveena et al. 2006, Georgantelis et al. 2007).

Επίσης, διαιτητικές ίνες από εσπεριδοειδή (Fernandez-Lopez et al. 2004), πίτυρα σιταριού (Vitaglione et al. 2008), πίτυρα βρώμης (Persson et al. 2004), και πίτυρα ρυζιού (Choi et al. 2009) έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση μετά την προσθήκη τους σε κρεατοσκευάσματα όπως αλεσμένο κρέας και λουκάνικα. Αντιοξειδωτική δράση έδειξαν, ακόμη, και καρότα (Devatkal et al. 2004), κρεμμύδια και πράσα (Fista et al. 2004), φλούδες και σπόροι τομάτας (Calvo et al. 2008) καθώς και λάχανα (Chu et al. 2002) μετά την προσθήκη τους σε λουκάνικα, αλλαντικά και μπιφτέκια από βόειο κρέας.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί, ότι και στο μέλι έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ιδιότητες μετά την προσθήκη του σε επεξεργασμένα κρέατα. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό του μελιού αποδόθηκε στην παρουσία αναγωγικών σακχάρων που συμμετέχουν στην αντίδραση Maillard, φαινολικά συστατικά και άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση (McKibben & Engeseth 2002). Προϊόντα της αντίδρασης Maillard που προκύπτουν από την αντίδραση μεταξύ αναγωγικών σακχάρων και αμινών έχουν βρεθεί και από άλλους ερευνητές να ασκούν αντιοξειδωτική δράση (Manzocco et al. 2001, Benjakul et al. 2005, Jayathilakan et al. 2007a, 2007b).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες πολλών φυτικών εκχυλισμάτων εξαρτώνται, πολλές φορές, από την περιοχή όπου φύονται τα αρωματικά φυτά, την γεωγραφία και το κλίμα, τη σύνθεση του εδάφους, την περίοδο της συλλογής τους, τον τρόπο παρασκευής τους, τη φύση του υποστρώματος στο οποίο προστίθενται, καθώς και σε πολλούς άλλους παράγοντες



(Svoboda & Deans 1992). Επομένως, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι είναι πολύ επισφαλής η συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων φυσικών υλών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Προκειμένου να συγκριθεί η σχετική αποτελεσματικότητα των διαφόρων φυσικών υλών, θα πρέπει τα διάφορα αντιοξειδωτικά συστατικά να έχουν προτυποποιηθεί κατά κάποιο τρόπο.

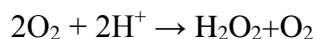
## 15. Πολυφαινολικές ενώσεις των φυτών

Μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε όλα τα τμήματα των φυτών συμπεριλαμβανομένων των ριζών, των στελεχών, των φύλλων και των καρπών. Και αυτό γιατί οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις έχουν βιολογικές ιδιότητες που, με την εξέλιξη της επιστήμης, αποδεικνύονται όλο και πιο πολύτιμες (Balasundram et al. 2006).

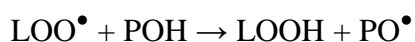
Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι ευρύτατα διαδεδομένες στα φυτικά τρόφιμα (λαχανικά, φρούτα, φυτικά έλαια), ποτά (κρασί, μπύρα) και ηδύποτα (τσάϊ, κακάο). Η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και ποτών εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (Χίου 2003). Κοινό δομικό χαρακτηριστικό των πολυφαινολικών ενώσεων είναι η παρουσία στο μορίο τους ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου με έναν ή περισσότερους υδροξυ-υποκαταστάτες. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να καταταγούν σε διάφορες ομάδες με κυριότερες, από διατροφική άποψη, τις ομάδες των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών και των ταννινών. Άλλες ομάδες με μικρότερη διατροφική σημασία είναι οι λιγνάνες, οι κουμαρίνες, οι κινόνες και τα στυλβένια.

Γενικά, οι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση η οποία εκδηλώνεται με τους παρακάτω τρόπους:

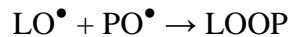
- Εκκαθαρίζουν τις ρίζες του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet}$ ) στο αρχικό στάδιο εμποδίζοντας έτσι την εμπλοκή τους στο σύστημα των αντιδράσεων Fenton, που είναι μία σημαντική πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Παπαγεωργίου 1999α),



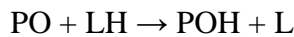
- Εξουδετερώνουν τις λιποϋπεροξειδικές ρίζες ( $LOO^{\bullet}$ ) που σχηματίζονται κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η εξουδετέρωση των  $LOO^{\bullet}$  γίνεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου από μία υδροξυλομάδα της πολυφαινόλης (POH) (Παπαγεωργίου 1999β),



Η ρίζα των πολυφαινολών (PO) που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση είναι σχετικά πιο σταθερή και δεν αντιδρά εύκολα με λιπαρά οξέα αλλά μόνο με ελεύθερες ρίζες,



Έτσι, σχηματίζεται ένα αδρανές προϊόν (LOOP) και τερματίζεται η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η ρίζα PO, όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με ένα λιπαρό οξύ και να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες,



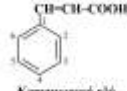


Στην περίπτωση αυτή, οι πολυφαινόλες δείχνουν προ-οξειδωτική δράση. Στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών μπορούμε να προσθέσουμε και την ικανότητα ορισμένων φλαβονοειδών να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με ιόντα μετάλλων, τα οποία προάγουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών με την αντίδραση Fenton.

### 15.1 Φαινολικά οξέα

Γενικά, τα φαινολικά οξέα απαντούν στα σιτηρά, τα όσπρια, το λιναρόσπορο, τα φρούτα, το κρασί, το παρθένο ελαιόλαδο, πολλά βότανα και καρυκεύματα, φύλλα δένδρων και διάφορες άλλες πηγές.

**Πίνακας 2.** Δομή φαινολικών οξέων

Γενική δομή	Υδροξυπαράγωγα	Υποκαταστάτες
 <p>Ποζυϊκό οξύ</p>	Υδροξυβενζοϊκό οξύ Βανιλλικό οξύ Συρινγικό οξύ Πρωτοκατεχικό οξύ Γαλλικό οξύ	4-OH 4-OH, 3-OCH <sub>3</sub> 4-OH, 3,5-OCH <sub>3</sub> 3,4-OH 3,4,5-OH
 <p>Φαινολικά οξέα</p>	<i>Para</i> -υδροξυφαινολοξικό οξύ Ομοβανιλλικό οξύ	4-OH 4-OH, 3-OCH <sub>3</sub>
 <p>Κουμαρικό οξύ</p>	<i>Ortho</i> -κουμαρικό οξύ <i>Para</i> -κουμαρικό οξύ Καφεϊκό οξύ Φερουλικό οξύ Σιναπικό οξύ Χλωρογενικό οξύ Ροσμαρινικό οξύ	2-OH 4-OH 3,4-OH 4-OH, 3-OCH <sub>3</sub> 4-OH, 3,5-OCH <sub>3</sub> Εστέρας του καφεϊκού με κινικό οξύ Διμερές του καφεϊκού οξέος

Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται τα υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού, φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος (Manach et al. 1995). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υδροξυ-παράγωγα του κινναμωμικού οξέος που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτά (Πίνακας 2).

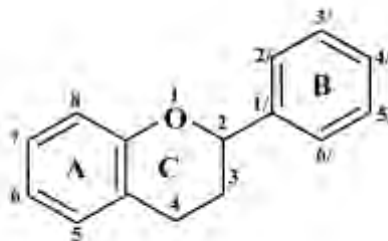
Η δομή των φαινολικών οξέων επιδρά σημαντικά στην αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων. Έτσι, η αντιοξειδωτική τους δράση *in vitro* εξαρτάται από,

- *τις υδροξυλιομάδες.* Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλιομάδων του μορίου τους. Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τις μονοφαινόλες και ότι η εισαγωγή μίας δεύτερης υδροξυλιομάδας σε *ορθο-* ή *παρα-*θέση αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση του φαινολικού οξέος. Έτσι, το πρωτοκατεχικό και το καφεϊκό οξύ, καθώς και οι *ορθο-*διφαινόλες είναι αποτελεσματικότερα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τις αντίστοιχες μονοφαινόλες, δηλαδή το *παρα-*υδροξυβενζοϊκό και το *παρα-*κουμαρικό οξύ. Το γαλλικό οξύ, με τρεις υδροξυλιομάδες, είναι δραστικότερο από το πρωτοκατεχικό οξύ. Ωστόσο, η παρουσία περισσότερων των τριών υδροξυλιομάδων σε έναν αρωματικό πυρήνα δεν βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα.
- *τις μεθοξυομάδες.* Η παρουσία ενός ή δύο μεθοξυομάδων σε *ορθο-*θέση ως προς την υδροξυλιομάδα, αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων. Έτσι, το σιναπικό οξύ εμφανίζεται δραστικότερο από το φερουλικό, το οποίο με τη σειρά του είναι πιο δραστικό από το *παρα-*κουμαρικό οξύ. Για τον ίδιο λόγο, το συριγλικό οξύ είναι αποτελεσματικότερο από το βανιλικό και το *παρα-*υδροξυβενζοϊκό οξύ. Είναι γενικώς αποδεκτό, ότι η *ορθο-*υποκατάσταση με αλκυλο- ή μεθοξυ-ομάδες, οι οποίες δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, σταθεροποιεί την αρυλοξυ-ρίζα και επομένως αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση. Βέβαια, η μεθοξυ-υποκατάσταση δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να θεωρηθεί ισοδύναμη με την προσθήκη υδροξυλιομάδας.
- *την παρουσία διπλού δεσμού.* Η παρουσία της ομάδας  $-CH=CH-COOH$  στο κινναμωμικό οξύ εξασφαλίζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στα υδροξυ-παράγωγά του σε σχέση με την ομάδα  $-COOH$  του βενζοϊκού οξέος. Πράγματι, το καφεϊκό, *παρα-*κουμαρικό, φερουλικό και σιναπικό οξύ είναι δραστικότερα από το *παρα-*υδροξυβενζοϊκό, πρωτοκατεχικό, βανιλικό και συριγλικό οξύ. Το γεγονός αυτό, μπορεί να οφείλεται στο διπλό δεσμό  $C=C$ , ο οποίος σταθεροποιεί τη ρίζα

εξαιτίας συντονισμού.

## 15.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία πολύ μεγάλη ομάδα ενώσεων που βρίσκονται συζευγμένες διαμέσου  $\beta$ -γλυκοσιδικού δεσμού με σάκχαρα σε όλα σχεδόν τα φυτικά τρόφιμα και αρκετά ποτά και ηδύποτα (τσάι, κρασί, κ.λπ), (Scalbert & Williamson 2000). Τα τελευταία χρόνια μελετώνται πολύ εντατικά, επειδή θεωρούνται ότι προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση (Renaud & Lorgeril 1992, Criqui & Ringel 1994, Tijburg et al. 1997) και ορισμένες μορφές καρκίνου (Yang & Wang 1993, Steinmetz & Potter 1996, Adiercreutz & Mazur 1997, Ness & Powles 1997). Οι ενώσεις αυτές είναι φυσικές χρωστικές, ο βασικός δομικός σκελετός των οποίων περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B συνδεδεμένους μεταξύ τους μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρανικού δακτυλίου C διαφορετικού βαθμού οξείδωσης



Εικόνα 5. Δομή φλαβονοειδών

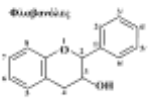
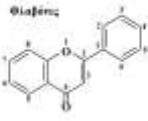
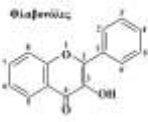
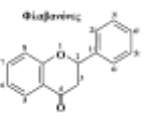
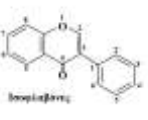
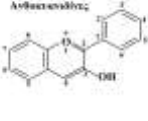
Στα φλαβονοειδή μπορεί να καταταγούν αρκετές υποομάδες ενώσεων όπως οι φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες, που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Πίνακας 3) και περιλαμβάνουν περισσότερα από 5000 μέλη συνολικά (Harbone & Baxter 1993, Harbone & Williams 2000, Havsteen 2002). Στην κατηγορία των φλαβονοειδών μπορεί να καταταγούν, επίσης, και σύνθετες ενώσεις, όπως τα σεκοϊριδοειδή (Ryan et al. 2002a) που κατά άλλους (Jensen et al. 2002, Hofius & Sonnewald 2003) ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών ενώσεων.

**Οι φλαβανόλες** αντιπροσωπεύονται από τις κατεχίνες, που βρίσκονται σε αφθονία στο πράσινο τσάι (*Camellia sinensis*). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του πράσινου τσαγιού, με σκοπό τη μετατροπή του σε μαύρο, οι φλαβανόλες, που είναι σε μονομερή μορφή, οξειδώνονται ενζυμικά σε περισσότερο σύνθετες πολυφαινόλες και ταννίνες (Ding et al. 1992). Έτσι το μαύρο τσάι περιέχει περίπου τη μισή ποσότητα κατεχινών από ό,τι το

πράσινο τσάι. Άλλες πηγές κατεχινών είναι τα κουκούτσια σταφυλιών, το κόκκινο κρασί (Frankel et al. 1995) και η σοκολάτα (Arts et al. 1999).

**Οι φλαβόνες** είναι λιγότερο διαδομένες στη φύση και αντιπροσωπεύονται κυρίως από τη λουτεολίνη και την απιγενίνη. Σημαντικές διατροφικές πηγές αυτών των ενώσεων είναι οι ελιές, ο μαϊντανός, το κόκκινο γλυκό πιπέρι και το σέλινο (Hertog et al. 1992).

**Πίνακας 3.** Δομή φλαβονοειδών (Heim et al. 2002)

Γενική δομή	Φλαβονοειδές	Υποκαταστάτες	Κύρια διατροφική πηγή
	(+)-Κατεχίνη (-)-Επικατεχίνη 3-Γαλλοϋλο-επικατεχίνη	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-γαλλικό	Τσάι Τσάι Κόκκινο κρασί
	Χρυσίνη Απιγενίνη Λουτεολίνη 4',7-διγλυκοσίδιο-λουτεολίνης	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3'-OH, 4' 5,4'-OH, 4',7-γλυκόζη	Φρούτα Σέλινο Κόκκινο πιπέρι Κόκκινο πιπέρι
	Καμφερόλη Κερκετίνη Μυρικετίνη Ταμαριζετίνη	3,5,7,4',-OH 3,5,7,3', 4',-OH 3,5,7,3', 4',5',-OH 3,5,7,3',-OH, 4'-OCH3	Μαύρο τσάι, μπρόκολα Κρεμμύδια, καφές
	Ναρινγενίνη Ναρινγίνη Ταξιφολίνη Εσπεριδίνη	5,7,4'-OH 5,4'-OH, 7-ραμνογλυκόζη 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH	Κίτρα Κίτρα Κίτρα Πορτοκάλια
	Γενιστίνη Γενιστεΐνη Δαϊτζίνη Δαϊτζεΐνη	5,4'-OH, 7-γλυκόζη 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-γλυκόζη 7,4'-OH	Σόγια Σόγια Σόγια Σόγια
	Απιγενιδίνη Κυανιδίνη	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH, 3,5-OCH3	Σκουρόχρωμα φρούτα Κεράσια, φράουλες, βατόμουρα

**Οι φλαβονόλες** αντιπροσωπεύονται κυρίως από την καμφερόλη, την κερκετίνη, τη μυρικετίνη και τη φισετίνη. Η κερκετίνη είναι η κυριότερη φλαβονόλη στη διατροφή του ανθρώπου και βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και ποτά και ιδιαίτερα στα μήλα, το

κόκκινο κρασί, το τσάι, τα κρεμμύδια (Hertog et al. 1992) και τον καφέ (Hertog et al. 1993).

**Οι φλαβονόνες** αντιπροσωπεύονται κυρίως από τη ναρινγενίνη, την ταξιφολίνη και την εσπεριδίνη. Κυριότερη πηγή τους είναι τα εσπεριδοειδή. Η εσπεριδίνη λαμβάνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες με τη διατροφή, γιατί βρίσκεται στα πορτοκάλια που καταναλώνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες (Rousseff et al. 1987).

**Οι ισοφλαβόνες** είναι ενώσεις στις οποίες ο Β δακτύλιος εντοπίζεται στη θέση 3 του C δακτυλίου. Αντιπροσωπεύονται από την νταϊτζεΐνη και γενιστεΐνη. Η κυριότερη πηγή τους είναι η σόγια (Halliwell & Gutteridge, 1990). Για τις ενώσεις αυτές υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή έχουν ιδιότητες οιστρογόνων και επειδή έχει υποστηριχθεί ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και την οστεοπόρωση (Adiercreutz & Mazur 1997, Tapiero et al. 2002).

**Οι ανθοκυανιδίνες** είναι οι κόκκινες χρωστικές των φρούτων, ενώ **οι προανθοκυανιδίνες** αποτελούνται από μονομερή της φλαβονόλης και τα αντίστοιχα ολιγομερή.

Σημειώνεται ότι στις φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, φλαβόνες και ανθοκυανιδίνες, που είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα, το συνδεδεμένο σάκχαρο είναι συνήθως γλυκόζη ή ραμνόζη, αλλά μπορεί επίσης να είναι αραβινόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικό οξύ ή και κάποιο άλλο σάκχαρο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η γλυκοσυλίωση καθιστά τα μόρια περισσότερο υδατοδιαλυτά αλλά λιγότερο αποτελεσματικά έναντι των ελευθέρων ριζών. Άλλα φλαβονοειδή, όπως τα στυλβένια, δεν είναι ευρέως διαδομένα στα φυτικά τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά σε ένα από αυτά, τη ρεσβερατρόλη, που βρίσκεται στο κρασί, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή, επειδή παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες (Jang et al. 1997).

Οι λιγνάνες αναγνωρίζονται ως φυτοοιστρογόνα εξαιτίας της ιδιότητάς τους να ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα. Τα μόνα τρόφιμα που περιέχουν αξιολογες ποσότητες από τις λιγνάνες είναι ο λιναρόσπορος και το λινέλαιο (Axelson et al. 1982). Λιγνάνες με τη μορφή της εντεροδιόλης και εντερολακτόνης βρέθηκαν στο πλάσμα και στα ούρα του ανθρώπου (Steinmetz & Potter 1996).

Σε ό,τι αφορά τα σεκοΐριδοειδή, αυτά θεωρούνται ότι προέρχονται από τα ιριδοειδή, που είναι κυρίως ενώσεις με δέκα άτομα άνθρακα και διαθέτουν δομή κυκλο-πεντανο-τετραϋδρο-πυρανίου. Τα ιριδοειδή όπως και τα σεκοΐριδοειδή είναι συνήθως γλυκοζιτικώς ενωμένες ενώσεις. Τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη δραστηριότητα των σεκοΐριδοειδών είναι μάλλον περιορισμένα. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία απομόνωσής τους καθώς και στην επιδεκτικότητά τους σε οξείδωση.

Συσχετίζοντας τη δομή του μορίου των διαφόρων φλαβονοειδών με την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, προέκυψαν ορισμένα γενικά κριτήρια των σχέσεων δομής-δραστικότητας (Yanishlieva-Maslarova 2001, Frankel 2007). Έτσι, η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από,

- *την παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 3 στο δακτύλιο C.* Το άγλυκο φλαβονοειδές που έχει την 3-OH, όπως ή φισετίνη, η κατεχίνη, η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η μορίνη είναι ισχυροί αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης συγκρινόμενα με εκείνα που στερούνται την 3-OH, όπως η απιγενίνη, η εσπεριδίνη και η ναριγενίνη.
- *την παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα C-2 και C-3 στο δακτύλιο C.* Υδρογόνωση αυτού του δεσμού ελαττώνει την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών.
- *την καρβονυλική ομάδα στον άνθρακα C-4 του δακτυλίου C.* Η ομάδα αυτή βρέθηκε σε ορισμένες μελέτες να είναι απαραίτητη για την αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε άλλες όχι. Έτσι η κερκετίνη, που έχει καρβονυλική ομάδα στον C-4, έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τις κατεχίνες που στερούνται καρβονυλικής ομάδας στον C-4.
- *τον αριθμό των υδροξυλομάδων.* Η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με τον αριθμό των υδροξυλομάδων που βρίσκονται στο δακτύλιο B και ειδικότερα στον C-3'. Έτσι η μυρικετίνη, που έχει τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις C-3', C-4' και C-5' του δακτύλιου B, έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την καμφερόλη, που έχει μόνο μία υδροξυλομάδα στη θέση C-4' του δακτυλίου B.
- *την διευθέτηση των υδροξυλομάδων.* Οι υδροξυλομάδες στις θέσεις C-5 και C-7 του δακτυλίου A, στις θέσεις C-3' και C-4' του δακτυλίου B και στην θέση C-3 του δακτυλίου C εμφανίζονται να συμβάλουν σημαντικά στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα φλαβονοειδή χρειάζονται μία υδροξυλομάδα στη θέση C-2' και την ομάδα της πυρογαλλόλης (υδροξυλομάδα στις θέσεις C-3', C-4', C-5') για αντιυπεροξειδική δράση.
- *την παρουσία γλυκοσυλιωμένων σακχάρων.* Η σύνδεση με σάκχαρα ελαττώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, γιατί στερεί την ικανότητα τους να δώσουν υδρογόνο. Έτσι το άγλυκο μέρος των φλαβονοειδών της κερκετίνης, μυρικετίνης απιγενίνης, ναριγενίνης, εσπεριδίνης είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην αναστολή παραγωγής μηλονικής διαλδεΐδης από τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους.

- τις μεθοξυομάδες. Οι ομάδες αυτές ελαττώνουν επίσης την αντιοξειδωτική ικανότητα για τον ίδιο λόγο με την παραπάνω περίπτωση.
- την καρβονυλομάδα στη θέση C-5 και την υδροξυλιομάδα στη θέση C-3 ή στη θέση C-4. Τα φλαβονοειδή αυτά, όπως η ρουτίνη και η κερκετίνη, μπορούν να σχηματίσουν χηλικές ενώσεις με ιόντα σιδήρου και να συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών με το σύστημα των αντιδράσεων Fenton.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών δικαιολογούν τον θετικό ρόλο αυτών των ενώσεων στη διατροφή του ανθρώπου και την προφύλαξή του από ασθένειες. Τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κόκκινο κρασί βρέθηκε να αναστέλλουν την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών *in vitro* και έτσι υποστηρίχθηκε ότι θα μπορούσαν να ασκήσουν σημαντική καρδιοπροστατευτική δράση και *in vivo*, περιορίζοντας την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε, επιπλέον, από το «Γαλλικό παράδοξο», δηλαδή από το γεγονός ότι σε περιοχή της Γαλλίας όπου επικρατούσαν παράγοντες όπως το κάπνισμα και η διατροφή με λιπαρά, που ευνοούσαν τις καρδιαγγειακές παθήσεις, παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά καρδιακών προσβολών σε ανθρώπους που κατανάλωναν κόκκινο κρασί.

Ταυτόχρονα, όμως, βρέθηκε ότι ορισμένα φλαβονοειδή μπορεί να παρουσιάσουν *in vitro* και προ-οξειδωτική δράση, που οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών και περιπλέκει το θετικό ρόλο αυτών των ενώσεων. Παρατηρήθηκε, μάλιστα, ότι η προ-οξειδωτική αυτή δράση ήταν ανάλογη προς το συνολικό αριθμό των υδροξυλιομάδων (Cao et al. 1997). Έτσι, ενώ μία σειρά από μονο- και δι-υδροξυφλαβονοειδή δεν κατέδειξε σε ένα σύστημα Fenton προ-οξειδωτική δράση, φλαβονοειδή με περισσότερες υδροξυλιομάδες ομάδες, ειδικά, στο Β-δακτύλιο, παρουσίασαν σημαντική προ-οξειδωτική δράση από ρίζες υδροξυλίου (Hanasaki et al. 1994). Σημειώνεται, ότι όσες ενώσεις παρουσίασαν προ-οξειδωτική δράση εμφάνιζαν στον Α-δακτύλιο τη δομή της πυρογαλλόλης. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι η πυρογαλλόλη έχει βρεθεί ότι ευνοεί την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Hodnick 1986) από το οποίο με την αντίδραση Fenton μπορεί να παραχθεί η ιδιαίτερα δραστική ρίζα του υδροξυλίου (Galey 1997). Η προ-οξειδωτική αυτή δράση είναι, ίσως, υπεύθυνη για τις κυτταροτοξικές και προ-αποπτωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών που απομονώνονται από διάφορα φαρμακευτικά βότανα (Ueda et al. 2002, Ismail & Alam 2001). Έχει αναφερθεί ότι φλαβονοειδή με διαμόρφωση της πυρογαλλόλης στον Α- ή Β-δακτύλιο μπορεί να προκαλέσουν μονόκλωνη θραύση του DNA παρουσία δραστικών



μορφών του αζώτου (Ohshima et al. 1998).

Στο σημείο αυτό δεν θα πρέπει να παραληφθεί να επισημανθεί ότι αποτελέσματα πολλών εργασιών υποδεικνύουν ότι δομικές ιδιότητες που βελτιστοποιούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, μπορούν επίσης να βελτιστοποιήσουν και την προ-οξειδωτική τους δράση. Για να μπορέσουμε λοιπόν να οδηγηθούμε σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με την συμπεριφορά αυτών των ενώσεων *in vivo*, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας και τη σταθερότητα της ρίζας των φλαβονοειδών (Zhu et al. 1994). Έτσι, δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που αυξάνουν τη σταθερότητα της ρίζας, αυξάνουν και την αντιοξειδωτική δράση, ενώ, άλλα δομικά χαρακτηριστικά όπως η μεθυλίωση και η γλυκοσυλίωση των υδροξυλιομάδων μειώνουν τη προ-οξειδωτική δράση (Cao et al. 1997). Επομένως, τα δυσμενή προ-οξειδωτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών μπορεί να μετριαστούν *in vivo* από τις ηπατικές μεθυλοτρανσφεράσες που μεθυλιώνουν τα φλαβονοειδή.

Στη διαμόρφωση της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών φαίνεται να παίζει ρόλο και η βιταμίνη C. Υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης C μειώνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται από τα φλαβονοειδή *in vitro* (Bors et al. 1995). Έτσι, η βιταμίνη C θα μπορούσε πιθανόν *in vivo* να τροποποιήσει την προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών. Επειδή λοιπόν τα φλαβονοειδή εκτός από αντιοξειδωτική παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, χρειάζεται μεγάλη προσοχή στη κατανάλωσή τους σε μεγάλες δόσεις.

### 15.3 Ταννίνες

Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερή ή πολυμερή. Οι πολυμερείς ενώσεις ονομάζονται ταννίνες και ανάλογα με τη δομή τους διαχωρίζονται σε συμπυκνωμένες και υδρολυόμενες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι ολιγομερή φλαβονολών όπως της κατεχίνης και της επικατεχίνης και απαντούν σε φρούτα, λαχανικά, κακάο και κόκκινο κρασί, ενώ οι υδρολυόμενες περιέχουν συνήθως γαλλικό οξύ (γαλλοταννίνες) ή ελλαγικό οξύ (ελαγγιταννίνες) εστεροποιημένο με υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη.

## 16. Εκχύλιση των πολυφαινολικών ουσιών των φυτών

Ως εκχύλιση μπορεί να καθοριστεί η παραλαβή των βιοδραστικών ουσιών από τους φυτικούς ιστούς με χρήση επιλεκτικών διαλυτών. Το είδος του υλικού για το οποίο προορίζεται το εκχύλισμα είναι ένα σημαντικό θέμα που πρέπει πάντα να λαμβάνεται

υπόψη. Έτσι, αν το εκχύλισμα προορίζεται για χρήση στα τρόφιμα, οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει,

- να στερούνται τοξικότητας
- να έχουν μεγάλη διαλυτική ικανότητα
- να έχουν μεγάλους συντελεστές κατανομής
- να παρουσιάζουν μεγάλη επιλεκτικότητα για τις πολυφαινόλες
- να ανακτώνται εύκολα από τα εκχυλίσματα
- να είναι αδρανείς και σταθεροί
- να είναι ασφαλείς για το περιβάλλον
- να έχουν μικρό κόστος
- να μην είναι εύφλεκτοι
- να μην εκρήγνυνται

Μετά το πέρας της διαδικασίας της εκχύλισης, το εκχύλισμα απαλλάσσεται από τον διαλύτη με εφαρμογή της κατάλληλης μεθοδολογίας όπως η διήθηση, η εξάτμιση, η λειοφιλοποίηση, η υπερδιήθηση, κ.α. Η επιλογή της μεθόδου ανάκτησης εξαρτάται από το κόστος του διαλύτη. Εάν το κόστος είναι μεγάλο, μπορεί να χρησιμοποιηθούν συστήματα ανάκτησης όπως οι περιστροφικοί εξατμιστές, που επιτρέπουν αποτελεσματική και ανέξοδη ανάκτηση του διαλύτη από το εκχύλισμα. Η διαδικασία της εκχύλισης μπορεί να βελτιστοποιηθεί με κατάλληλη επιλογή της μεθόδου εκχύλισης, του είδους του διαλύτη, το ιξώδες του διαλύτη, τη σχέση του όγκου του διαλύτη προς το βάρος του δείγματος, το μέγεθος των τεμαχιδίων του δείγματος, τη ρύθμιση του pH και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (Moure et al. 2001).

- *Μέθοδος εκχύλισης.* Αν και η κλασική μέθοδος εκχύλισης με διαλύτες είναι ευρύτατα διαδεδομένη, εφαρμόζονται συχνά και άλλες μέθοδοι όπως είναι αυτή της επανειλημμένης διήθησης (percolation), του βρασμού με νερό (decoction), της παρατεταμένης διαβροχής (maceration), της εκχύλισης με βραστό νερό (infusion), της εξαντλητικής εκχύλισης (Soxhlet), της εκχύλισης με μικροκύματα (microwave assisted extraction), της εκχύλισης με υπέρηχους (ultrasound extraction), της εκχύλισης με υγρά στο υπερκρίσιμο σημείο (supercritical fluid extraction), κ.α.
- *Είδος διαλύτη.* Η απόδοση της εκχύλισης καθώς και η βιοδραστητικότητα των εκχυλισμάτων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον διαλύτη, εξαιτίας της διαφορετικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων με διαφορετική πολικότητα

(Moure et al. 2001). Αν και οι απολικοί διαλύτες είναι οι πλέον κατάλληλοι για την εκχύλιση πολυφαινολών από το νερό, η αιθανόλη και το νερό, που είναι πολικοί διαλύτες, είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται ευρύτερα για λόγους τόσο υγιεινής όσο και κόστους για την εκχύλιση πολυφαινολών από τα τρόφιμα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η αιθανόλη αποτελεί κύριο συστατικό των αλκοολούχων ποτών, εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία της στο τελικό προϊόν δεν εγκυμονεί κινδύνους για τον καταναλωτή. Επίσης και το θερμό νερό συνιστά έναν άλλο ασφαλή διαλύτη, αλλά δεν προτιμάται η χρήση του γιατί μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση των ενεργών συστατικών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης (Moure et al. 2001).

- *Ιξώδες διαλύτη.* Οι διαλύτες με μικρότερο ιξώδες παρουσιάζουν την τάση να αυξάνουν την ταχύτητα της εκχύλισης γιατί μπορούν να διέρχονται διαμέσου των τριχοειδών αγγείων των φυτικών ιστών ταχύτερα από άλλους διαλύτες με μεγαλύτερο ιξώδες.
- *Σχέση όγκου διαλύτη προς βάρος δείγματος.* Όσο η σχέση του όγκου του διαλύτη προς το βάρος του δείγματος είναι μεγαλύτερη, τόσο η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο διάλυμα θα είναι χαμηλότερη, έτσι ώστε η μετάβαση των πολυφαινολών από το φυτικό δείγμα προς το διάλυμα να είναι μεγαλύτερη.
- *Μέγεθος τεμαχιδίων δείγματος.* Η μείωση του μεγέθους των τεμαχιδίων του δείγματος με θραύση ή με άλεση επιταχύνει τη διαδικασία εκχύλισης, γιατί αυξάνεται η συνολική επιφάνεια του δείγματος που είναι εκτεθειμένη στη δράση του διαλύτη και, ακόμη, μειώνεται η απόσταση που πρέπει να διανύσει ο διαλύτης για να φθάσει στο εσωτερικό των τεμαχιδίων. Επίσης, η χρήση πηκτινασών και κυτταρινασών με σκοπό τη θραύση των κυττάρων επιταχύνει σημαντικά την εκχύλιση (Moure et al. 2001).
- *Ρύθμιση pH.* Η διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων και των ιοντικών μορφών τους μεταβάλλεται σημαντικά με το pH του διαλύματος. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το pH του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να ρυθμίζεται στην κατάλληλη περιοχή. Έτσι, π.χ. η μέγιστη διαλυτότητα των πολυφαινολών στα απόνερα της βιομηχανίας ελαιολάδου παρατηρήθηκε σε pH 4 (Moure et al. 2001).
- *Θερμοκρασία.* Με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η ταχύτητα εκχύλισης γιατί η θερμότητα ελαττώνει το ιξώδες των διαλυτών ενώ αυξάνει τη διαλυτότητα των ουσιών και τους συντελεστές διάχυσης των πολυφαινολικών ενώσεων. Η αύξηση, όμως, της θερμοκρασίας περιορίζεται, πολλές φορές, από τη φύση των

ουσιών που εκχυλίζονται, αφού η βέλτιστη θερμοκρασία θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από τη θερμοκρασία αποσύνθεσης των πολυφαινολών (Moure et al. 2001).

### 17. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των φυτών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των φυτών μπορεί να διακριθούν σε αυτές που στηρίζονται σε μηχανισμούς μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (Hydrogen atom transfer mechanisms), σε εκείνες που στηρίζονται σε μηχανισμούς μεταφοράς μονήρων ηλεκτρονίων (Single electron transfer mechanisms) και σε άλλες που στηρίζονται και στους δύο αυτούς μηχανισμούς.

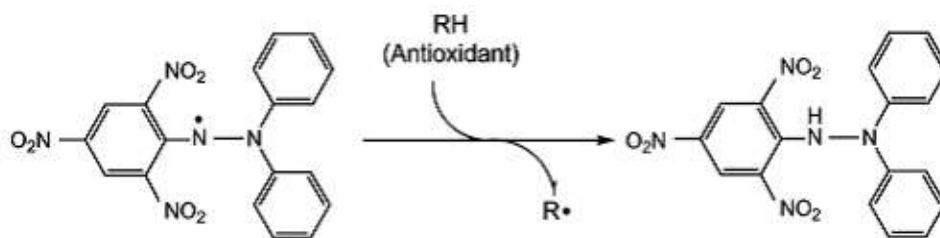
Από τις μεθόδους που στηρίζονται σε μηχανισμούς μεταφοράς ατόμων υδρογόνου, περισσότερο γνωστές είναι η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), η μέθοδος TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), η μέθοδος χημειοφωταύγειας, η μέθοδος φωτοχημειοφωταύγειας, και η μέθοδος οξείδωσης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών.

- Η μέθοδος ORAC στηρίζεται στη μέτρηση της ανάσχεσης που προκαλεί το εκχύλισμα στην οξειδωτική δράση ριζών υπεροξειδίου που παράγονται από την ένωση 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) και προσδιορίζονται από την απώλεια φθορισμού της φθορίζουσας φλουορεσκεΐνης (Ou et al. 2002).
- Η μέθοδος TRAP στηρίζεται στη μέτρηση της ικανότητας του εκχυλίσματος να παρεμποδίζει την αντίδραση των ριζών υπεροξειδίου που παράγονται από AAPH με μια ουσία-δείκτη.
- Η μέθοδος χημειοφωταύγειας στηρίζεται στη μέτρηση της ικανότητας του εκχυλίσματος να παρεμποδίζει την αντίδραση ελευθέρων ριζών με λουμινάλη προς σχηματισμό ουσιών σε διηγευμένη κατάσταση που εκπέμπουν χημειοφωταύγεια.
- Η μέθοδος φωτοχημειοφωταύγειας αποτελεί συνδυασμό της μεθόδου της χημειοφωταύγειας και της φωτοχημικής παραγωγής ριζών του ανιόντος του σουπεροξειδίου του οξυγόνου.
- Η μέθοδος οξείδωσης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών στηρίζεται στην απομόνωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών από φρέσκο αίμα, στην οξείδωσή τους από ιόντα δισθενούς χαλκού ή AAPH, και εκτίμηση της συγκέντρωσης των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων με μέτρηση στα 234 nm των συζευγμένων διενίων ή της τιμής υπεροξειδίων (Prior et al. 2005).

Από τις μεθόδους, πάλι, που στηρίζονται σε μηχανισμούς μεταφοράς μονήρων ηλεκτρονίων, πιο γνωστή είναι η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Η μέθοδος FRAP στηρίζεται στην αναγωγή από το εκχύλισμα του τρισθενούς σε δισθενή σίδηρο σε pH 3,3 και τη φωτομέτρηση του εγχρώμου προϊόντος που σχηματίζεται (Ou et al. 2002). Η μέθοδος αυτή δεν προσφέρεται για δείγματα με έντονο χρωματισμό, εξαιτίας σημαντικών παρενοχλήσεων στη μέτρηση.

Σε ό,τι αφορά τις μεθόδους που στηρίζονται και στους δύο μηχανισμούς, περισσότερο γνωστές είναι η μέθοδος ελευθέρων ριζών ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) και η μέθοδος ελευθέρων ριζών DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl).

- Η μέθοδος ελευθέρων ριζών ABTS στηρίζεται στην ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει το σταθερό κατιόν της ρίζας του ABTS (Miller & Rice-Evans 1997). Σ' αυτήν την μέθοδο, το ABTS οξειδώνεται από ρίζες υπεροξειδίου ή άλλες ρίζες προς το κατιόν της αντίστοιχης ρίζας, το οποίο είναι έντονα χρωματισμένο και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του εκχυλίσματος αποτιμάται από την ικανότητά του να ελαττώνει την ένταση της χρώσης, αντιδρώντας άμεσα με το κατιόν της ρίζας ABTS (Prior et al. 2005).
- Η μέθοδος ελευθέρων ριζών DPPH στηρίζεται στην εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας του εκχυλίσματος έναντι της ρίζας DPPH με μέτρηση της μείωσης της απορρόφησής της στα 515 nm (Brand-Williams et al. 1995). Η ρίζα αυτή ανευρίσκεται στο εμπόριο και, έτσι, δεν είναι ανάγκη να παραχθεί πριν από τη μέτρηση όπως συμβαίνει με τη ρίζα ABTS (Prior et al. 2005).



**Εικόνα 6.** Αντίδραση DPPH• - αντιοξειδωτικού και σχηματισμός DPPH-H (Moon & Shibamoto 2009).

Μεταξύ των παραπάνω μεθόδων, περισσότερο δημοφιλείς είναι οι μέθοδοι ABTS και DPPH (Davalos et al. 2004, Mathew & Abraham 2006). Αυτές οι μέθοδοι δίνουν τα πιο γρήγορα αποτελέσματα χωρίς να απαιτούν μεγάλου κόστους εξοπλισμό. Η μέθοδος ABTS παρουσιάζει το επιπλέον πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη περιοχή

τιμών pH και, επομένως, είναι πιο ελκυστική για μέτρηση δειγμάτων που βρίσκονται σε διαφορετικά pH (Lemanska et al. 2001). Επίσης, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές, γιατί το ABTS είναι διαλυτό όχι μόνο σε υδρόφιλους αλλά και υδρόφοβους διαλύτες. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι η ρίζα ABTS δεν ανευρίσκεται στο εμπόριο και, έτσι, είναι ανάγκη να παράγεται πριν από τη μέτρηση, ενώ είναι και πολύ ευαίσθητη στη θερμότητα και το φως (Miller & Rice-Evans 1997).

Σε αντίθεση με τη μέθοδο ABTS, η μέθοδος DPPH είναι ευαίσθητη στο pH και, σχετικά, χρονοβόρα (Brand-Williams et al. 1995). Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όταν τα δείγματα είναι έντονα χρωματισμένα από χρωστικές όπως οι ανθοκυανίνες (Agnao et al. 1999). Και αυτό γιατί η μέγιστη απορρόφηση των ανθοκυανινών που είναι στα 475-485 nm βρίσκεται πολύ κοντά στο μήκος κύματος (515 nm) της απορρόφησης του DPPH. Παρόλα αυτά, η μέθοδος DPPH είναι ελκυστική, γιατί είναι απλή, χαμηλού κόστους και παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός ότι μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων εμφανίζεται, πολλές φορές, μεγάλη διασπορά αποτελεσμάτων για το ίδιο προϊόν. Η διασπορά αυτή αποδόθηκε, κυρίως, στο γεγονός ότι οι διάφοροι ερευνητές χρησιμοποιούν μεθόδους που στηρίζονται σε μέτρηση διαφορετικών ιδιοτήτων των αντιοξειδωτικών. Ένας άλλος λόγος γι' αυτήν την διασπορά των τιμών είναι η ασυμφωνία των ερευνητών σε ό,τι αφορά τις μονάδες έκφρασης των αποτελεσμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα μίγματα διαφόρων συστατικών, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι είναι αδύνατον να εκφραστεί η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση τα αποτελέσματα από την εφαρμογή μιας μόνο μεθόδου που μετρά ένα μόνο αντιοξειδωτικό. Σημειώνεται ότι η ιδανική μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν έχει μέχρι σήμερα διαμορφωθεί και ότι όλες οι διαθέσιμες μέθοδοι παρουσιάζουν τα δικά τους μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα. Επομένως, για αξιόπιστες μετρήσεις, θα πρέπει κανείς όχι μόνο να λαμβάνει υπόψη τις παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, αλλά να εφαρμόζει, επιπλέον, τουλάχιστον δύο μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης (Yoo et al. 2007).

## **18. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών**

Είναι γνωστό, ότι η βιολογική δράση των πολυφαινολών εξαρτάται από τη

βιοδιαθεσιμότητά τους η οποία, με τη σειρά της, επηρεάζεται από παράγοντες όπως η χημική δομή, η σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες, υδατάνθρακες ή οξέα, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητά τους (Χίου 2003).

Η χημική δομή των πολυφαινολών προσδιορίζει το βαθμό της απορρόφησης τους από το έντερο καθώς και τη φύση των μεταβολιτών τους στο πλάσμα. Ο βαθμός απορρόφησης είναι χαμηλός για την κερκετίνη και τη ρουτίνη και υψηλός για την κατεχίνη του πράσινου τσαγιού, τις ισοφλαβόνες της σόγιας, τις φλαβόνες των εσπεριδοειδών και τις ανθοκυανίνες του κόκκινου κρασιού. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή που απορροφώνται από το λεπτό έντερο, η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλή, αφού ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι περίπου 1-2 ώρες. Όμως, ο χρόνος ημίσειας ζωής της κερκετίνης είναι πολύ μεγαλύτερος και φθάνει τις 24 ώρες, πιθανώς εξαιτίας της τάσης σύνδεσής της με την αλβουμίνη του πλάσματος (Manach et al. 1995, Hollman et al. 1997, Dangles et al. 200).

Επίσης, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες απαντούν συχνά σε μορφή γλυκοζιτών με υδατάνθρακες που είναι συνήθως γλυκόζη ή ραμνόζη, αλλά μπορεί να είναι και γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικό οξύ, κλπ. Ο αριθμός των υδατανθράκων είναι συνήθως ένα, δύο ή τρία μόρια σε διάφορες θέσεις υποκατάστασεως των πολυφαινολών. Ο σχηματισμός των γλυκοζιτών αυτών επηρεάζει τις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών (Tapiero et al. 2002).

Ακόμη, φλαβονοειδή όπως η επικατεχίνη ανευρίσκονται συχνά ακυλιωμένα, κυρίως, με γαλλικό οξύ. Βέβαια, η ακυλίωση δεν επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών σε τόσο μεγάλο βαθμό όπως η σύζευξη με υδατάνθρακες. Φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή διέρχονται από τις βιολογικές μεμβράνες και απορροφώνται χωρίς να προηγηθεί υδρόλυση ή διάσπαση του μορίου τους (Nakagawa et al. 1997).

Επίσης, υδροκιναμμομικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ, απαντούν συνήθως εστεροποιημένα με υδατάνθρακες, οργανικά οξέα και λιπίδια. Ενδεικτικά αναφέρεται το χλωρογενικό οξύ, μια ουσία που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στον καφέ και αποτελεί εστέρα του καφεϊκού οξέος (Clifford 1999). Η μόνη οδός μεταβολισμού του χλωρογενικού οξέος είναι η μικροχλωρίδα του εντέρου αφού ο οργανισμός του ανθρώπου στερείται εστερασών ικανών να απελευθερώσουν το καφεϊκό από το χλωρογενικό οξύ (Kroon et al. 1996, Plumb et al. 1999).

Δεν πρέπει ακόμη να παραληφθεί να αναφερθεί το γεγονός, ότι οι πολυφαινόλες που απορροφώνται μεταβολίζονται στο ήπαρ, απεκκρίνονται στη χολή και φτάνουν στο κόλον σε διαφορετική χημική μορφή από την αρχική, ενώ οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται

στο στομάχι ή το λεπτό έντερο και μεταφέρονται στο κόλον, δεν αλλάζουν χημική δομή. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί το κόλον έχει σημαντική μικροχλωρίδα η οποία έχει πιθανές καταλυτικές και υδρολυτικές ιδιότητες διάσπασης των πολυφαινολών σε απλούστερες ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα (Tapiero et al. 2002).

### 19. Η σημασία των πολυφαινολών στην υγεία του ανθρώπου

Μολονότι ο οργανισμός μπορεί να ανταπεξέλθει στην παρουσία των ελευθέρων ριζών, υπερφόρτωση του οργανισμού με ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η ηπατική νόσος και κάποια είδη καρκίνου. Και αυτό γιατί το αρχικό στάδιο δημιουργίας ελευθέρων ριζών εξελίσσεται σε μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα.

Συχνά, τα ενδογενή ενζυμικά ή μη ενζυμικά συστήματα του οργανισμού είναι ανεπαρκή για τη διατήρηση της απαραίτητης ισορροπίας στη δράση των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Αυτή η ισορροπία που θεωρείται απαραίτητη για την εξασφάλιση και διατήρηση της υγείας του ανθρώπου και την πρόληψη εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων (Frankel 2007) μπορεί να διασφαλιστεί με την πρόσληψη φαινολικών αντιοξειδωτικών, τα οποία εκτός από τον ρόλο τους να προστατεύουν τα τρόφιμα από τις βλαβερές συνέπειες της αυτοοξειδωσίας και της φωτοευαισθητοποιημένης οξειδωσίας, έχουν τη δυνατότητα να δρουν και ως ενισχυτές της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας (Frankel 2007). Επομένως, ο υπερβολικός σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να απαιτεί υψηλή διαιτητική πρόσληψη τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες και πολυφαινολικές ενώσεις (Owen et al. 2000).

Στο σημείο αυτό αξίζει ίσως να επισημανθεί ότι τα αντιοξειδωτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις χαρακτηρίζονται πολλές φορές από προ-οξειδωτική δράση κατά την οποία επιταχύνεται η καταστροφή σημαντικών βιολογικών μορίων όπως το DNA, οι υδρογονάνθρακες και οι πρωτεΐνες. Ωστόσο, η *in vitro* προ-οξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών διαφέρει από την *in vivo* δραστηριότητα. Έτσι, ενώ στις *in vitro* διαδικασίες έχει αποδειχθεί η προ-οξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, η προ-οξειδωτική δραστηριότητα είναι σχεδόν αμελητέα στις *in vivo* διαδικασίες (Noguchi & Niki 1999).

Αποτελέσματα πολλών μελετών υποστηρίζουν την ευεργετική δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών έναντι των βλαβερών συνεπειών της οξειδωτικής καταπόνησης *in vivo*. Είναι γνωστό, ότι η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών, ως συνέπεια της οξειδωτικής



καταπόνησης, μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια των κυττάρων όπως DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, κ.ά, καθώς και σε οργανίδια όπως μεμβράνες και μιτοχόνδρια, οδηγώντας σε συσσώρευση βλαβών, πρόκληση παθολογικών καταστάσεων και θάνατο των κυττάρων. Η αξία των αντιοξειδωτικών έγκειται στην ικανότητά τους να προλαμβάνουν και να αντιμετωπίζουν την οξειδωτική καταπόνηση που εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις όπως αθηροσκλήρωση, διαβήτης, ασθένειες των πνευμόνων και του ήπατος, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Alzheimer, Parkinson, ιογενείς ασθένειες, καρκινογένεσεις, καταρράκτης, γήρανση, κ.ά. (Johnson 2001, Visioli 2006, Frankel 2007).

Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών, κυρίως όσων έχουν *ορθο*-διφαινολική κατεχολική σύνταξη στο μόριό τους, αποδίδεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή να διακόπτουν τις αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών εκδηλώνεται με προστασία των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας από την οξείδωση και, κατά συνέπεια, τη μείωση της αποτιθέμενης χοληστερόλης στους ιστούς, αλλά και με δράση έναντι των οξειδωτικών παραγόντων του επιθηλιακού ιστού, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας (Χίου 2003). *In vivo* μελέτες (Wiseman et al. 1996) έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από το παρθένο ελαιόλαδο εμποδίζουν αποτελεσματικά την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και αυξάνουν την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου το οποίο, επίσης, εμποδίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, μια διαδικασία η οποία σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρωση (Anirnam 1996). Τα πειραματικά αυτά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες που προέρχονται από το ελαιόλαδο ωφελούν το καρδιακό σύστημα του ανθρώπου (Visioli & Galli 1998). Επιπλέον, τα φλαβονοειδή έχουν αντιθρομβωτικό και αγγειοπροστατευτικό ρόλο (Χίου 2003).

Ακόμη είναι γενικά αποδεκτό ότι κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και της ανάπτυξης πολλών μορφών καρκίνου, λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές διεργασίες που έχουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση. Αυτές οι διεργασίες σχετίζονται με την παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου όπως των ριζών του υδροξυλίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι οποίες ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μπορεί να επηρεάζουν τους μηχανισμούς της απόπτωσής τους. Αντιοξειδωτικά, όπως οι πολυφαινόλες, μπορεί να έχουν ίσως την ικανότητα να ανταγωνιστούν καθοριστικούς παράγοντες της καρκινογένεσης. Και αυτό γιατί οι ενδείξεις ότι η πρόσληψη των αντιοξειδωτικών μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε καλοήθεις αλλά και κακοήθεις όγκους που έχουν ήδη δημιουργηθεί

διαρκώς αυξάνονται (Lin et al. 1996, Katiyar et al. 1997, Lu et al. 1997).

Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις ασκούν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση. Η αντιφλεγμονώδης δράση των φαινολών και ιδιαίτερα της υδροξυτυροσόλης και της ελαιοευρωπαϊνης, έχει διερευνηθεί από τους Visioli et al. (1998). Οι ερευνητές αυτοί ανέφεραν ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να δράσει κατά των μεταβολικών προϊόντων που προέρχονται από τις οξειδωτικές βλάβες των κυττάρων εξαιτίας της δράσης των δραστικών μορφών οξυγόνου. Επομένως συμπεραίνεται ότι το ελαιόλαδο, εξαιτίας της υδροξυτυροσόλης που περιέχει, θα μπορούσε να έχει προστατευτική επίδραση έναντι ασθενειών που χαρακτηρίζονται από μεταβολές της διαπερατότητας του επιθηλίου, όπως είναι οι φλεγμονώδεις γαστρεντερικές ασθένειες (Manna et al. 1997).

Ακόμη φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες έχουν και αντιαλλεργικές ιδιότητες παρεμποδίζοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι Pieroni et al. (1997) ανέφεραν ότι η υδροξυτυροσόλη εμποδίζει το σχηματισμό του λευκοτριενίου B<sub>4</sub> και τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση. Εκτός από την υδροξυτυροσόλη, η ελαιοευρωπαϊνή, το καφεϊκό οξύ και η τυροσόλη εμποδίζουν επίσης τον σχηματισμό του λευκοτριενίου B<sub>4</sub> μειώνοντας τη δραστηριότητα του καταλυτικού ενζύμου 5-λιποξυγενάση (De la Puerta et al. 1999). Ακόμη, με τις πολυφαινόλες αυτές εμποδίζεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ο σχηματισμός της θρομβοξάνης B<sub>2</sub> από διηγεργμένα αιμοπετάλια και η συσσώρευση του 12-υδροξυ-εικοσιτετρανοϊκού οξέος και της θρομβοξάνης B<sub>2</sub> στο πλάσμα (Pieroni et al. 1995).

## B. ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

### 20. Η Ελιά

#### 20.1 Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς

Η καταγωγή της ελιάς χάνεται στα βάθη των αιώνων. Η ιστορία της ελιάς αρχίζει πριν από την επινόηση της γραφής, στα προϊστορικά χρόνια. Από έρευνες που έγιναν στα ανθρακοφόρα στρώματα της Κύμης της Ευβοίας βρέθηκαν φύλλα ελιάς που αποδεικνύουν ότι η ελιά φύτευε πριν την εμφάνιση του ανθρώπου. Επίσης, απολιθωμένα φύλλα ελιάς βρέθηκαν στη Σαντορίνη και Νίσυρο, ηλικίας περίπου 50.000-60.000 ετών (Ποντίκης 2000).

Παρά τα ευρήματα αυτά, πολλοί ιστορικοί συγγραφείς θεωρούν ως πιθανότερο τόπο καταγωγής της ελιάς την περιοχή της Συρίας και της Μικράς Ασίας, ενώ υποστηρίζουν ότι οι πρώτοι καλλιεργητές ελιάς ήταν οι Φοίνικες. Από τη Συρία διαδόθηκε στην νησιωτική Ελλάδα ενώ από τους Φωκαείς στην Ηπειρωτική Ελλάδα, την Ιταλία και μετέπειτα στην Ισπανία. Ωστόσο αγριελιές απαντούν σε όλα τα παράλια της Μεσογείου, από την Ισπανία μέχρι την Αίγυπτο. Η ελιά από την Αίγυπτο, όπου καλλιεργήθηκε συστηματικά από τους Σημιτικούς λαούς, διαδόθηκε στην Κύπρο και σε άλλα μέρη της Βόρειας Αφρικής. Οι Μινωίτες, εξαιρετικοί θαλασσοπόροι και έμποροι, διέδωσαν την καλλιέργεια του ελαιόδεντρου στα δυτικά παράλια της Μεσογείου. Σ' αυτό βοήθησαν και οι κλιματικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν μόνο τις χώρες της μεσογειακής λεκάνης που έχουν τις απαραίτητες συνθήκες για την ανάπτυξη σε τόσο σημαντικό βαθμό, της καλλιέργειας του ελαιόδεντρου. Ευρήματα από περιοχές της Ιταλίας, της βόρειας Αφρικής, της Ισπανίας, της Μικράς Ασίας και της Ελλάδος μαρτυρούν την ύπαρξη και καλλιέργειά της στη λεκάνη της Μεσογείου από την αρχαιότητα (Boskou 2006b, Therios 2009).

Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται από τους προϊστορικούς χρόνους, όπως αποδεικνύεται από τα ευρήματα ανασκαφών στις Μυκήνες, στη Θήρα, και στην Κνωσό. Σύμφωνα με τα αρχαία κείμενα, η Δήλος, η Εύβοια, η Σάμος και η Λέσβος ήταν τόποι καλλιέργειας, ενώ τα Ιόνια νησιά αναφέρονται ως περιοχές καλλιέργειας από τους ομηρικούς χρόνους. Οι αρχαίοι Έλληνες απέδιδαν ιδιαίτερη σημασία στην καλλιέργεια της ελιάς. Κατά την ελληνική μυθολογία, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα, στην οποία την προσέφερε η θεά Αθηνά μαζί με το όνομα της και την προστασία της, υπερνικώντας τον Ποσειδώνα που πρόσφερε το θαλασσίνο νερό.

Στην αρχαία Ελλάδα, η ελιά θεωρείτο ιερό δένδρο. Ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι όποιος έκοβε ήμερη ελιά ετιμωρείτο με θάνατο. Οι νόμοι του Σόλωνα καθόριζαν την απόσταση φύτευσης της ελιάς και απαγόρευαν το ξερίζωμα περισσότερων από δύο δένδρων ανά έτος για κάθε ιδιοκτήτη (Μπαλατσούρας 1994). Σε αρχαία ελληνικά συγγράμματα σημειώνονται, μάλιστα, και οι θεραπευτικές ιδιότητες της ελιάς και των προϊόντων της (Κυριτσάκης 2007, Therios 2009). Προσωπικότητες της αρχαίας Ελλάδος όπως ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ.) που θεωρείται πατέρας της ιατρικής και ο Διοσκουρίδης (40-80 μ.Χ.), αναφέρουν την ελιά ως φυτό με θεραπευτικές ιδιότητες. Επίσης και οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν την ελιά ως φάρμακο και για την ταρίχευση των νεκρών.

Η ελιά δεν υπήρχε σε περιοχές του Νέου Κόσμου με κλίμα παρόμοιο με το Μεσογειακό (π.χ. Καλιφόρνια). Ιταλοί, Ισπανοί, Πορτογάλοι και κυρίως οι Φραντζίσκοι ιεραπόστολοι, μετέφεραν την ελιά στο San Diego της Ν. Καλιφόρνιας και τις άλλες υποτροπικές περιοχές του δυτικού ημισφαιρίου με μεσογειακό κλίμα και έτσι άρχισε η πρώτη εγκατάσταση του ελαιόδένδρου στις νέες χώρες (Μπαλατσούρας 1999).

Σήμερα, η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί την πιο εκτεταμένη καλλιέργεια στη χώρα και η Ελλάδα είναι η χώρα με την υψηλότερη κατ' άτομο κατανάλωση ελαιολάδου στον κόσμο. Ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τρόπο διάδοσης της ελιάς στην αρχαιότητα, είναι γεγονός ότι η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε σε μεγάλη έκταση στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο και αυτός είναι ίσως ο λόγος της σημερινής της ονομασίας «Ελιά η Ευρωπαϊκή (*Olea Europea*). Ειδικότερα στη λεκάνη της Μεσογείου, το ελαιόλαδο και η επιτραπέζια ελιά, αποτελούν βασικά γεωργικά προϊόντα μέχρι και σήμερα και βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος καθώς αποτελούν πλούσιες πηγές πολυφαινολικών ουσιών με βιολογική δράση (Visioli et al. 2006).

## 20.2 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea* L.) ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας *Oleaceae* η οποία περιλαμβάνει 24 γένη και περίπου 600 είδη, υποείδη και ποικιλίες. Η οικογένεια *Oleaceae* είναι σημαντική από άποψη περιεχομένου σε πολυφαινολικές ουσίες, καθώς σε αρκετά γένη της οικογένειας αυτής συμπεριλαμβανομένων των *Chionanthus*, *Forestiera*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Nestegis*, *Olea*, *Osmanthus*, *Phillyrea* και *Syringa*, έχουν βρεθεί φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή με τεκμηριωμένη βιολογική δράση (Nenadis & Tsimidou 2009).

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει περίπου 30 είδη, υποείδη και ποικιλίες, από τα οποία μόνο

το είδος *Olea europaea* παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον. Το είδος απαντάται στη μορφή της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea* var. *sativa*), η οποία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών με ποικίλα χαρακτηριστικά (Πίνακας 4), καθώς και στη μορφή της αγριελιάς (*Olea europaea* var. *oleaster*). Το γένος *Olea* έχει ως κύρια χαρακτηριστικά του, τη μακροζωία και τη διατήρηση της παραγωγικότητας.

Το ελαιόδεντρο είναι δέντρο αιθαλές και ευδοκίμει σε ξηροθερμικές περιοχές. Είναι ένα από τα λιγιστά δέντρα που ακόμη και σε πετρώδη και άγονα εδάφη, μπορεί να παράγει καρπό. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων ποικιλιών της *Olea europaea* var. *europaea*, κοινώς ελιάς, στη λεκάνη της Μεσογείου.

**Πίνακας 4.** Βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων ποικιλιών της ελιάς (*Olea europaea* L.) στη λεκάνη της Μεσογείου (Πηγή:<http://fruits&nuts.ucdavis.edu/crops/olive.shtml>)

Ποικιλία	Περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο (%)	Ανθεκτικότητα σε ψύχος	Μέγεθος καρπού	Επίπεδο πολυφαινόλων
Aglandau	23-27	Ανθεκτική	Μέσο	Μέσο
Arbequina	22-27	Ανθεκτική	Μικρό	Χαμηλό
Arbosana	22-27	Ανθεκτική	Μικρό	Μέσο
Barnea	16-26	-	Μέσο	Μέσο
Bosana	18-28	-	Μέσο	Υψηλό
Chemlali	26-28	-	Πολύ μικρό	Υψηλό
Coratina	23-27	Ανθεκτική	Μέσο	Πολύ υψηλό
Cornicabra	23-27	Ανθεκτική	Μέσο	Πολύ υψηλό
Empeltre	18-25	Ευαίσθητη	Μέσο	Μέση
Frantoio	23-26	Ευαίσθητη	Μέσο	Μέσο-Υψηλό
Hojiblanca	18-26	Ανθεκτική	Πολύ μεγάλο	Μέσο
Κορωνέικη	24-28	Ευαίσθητη	Πολύ μικρό	Πολύ υψηλό
Lechin Sevilla	22-23	-	Μέσο	Μέσο
Leccino	22-27	Ανθεκτική	Μέσο	Μέσο
Manzanillo	15-26	Ευαίσθητη	Πολύ μεγάλο	Υψηλό
Moraiolo	18-28	Ευαίσθητη	Μικρό	Πολύ υψηλό
Picudo	22-24	Ανθεκτική	Πολύ Μεγάλο	Χαμηλό
Picual	24-27	Ανθεκτική	Μέσο	Πολύ υψηλό
Picholine	22-25	Μέτρια	Μέσο	Υψηλό
P. Marocaine	22-25	Ανθεκτική	Μέσο	Υψηλό
Taggiasca	22-27	Ευαίσθητη	Μέσο	Χαμηλό
Verdial Huevar	24-26	Ανθεκτική	Μέσο	Υψηλό

Σε ό,τι αφορά τις ποικιλίες της καλλιεργούμενης ελιάς στην Ελλάδα, αυτές είναι σχετικά πολλές, με γνωστότερες τις ποικιλίες Αδραμυτινή, Αμφίσσης, Βασιλικάδα, Θρουμπολιά,

Καλαμών, Καρυδολιά, Κοθρέϊκη, Κορωνέϊκη, Λιανολιά Κέρκυρας, Μαυρελιά, Μεγαρείτικη, Τσουνάτη και Χονδροελιά Χαλκιδικής. Οι ελιές αυτές διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με την χρήση των καρπών τους. Οι επιτραπέζιες ή βρώσιμες ελιές όπως η Καλαμών, Βασιλικάδα και Καρυδολιά, παράγουν καρπό για επιτραπέζια κατανάλωση, οι ελαιοποιήσιμες ελιές όπως η Κορωνέϊκη, Λιανολιά Κέρκυρας και Μαυρελιά παράγουν καρπό για παραγωγή ελαιολάδου, ενώ οι ποικιλίες διπλής χρήσεως όπως η Θρουμπολιά και η Μεγαρείτικη, παράγουν καρπό και για τους δύο σκοπούς (Πίνακας 5).

### 20.3 Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς

Η καλλιέργεια της ελιάς καλύπτει παγκοσμίως έκταση περίπου 100 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ενώ ο αριθμός των ελαιοδένδρων ανέρχεται σε 800 εκατομμύρια (Fern&ez–Escobar et al. 1999). Στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου παράγεται περίπου το 98% της παγκόσμιας παραγωγής ελιάς, που ανέρχεται σε περίπου 11 εκατομμύρια τόνους (Delgado-Pertinez 2000).

**Πίνακας 5.** Η παραγωγή ελαιοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα τα έτη 2001-2003

Έτος παραγωγής	Ελιές Βρώσιμες (Τόνοι)	Ελιές Ελαιοποιήσιμες (Τόνοι)
2001	234000	2015000
2002	236000	2338000
2003	190000	1861000

(Πηγή:[http://www.statistics.gr/Deltia\\_menu.asp](http://www.statistics.gr/Deltia_menu.asp))

Σύμφωνα με στοιχεία για το έτος 1998, στην Ελλάδα καλλιεργήθηκαν 7,5 εκατ. στρέμματα σε όλα σχεδόν τα γεωγραφικά διαμερίσματα (Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδος 2002). Οι νομοί με το μεγαλύτερο αριθμό ελαιοδένδρων παρουσιάζονται στο Πίνακα 6 (Ποντίκης 2000). Η Ελλάδα αποτελεί την τρίτη ελαιοπαραγωγό χώρα παγκοσμίως, με περίπου 140 εκατομμύρια ελαιόδενδρα, και μέση παραγωγή περίπου 350–400 χιλιάδες τόνους ελαιολάδου (Πίνακες 6 και 7).

Οι παράμετροι που οριοθετούν τις περιοχές αποδοτικής καλλιέργειας της ελιάς είναι, κυρίως, η θερμοκρασία, η βροχόπτωση, η σχετική υγρασία, καθώς και οι μηχανικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους. Επιπλέον παράγοντες όπως οι οικονομικές συνιστώσες, οι μέθοδοι καλλιέργειας, οι διατροφικές συνήθειες και οι παραδόσεις, καθορίζουν σε μεγάλο

βαθμό τη διάδοση της καλλιέργειας.

**Πίνακας 6.** Οι Νομοί στην Ελλάδα με τον μεγαλύτερο αριθμό ελαιοδένδρων

A/A	Νομοί	Αριθμός ελαιοδένδρων
1	Μεσσηνίας	13.545.000
2	Ηρακλείου	13.378.000
3	Λακωνίας	10.936.000
4	Λέσβου	10.567.000
5	Χανίων	7.321.000
6	Ηλείας	6.914.000
7	Φθιώτιδας	6.382.000
8	Ευβοίας	5.530.000
9	Μαγνησίας	5.106.000
10	Αιτωλοακαρνανίας	4.627.000
11	Κέρκυρας	3.718.000
12	Αχαΐας	3.338.000

**Πίνακας 7.** Η εξέλιξη της καλλιέργειας της ελαιοποιήσιμης ελιάς στην Ελλάδα

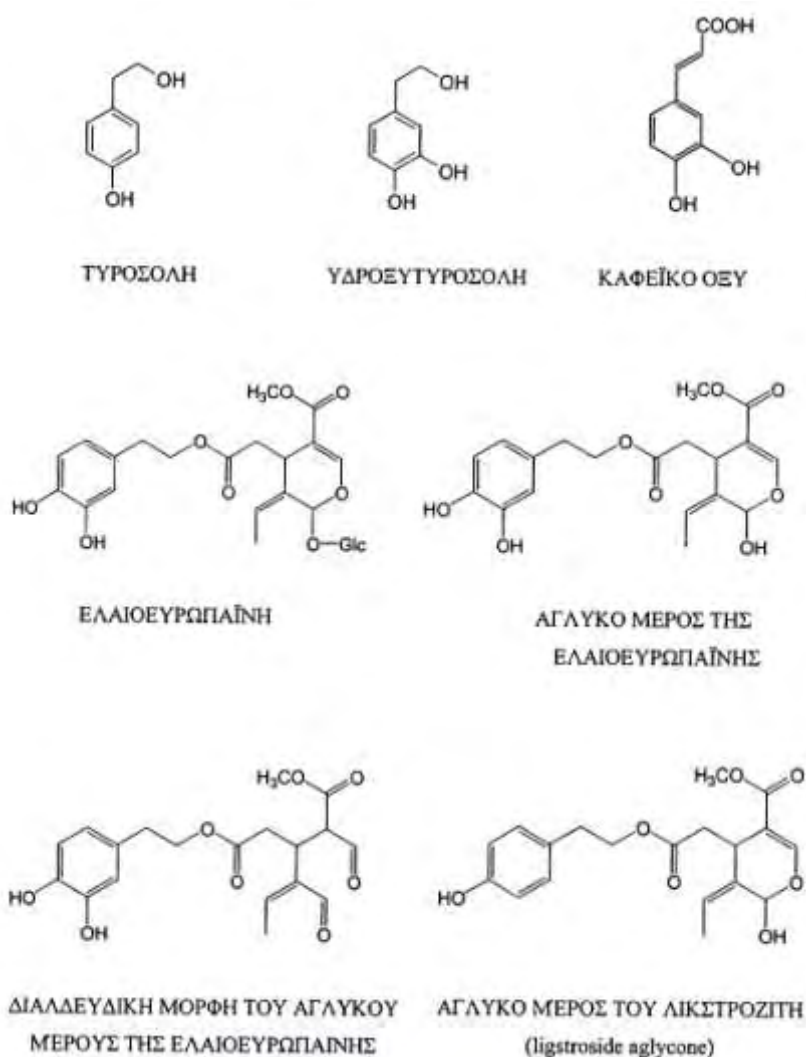
Έτος	Αριθμός δένδρων	Ελαιόλαδο (Τόνοι)	Έτος	Αριθμός δένδρων	Ελαιόλαδο (Τόνοι)
1967	79.261.400	185.000	1984	102.822.284	202.237
1968	81.079.000	153.635	1985	103.023.129	344.130
1969	83.946.700	155.626	1986	103.450.000	220.000
1970	85.708.340	197.700	1987	103.802.055	298.000
1971	86.679.600	183.000	1988	103.982.735	313.800
1972	87.100.000	249.400	1989	103.951.621	319.778
1973	87.929.900	192.400	1990	104.291.779	167.367
1974	88.300.000	237.000	1991	104.950.000	364.100
1975	88.734.780	257.000	1992	105.760.046	303.500
1976	90.037.000	225.000	1993	106.248.762	268.000
1977	91.660.000	231.000	1994	110.772.737	357.785
1978	93.268.833	235.000	1995	114.003.029	407.450
1979	95.685.699	203.000	1996	117.905.650	454.640
1980	97.659.501	330.000	1997	121.182.101	453.000
1981	99.051.452	230.000	1998	122.481.028	466.000
1982	100.443.403	324.470	1999	130.769.382	413.000
1983	100.574.277	222.445	2000	129.053.238	430.000

(Πηγή: [http://www.minagric.gr/greek/agro\\_pol/ladi.htm](http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/ladi.htm))

Το μεσογειακό οικοσύστημα συγκεντρώνει όλους εκείνους του παράγοντες οι οποίοι διαμορφώνουν τις καλύτερες προϋποθέσεις για την επιτυχημένη καλλιέργεια, η οποία

εκτείνεται και σε υψόμετρα έως 1000 μέτρα με την επιλογή των κατάλληλων ποικιλιών. Το ελαιόλαδο κατέχει ξεχωριστή θέση στα βρώσιμα έλαια, γιατί είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο στην ανθρώπινη υγεία, παρουσιάζει φυσική σταθερότητα απέναντι στην αυτοοξειδωση και, επιπλέον, εμφανίζει ξεχωριστή γεύση (Ryan et al. 1998).

Η ποιότητα του ελαιολάδου εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραμέτρων όπως η καλλιεργούμενη ποικιλία, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες καλλιέργειας, ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού, η διαδικασία σύνθλιψης του καρπού για την εξαγωγή του ελαιολάδου, και τέλος η διάρκεια και ο τρόπος αποθήκευσης τόσο του καρπού όσο και του ελαιολάδου (Mousa & Gerasopoulos 1996, Price & Rhodes 1997, Caruso et al. 2000).



**Εικόνα 7.** Οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου

Στη σύσταση του ελαιολάδου περιλαμβάνονται λιπαρά οξέα με κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ, απλές φαινόλες με κυρίαρχες την τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, φαινολικά οξέα,



φλαβονοειδή, ελεύθερες ή εστεροποιημένες στερόλες, τοκοφερόλες και σεκοϊριδοειδή όπως η ελαιοευρωπαϊνή (Ryan et al. 1998, Brenes et al. 1999, Soler–Rivas et al. 2000, Botía et al. 2001). Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου.

Η ελαιοευρωπαϊνή είναι μια πολυφαινόλη που ανευρίσκεται σε σημαντικό ποσοστό στον άγουρο καρπό. Είναι το συστατικό του καρπού, στο οποίο οφείλεται η πικρή του γεύση. Καθώς ο καρπός ωριμάζει, η περιεκτικότητά του σε ελαιοευρωπαϊνή μειώνεται ή ελαχιστοποιείται, και πολλές φορές εκμηδενίζεται. Στα προϊόντα οξείδωσης της ελευρωπαϊνής οφείλεται και το μαύρο χρώμα του ελαιοκάρπου. Ακόμη απαντούν δύο κατηγορίες χρωστικών, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Στα καροτενοειδή που κυμαίνονται από 1 έως 20 mg/kg ανήκουν η λουτεΐνη, που είναι το σημαντικότερο καροτενοειδές του ελαιολάδου, και το β-καροτένιο (Psomiadou & Tsimidou 2001).

Τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου έχουν συσχετιστεί με την αντιμετώπιση οξειδωτικών βλαβών διαφόρων κυττάρων, οι οποίες μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση παθήσεων όπως η αρτηριοσκλήρυνση (Visioli & Galli 1994) και ορισμένες μορφές καρκίνου (Soler–Rivas et al. 2000, Pietta 2000). Πράγματι, η συχνότητα εμφάνισης των παθήσεων αυτών είναι σημαντικά χαμηλότερη στους Μεσογειακούς λαούς, γεγονός που αποδίδεται στην αυξημένη παρουσία αντιοξειδωτικών συστατικών στον οργανισμό, εξαιτίας της μεγάλης κατανάλωσης ελαιολάδου αλλά και λαχανικών (Visioli & Galli 1994).

## 21. Τα φύλλα της ελιάς

Εκτός από το ελαιόλαδο, έντονο ενδιαφέρον για τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, συγκεντρώνουν, τα τελευταία χρόνια, τα φύλλα και οι βλαστοί της ελιάς (Boskou 2006a). Και αυτό, γιατί πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών υποδεικνύει ότι τα φύλλα της ελιάς μπορεί να αποτελέσουν πηγή συστατικών με αξιόλογες βιοδραστικές ιδιότητες αντίστοιχες με εκείνες του ελαιοκάρπου (Malik & Bradford 2006, Boskou 2006a). Ορισμένα από τα συστατικά αυτά, όπως η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη, υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες και στο ελαιόλαδο, το οποίο όμως λόγω της διατροφικής και οικονομικής του αξίας δεν προσφέρεται για την παραλαβή ουσιών.

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν μια ιδιαίτερα ελκυστική πρώτη ύλη για την εξαγωγή βιοδραστικών ουσιών καθώς μεγάλες ποσότητες φύλλων ελιάς είναι διαθέσιμες κατά το κλάδεμα των ελαιοδένδρων και τη συγκομιδή του καρπού, καθώς και από τα ελαιοτριβεία, όπου το 10% του συνολικού βάρους των προσαγόμενων καρπών είναι φύλλα και κλαδίσκοι

ελιάς (Makris et al. 2007). Μέχρι σήμερα, το υλικό αυτό αποτίθεται στο περιβάλλον ή κομποστοποιείται ή υποβάλλεται σε καύση ή χρησιμοποιείται ως ζωστροφή (Martin Garcia et al. 2003, 2004, 2006). Το γεγονός ότι η Ελλάδα είναι τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο με περίπου 130 εκατομμύρια δένδρα σε ένα παγκόσμιο σύνολο 800 εκατομμυρίων δένδρων, αντικατοπτρίζει το μέγεθος της ποσότητας των φύλλων ελιάς που μπορεί να διατεθεί προς εκμετάλλευση, αν αυτά αξιοποιηθούν σε ετήσια βάση (Θεριός 2005). Επιπλέον, το γεγονός ότι το ελαιόδενδρο είναι δένδρο αειθαλές και κατά συνέπεια τα κλαδιά του φέρουν φύλλα καθ' όλη η διάρκεια του έτους, καθιστά την αξία αυτής της πρώτης ύλης ιδιαίτερη σε σχέση με άλλα φυτά εποχικής διαθεσιμότητας.

### 21.1 Χαρακτηριστικά των φύλλων της ελιάς

Το δένδρο της ελιάς είναι αειθαλές και αιωνόβιο και υπάρχουν πολλές ποικιλίες που όπως διαφέρουν στο μέγεθος και το σχήμα των καρπών, έτσι διαφέρουν και στα χαρακτηριστικά των φύλλων. Τα χαρακτηριστικά των φύλλων και των καρπών χρησιμεύουν στη διάκριση των ποικιλιών, αν και, πολλές φορές, διαφοροποιήσεις στα χαρακτηριστικά των φύλλων μπορεί να εντοπιστούν ακόμη και σε φύλλα δένδρων της ίδιας ποικιλίας ανάλογα με τη ζωνρότητα του δένδρου, την ωριμότητα των φύλλων, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές τεχνικές. Η διάκριση των ποικιλιών με βάση χαρακτηριστικά των φύλλων όπως το σχήμα και οι διαστάσεις, είναι αξιόπιστη μόνο για τα ώριμα φύλλα του πρώτου έτους, καθώς τα χαρακτηριστικά τους διαφοροποιούνται με την ηλικία.

Αν και η διάρκεια ζωής των φύλλων της ελιάς είναι τρία έτη, τα περισσότερα πέφτουν στο δεύτερο έτος, κατά τη διάρκεια της νέας βλάστησης. Τα φύλλα όλων των ελαιοδένδρων είναι λογχοειδή, δερματώδη, με συνεχή λεία παρυφή και κοντό μίσχο. Το χρώμα τους είναι πράσινο στην πάνω επιφάνεια και γκριζόφαιο στην κάτω και καλύπτεται από αστεροειδή τριχίδια για τη μείωση της διαπνοής. Ένα μέσο ενήλικο φύλλο έχει σχήμα στενόμακρο, μήκος 5-8 cm και πλάτος στο κέντρο 1-1,5 cm. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πάχος των φύλλων σχετίζεται με την ηλικία, αφού κατά τη γήρανση το πάχος τους αυξάνεται (Σφακιωτάκης 1996, Θεριός 2005).

Τα νεανικά φύλλα που αναπτύσσονται στην αρχή της άνοιξης, έχουν μικρότερη αναλογία μήκους/πλάτους, είναι στρογγυλά, ελαφρώς λογχοειδή και σαρκώδη, με σκούρο πράσινο χρώμα λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Τα νεανικά φύλλα προκύπτουν από βλαστούς που προέρχονται από το λαιμό του δένδρου ή από σφαιροβλάστες. Το καλοκαίρι

με τη μείωση της βλαστικής αύξησης, τα νέα φύλλα που προκύπτουν προοδευτικά γίνονται μικρότερα, ενώ το φθινόπωρο, ιδιαίτερα σε κλίματα που παρατηρείται δεύτερο κύμα βλάστησης, το μέγεθος των νέων φύλλων αυξάνεται εκ νέου (Σφακιωτάκης 1996, Θεριός 2005).

Τα φύλλα είναι απαραίτητα για τη σύνθεση ενώσεων απαραίτητων όχι μόνο για την αύξηση του καρπού, αλλά και για το σχηματισμό της νέας βλάστησης. Η ελιά είναι από τα λίγα φυτά που μπορούν να παράγουν αλκοόλες όπως μαννιτόλη και ολιγοσακχαρίτες όπως ραφινόζη και σταχυόζη, ως τελικά προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Τα προϊόντα αυτά μεταφέρονται από τα φύλλα στον καρπό και συμμετέχουν στις διάφορες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του ελαιολάδου (Κυριτσάκης 2007).

Η διαμόρφωση του σχήματος και το κλάδεμα των δένδρων με σκοπό την καλύτερη έκθεσή τους στο φως, έχουν μεγάλη σημασία για την καρπόδεση και την αύξηση της παραγωγικότητας των δένδρων. Και αυτό, γιατί η μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας εξαιτίας της σκίασης είναι ταχεία, ενώ η συμβολή των ώριμων φύλλων στην παραγωγικότητα των ακλάδευτων δένδρων είναι μικρή. Φυλλόπτωση και αποφύλλωση, ως αποτέλεσμα όχι μόνο λαθεμένου κλαδέματος αλλά και τρόπου συγκομιδής ή ακόμη και ζημιών από εχθρούς και ασθένειες, μπορεί να έχουν δυσάρεστες επιπτώσεις στην παραγωγή της επόμενης χρονιάς (Σφακιωτάκης 1996, Θεριός 2005).

Τα φύλλα είναι επίσης απαραίτητα στη διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών, αφού σχετικές έρευνες έδειξαν ότι με μειωμένο φύλλωμα δεν σχηματίζονται ανθοφόροι οφθαλμοί ή επηρεάζεται η τελειότητα των ανθέων. Η αφαίρεση φύλλων αλλά και η σκίασή τους, μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε αναστολή της άνθησης. Έτσι, η αφαίρεση μέρους του φυλλώματος νωρίς, μέχρι ένα μήνα πριν την πλήρη άνθηση, προκαλεί ατροφία στον ύπερο, ενώ η αποφύλλωση μετά το χρονικό διάστημα του ενός μηνός δεν φαίνεται να ασκεί καμία επίδραση στην αναλογία τέλειων και ατελών ανθέων (Σφακιωτάκης 1996, Θεριός 2005).

## **21.2 Τα φύλλα της ελιάς ως πηγή βιοδραστικών ουσιών**

Τα φύλλα της ελιάς, αντίθετα με τον καρπό της, δεν περιέχουν σημαντικές ποσότητες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το ελαϊκό οξύ ή το σκουαλένιο (Somona et al. 2003), αλλά περιέχουν πολλές βιοδραστικές ουσίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις περισσότερες φαρμακολογικές τους ιδιότητες (Polzonetti et al. 2004). Οι βιοδραστικές ιδιότητες των φύλλων της ελιάς αποδίδονται, κατά κύριο λόγο, στα ιριδοειδή συστατικά τους και ειδικότερα στα σεκοϊριδοειδή ελαιοευρωπαϊνή και υδροξυτυροσόλη, συστατικά με καλά

τεκμηριωμένη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (Ghisalberti 1998, Le Tutour & Guedon 1992, Owen et al. 2000, Benavente-Garcia et al. 2000, Boskou 2006a.). Οι δύο αυτές ουσίες θεωρείται ότι προσφέρουν στο δέντρο της ελιάς ανθεκτικότητα έναντι των προσβολών από έντομα και βακτήρια και, επιπλέον, το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς έχει βρεθεί αποτελεσματικό *in vitro* κατά πολλών παθογόνων μικροοργανισμών του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων των ιών της γρίπης και του έρπητα, μυκήτων και βακτηρίων (Walter et al. 1973, Ghisalberti 1998). Ωστόσο, η δραστηριότητα αυτού του εκχυλίσματος *in vivo* δεν έχει επαρκώς αποδειχθεί.

Στο σημείο αυτό αξίζει, ίσως, να αναφερθεί, ότι εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν αξιοποιηθεί στο παρελθόν, μέσα στα πλαίσια της παραδοσιακής ιατρικής, για την αντιμετώπιση κρουσμάτων ελονοσίας, θανατηφόρων πυρετών, υπέρτασης και διαβήτη, τόσο στην Ελλάδα όσο και σε Γαλλία, Ισπανία και χώρες της Αφρικής. Ο Διοσκουρίδης στο «Περί Ύλης της Ιατρικής» (De Materia Medica) αναφέρεται συγκεκριμένα στα φύλλα της ελιάς και στη δράση των εκχυλισμάτων τους, δίνοντας έτσι την πρώτη ίσως συνταγή για την παρασκευή αφεψημάτων από φύλλα ελιάς. Η πρώτη, όμως, επίσημη αναφορά για τη χρήση των φύλλων της ελιάς στην Ιατρική χρονολογείται από το 1854, όταν ο Hanbury ανέφερε στο περιοδικό «Pharmaceutical Journal» τη χρήση ενός υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς ως αντιπυρετικού (Bourquelot & Vintilesco 1938). Έκτοτε, ανευρίσκονται πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίες αναφέρονται στην αντιοξειδωτική (Le Tutour & Guedon 1992, Ghisalberti 1998, Owen et al. 2000), αντιμικροβιακή (Walter et al. 1973, Ghisalberti 1998), αντιυπερτασική (Visioli & Galli 1994, 1998, Ziyat et al. 1997, Ghisalberti 1998), αγγειοδιασταλτική (Zarzuelo et al. 1991) και υπογλυκαιμική (Gonzalez et al. 1992) δράση του εκχυλίσματος ή μεμονωμένων συστατικών των φύλλων.

Σήμερα, η παραδοσιακή χρήση σκευασμάτων από φύλλα ελιάς εμφανίζεται σε πολλές μελέτες (Guarrera 2005, Giau et al. 2007, Khan et al. 2007), ενώ πληροφορίες σχετικά με τη χρήση των φύλλων της ελιάς ως πρώτης ύλης με φαρμακευτικό δυναμικό, ανευρίσκονται καταχωρημένες σε φαρμακοποιείες όπως η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιεία. Ωστόσο θα πρέπει να επισημανθεί ότι η φαρμακολογική χρήση των φύλλων της ελιάς είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, ακόμη και στις ελαιοπαραγωγές περιοχές της Ισπανίας, Ιταλίας, Ελλάδος, Τυνησίας και Μαρόκου, μολονότι στην αμερικανική αγορά, αλλά και στο διαδίκτυο, κυκλοφορούν από διάφορες εταιρείες εκχυλίσματα φύλλων της ελιάς σε μορφή δισκίων ως συμπληρώματα διατροφής. Τα εκχυλίσματα αυτά συνιστώνται, επίσης, ως φυσικά αντιμικροβιακά για μυκητιάσεις και ιώσεις όπως η γρίπη και ο έρπης, καθώς και για

ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

### 21.3 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε πολυφαινολικές ουσίες

Το κύριο ενδιαφέρον των ερευνητών σχετικά με τα βιοδραστικά συστατικά των φύλλων της ελιάς έχει επικεντρωθεί στις πολυφαινολικές ουσίες, ενώ οι τερπενοειδείς και άλλες ουσίες έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό.

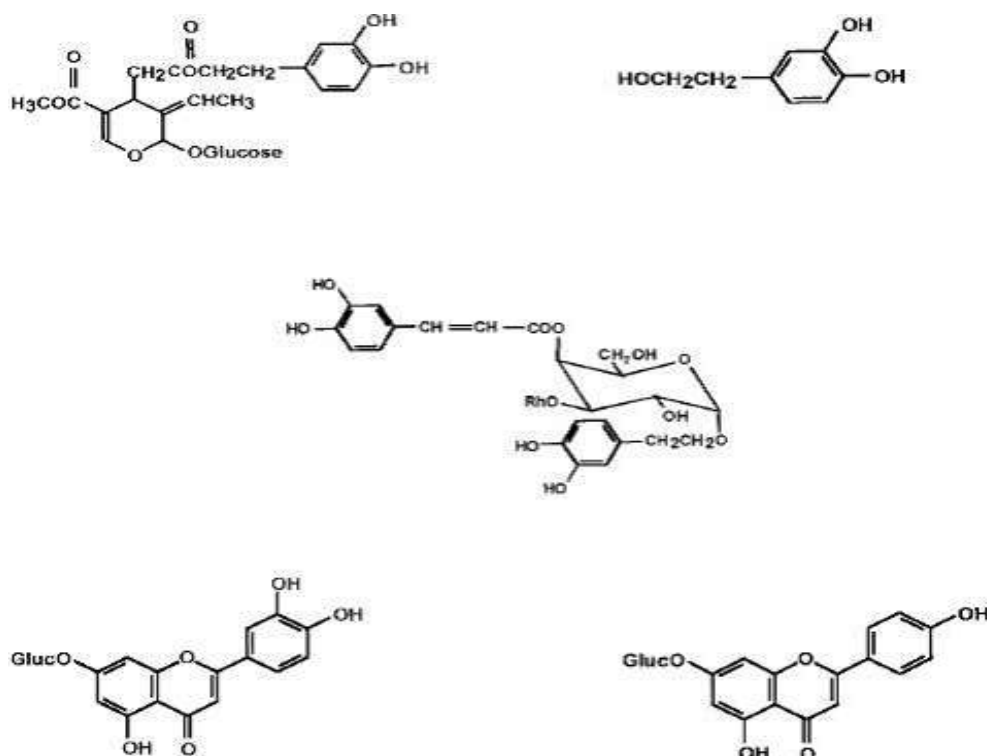
**Πίνακας 8.** Οι πολυφαινολικές ομάδες και τα συστατικά τους καθώς και οι σχετικές συγκεντρώσεις τους σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς

Ομάδα πολυφαινολών	Πολυφαινολικά συστατικά	Συγκεντρώσεις, % εκχυλίσματος φύλλων ελιάς
Ελαιοευρωπεοζίτες	Ελαιοευρωπαϊνή	24,54
	Βερμπασκοζίτης	1,11
	7-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης	1,38
	7-Ο-γλυκοζίτης απιγενίνης	1,37
	7-Ο-γλυκοζίτης διοσμετίνης	0,54
	Λουτεολίνη	0,21
Φλαβόνες	Διοσμετίνη	0,05
Φλαβονόλες	Ρουτίνη	0,05
Φλαβαν-3-όλες	Κατεχίνη	0,04
	Τυροσόλη	0,71
	Υδροξυτυροσόλη	1,46
	Βανιλίνη	0,05
	Βανιλινικό οξύ	0,63
Υποκατεστημένες φαινόλες	Καφεϊκό οξύ	0,34

Πηγή: Benavente-Garcia et al., 2000.

Μολονότι οι πολυφαινολικές ουσίες των φύλλων της ελιάς είναι, σχετικά, πολλές και η φύση τους ποικίλει, ορισμένες μόνο απαντούν σε επίπεδα άξια εκμετάλλευσης. Μεταξύ των πολυφαινολικών συστατικών, κύρια είναι η παρουσία των φλαβονοειδών και σεκοϊριδοειδών, που φαίνεται να συμμετέχουν σχεδόν ισοδύναμα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων (Makris et al. 2007). Απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα συμμετέχουν σε μικρότερα επίπεδα, αν και υψηλότερα επίπεδα τέτοιων συστατικών μπορούν να παραληφθούν μετά από ειδική επεξεργασία των φύλλων όπως η υδρόλυση, που οδηγεί σε διάσπαση των σύνθετων φαινολικών μορφών όπως τα σεκοϊριδοειδή, σε απλούστερα μόρια όπως οι απλές φαινόλες και τα οξέα, καθώς και το ελενολικό οξύ (Briante et al. 2002a, 2002b, Bouaziz & Sayadi 2005, De Leonardis et al. 2008). Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι πολυφαινολικές ομάδες και τα συστατικά τους καθώς και οι σχετικές συγκεντρώσεις τους σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.

Λαμβάνοντας υπόψη τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα και τις αναμενόμενες ποιοτικές και ποσοτικές διαφοροποιήσεις που σημειώνονται μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων, συμπεραίνεται ότι τα κύρια συστατικά των φύλλων της ελιάς είναι η ελαιοευρωπαϊνή, η υδροξυτυροσόλη, οι γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης, καθώς και ο βερμπασκοζίτης (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Συντακτικοί τύποι των πολυφαινολών που κυρίως απαντούν σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς. Ελαιοευρωπαϊνή (Α), υδροξυτυροσόλη (Β), βερμπασκοζίτης (Γ), 7-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης (Δ) και 7-Ο-γλυκοζίτης απιγενίνης (Ε) (Source: Benavente-García et al. 2000)

Παρά τον μεγάλο αριθμό των σχετικών βιβλιογραφικών μελετών, απόλυτες τιμές για τα επίπεδα των ολικών πολυφαινολικών συστατικών των φύλλων της ελιάς είναι δύσκολο να καθοριστούν. Η δυσκολία οφείλεται κυρίως στον διαφορετικό τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων. Και αυτό γιατί η χρήση διαφορετικών προτύπων ουσιών όπως το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το ταννικό οξύ, για την έκφραση των αποτελεσμάτων, διαφοροποιεί το μέγεθος των αναφερόμενων συγκεντρώσεων και κατά συνέπεια οδηγεί σε εσφαλμένες εντυπώσεις.

Επιπλέον, εσφαλμένα συμπεράσματα μπορεί να προκύψουν από τις διαφορετικές συνθήκες ξήρανσης, αποθήκευσης ή εκχύλισης των φύλλων της ελιάς, καθώς και από τον διαφορετικό τρόπο παρουσίασης των αποτελεσμάτων που μπορεί να εκφράζονται με βάση

τη μάζα των ξηρών φύλλων, των νωπών φύλλων, του ξηρού εκχυλίσματος των φύλλων ή του όγκου του εκχυλίσματος των φύλλων. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο φύλλων ελιάς διαφορετικών ποικιλιών, περιόδων δειγματοληψίας και συνθηκών εκχύλισης.

**Πίνακας 9.** Βιβλιογραφικά δεδομένα για τα επίπεδα των ολικών φαινολών σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς

Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	Διαλύτης εκχύλισης	Βιβλιογραφικές αναφορές
<i>Με πρότυπη ουσία την τυροσόλη(TYR)</i>		
0,269 mg TYR /mg ξηρού εκχυλίσματος	Αιθανόλη/νερό (1/1, v/v)	Briante et al. 2002β
28 mg TYR /mg ξηρού εκχυλίσματος.	Αιθανόλη/νερό (1/1, v/v)	Briante et al. 2004
<i>Με πρότυπη ουσία το ταννικό οξύ (TAN)</i>		
11,6-17,4 g TAN/kg νωπών φύλλων	Μεθανόλη/νερό (80/20, v/v)	Silva et al. 2006
11,7-40,1 g TAN/kg ξηρών φύλλων	Μεθανόλη/νερό (80/20, v/v)	Silva et al. 2006
0,04-0,25 g TAN/L εγχύματος	Έγχυμα σε νερό	Silva et al. 2006
3-11 mg TAN/g ξηρών φύλλων	Ακετόνη, νερό (10-90%, v/v)	Altiok et al. 2008
<i>Με πρότυπη ουσία το καφεϊκό οξύ (ΚΑΦ)</i>		
2,5-3,5 g ΚΑΦ/100g νωπών φύλλων	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Del Rio et al. 2003
11,5-18,4 mg ΚΑΦ/g νωπών φύλλων	Αιθανόλη	Cayella et al. 2006
A) 0,18 mg ΚΑΦ/g ξηρών φύλλων	Εξάνιο	Le Floch et al. 1998
B) 1,1 mg ΚΑΦ/g ξηρών φύλλων	Διαιθυλαιθέρας	Le Floch et al. 1998
Γ) 1,6 mg ΚΑΦ/g ξηρών φύλλων	Οξικός αιθυλεστέρας	Le Floch et al. 1998
Δ) 16,8 mg ΚΑΦ/g ξηρών φύλλων	Μεθανόλη	Le Floch et al. 1998
E) 7,6 mg ΚΑΦ/g ξηρών φύλλων	SFE CO <sub>2</sub> + 10% μεθανόλη	Le Floch et al. 1998
215 mg ΚΑΦ/L χυμού	Χυμός	Farag et al. 2007
<i>Με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ (ΓΑΛ)</i>		
144 g ΓΑΛ/kg εκχυλίσματος	Μεθανόλη	Skerget et al. 2005
12,7 mg ΓΑΛ/g εκχυλίσματος	Μεθανόλη	Ferreira et al. 2007
0,007 g ΓΑΛ /L εγχύματος	Έγχυμα σε νερό	Giao et al. 2007
0,005 g ΓΑΛ /L αφενήματος	Αφέψημα σε νερό	Giao et al. 2007
0,274 g ΓΑΛ/L	Έγχυμα(κονιοποιημένο υλικό)	Giao et al. 2007
4027 mg ΓΑΛ/100g ξηρών φύλλων	0,1% HCl/μεθανόλη/ακετόνη/ νερό	Makris et al. 2007
23-253 mg ΓΑΛ/100g ξηρών φύλλων	Νερό/αιθανόλη/κιτρικό οξύ	Mylonaki et al. 2008
23.8 mg ΓΑΛ/g ξηρών φύλλων	80% υδατική μεθανόλη	Govaris et al. 2010
26,2 mg ΓΑΛ/g ξηρών φύλλων	80% υδατική μεθανόλη	Botsoglou et al. 2010
<i>Με πρότυπη ουσία την κατεχίνη (ΚΑΤ)</i>		
Αφέψημα	70 mg ΚΑΤ/L	Büyükbacı & El 2008

SFE: εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου

Από τον Πίνακα 9 διαπιστώνεται ότι τα φύλλα της ελιάς, παρά τις ουσιαστικές διαφορές των εκχυλισμάτων, αποτελούν μία ιδιαίτερα καλή πηγή πολυφαινολικών συστατικών. Και αυτό γιατί τα επίπεδα του ολικού φαινολικού περιεχομένου των φύλλων της ελιάς που

ανέρχονται μέχρι 250, 70 ή 40 mg ολικών φαινολών/g ξηρών φύλλων εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού, καφεϊκού ή ταννικού οξέους, αντίστοιχα, είναι συγκρίσιμα και κατά περιπτώσεις υψηλότερα από εκείνα άλλων φυτικών πηγών όπως το πράσινο και το μαύρο τσαΐ, η μέντα, το θυμάρι, το φλαμούρι, το φασκόμηλο, το χαμομήλι, ο ευκάλυπτος, ο βασιλικός, ο κοριάνδρος, κ.ά., που χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως αφενήματα, αρτυματικές ύλες, κ.ά. (Giao et al. 2007, Büyükbacı & El 2008).

**Πίνακας 10.** Συνοπτική παρουσίαση των διαφόρων φλαβονοειδών που έχουν ταυτοποιηθεί σε φύλλα ελιάς

Είδη φλαβονοειδών	Βιβλιογραφικές αναφορές
Απιγενίνη	Heimler et al. 1996, Pieroni et al. 1996, De Laurentis et al. 1998
4'-Ο-ρουτινοζίτης απιγενίνης	Pieroni et al. 1996
7-Ο-γλυκοζίτης απιγενίνης	Harborne & Green 1980, Le Tutour & Guedon 1992, Pieroni et al. 1996, De Laurentis et al. 1998, Savournin et al. 2001
7-Ο-ρουτινοζίτης απιγενίνης	Harborne & Green 1980, Le Tutour & Guedon 1992
7-Ο-ρουτινοζίτης εσπερετίνης (εσπεριδίνη)	Ficarra et al. 1991, De Laurentis et al. 1998
Κεμπφερόλη	De Laurentis et al. 1998
Λουτεολίνη	Heimler et al. 1992, Heimler et al. 1996, Pieroni et al. 1996
4'-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης	Harborne & Green 1980, Le Tutour & Guedon 1992, Heimler et al. 1996, Pieroni et al. 1996
7-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης	Ficarra et al. 1991, Heimler et al. 1992, Le Tutour & Guedon 1992, Heimler et al. 1996, Pieroni et al. 1996, De Laurentis et al. 1998, Savournin et al. 2001
7-Ο-ρουτινοζίτης λουτεολίνης	Harborne & Green 1980, Le Tutour & Guedon 1992
3'-Ο-μεθυλαιθέρας λουτεολίνης	Pieroni et al. 1996
3'-Ο-μεθυλαιθέρας-7-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης	Pieroni et al. 1996
Κερκετίνη	De Laurentis et al. 1998
3-Ο-ραμνοζίτης κερκετίνης (κερκιτρίνη)	Heimler et al. 1992, Heimler et al. 1996, Pieroni et al. 1996
3-Ο-ρουτινοζίτης κερκετίνης (ρουτίνη)	Harborne & Green 1980, Ficarra et al. 1991, Le Tutour & Guedon 1992, Heimler et al. 1996, De Laurentis et al. 1998, Savournin et al. 2001



#### 21.4 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε φλαβονοειδή

Παρά το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή συστατικά συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων, οι εργασίες που αναφέρονται στην παρουσία και την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών στα πολικά εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς είναι σχετικά περιορισμένοι (De Laurentis et al. 1998, Liakopoulos et al. 2006).

Εξετάζοντας τα κύρια φλαβονοειδή σε πολικά εκχυλίσματα έξι διαφορετικών ποικιλιών φύλλων ελιάς, μερικοί ερευνητές ανέφεραν ότι τα επίπεδα των 7-*O*- και 4'-*O*-γλυκοζιτών της λουτεολίνης ήταν στις περιοχές τιμών 0,4-1,6 και 0,1-0,8 mg/g νωπών φύλλων, αντίστοιχα ( Liakopoulos et al. 2006). Συνοπτική παράθεση των φλαβονοειδών που έχουν κατά καιρούς ταυτοποιηθεί σε φύλλα ελιάς, γίνεται στον Πίνακα 10.

#### 21.5 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε σεκοϊριδοειδή και παράγωγά τους

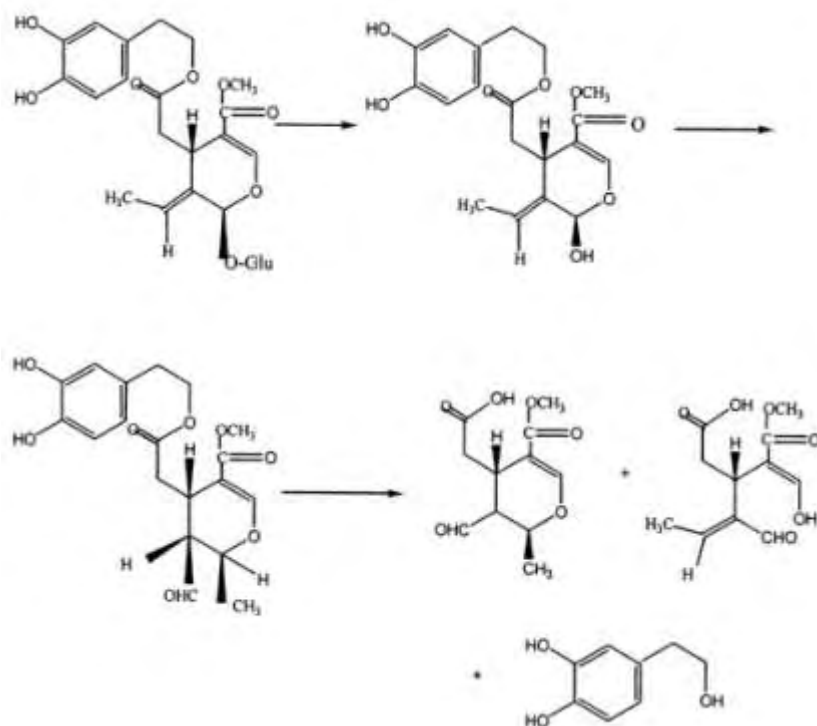
Στην οικογένεια *Oleaceae*, τα σεκοϊριδοειδή παράγονται, συνήθως, από γλυκοζίτες που αποτελούν συνδυασμό του ελενολικού οξέος με έναν υδατάνθρακα και χαρακτηρίζονται από μία εξωκυκλική 8, 9-ολεφινική ομάδα (Soler-Rivas et al. 2000).

Χαρακτηριστική ένωση αυτής της υποομάδας είναι η ελαιοευρωπαϊνή, η οποία για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1938 από τους Bourquelot και Vintilesco, αποτελεί το φαινολικό συστατικό που είναι κυρίως υπεύθυνο για το τυπικά πικρό και οξύ άρωμα που χαρακτηρίζει τους καρπούς, το λάδι και τα φύλλα της ελιάς (Manna et al. 2004). Η ελαιοευρωπαϊνή της οποίας η παρουσία σχετίζεται άμεσα με την προστασία του ελαιοδένδρου και του ελαιοκάρπου από φυτοφάγα ζώα, έντομα, παράσιτα και μικρόβια, έχει συνδεθεί με την πρόληψη ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές διαταραχές, διαβήτη, ορισμένους τύπους καρκίνου και ιούς (Sotiroudis et al. 2003, Obied et al. 2005, Visioli et al. 2006).

Πολύ αργότερα, άλλοι ερευνητές (Ranizi et al. 1960) υπέδειξαν ότι το μόριο της ελαιοευρωπαϊνης αποτελείται από τρεις, ουσιαστικά, ουσίες. Η πρώτη είναι η γλυκόζη, η δεύτερη είναι η β-3,4-διυδροξυ-φαινυλοαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και η τρίτη είναι ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ολεανολικό οξύ. Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης. Μελετώντας την αντιμικροβιακή δράση των ενώσεων που προκύπτουν από υδρόλυση της ελαιοευρωπαϊνης, οι Fleming et al. (1973) παρέθεσαν τις παρακάτω υδρολυτικές αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν το χημικό τύπο της ελαιοευρωπαϊνης (Εικόνα 9).

Μολονότι η ελαιοευρωπαϊνή αναφέρεται συνήθως στη βιβλιογραφία ως το κύριο

σεκοϊριδοειδές των φύλλων της ελιάς, άλλες ενώσεις όπως το άγλυκο συστατικό της, η υδροξυτυροσόλη, καθώς και η διαλδευδική αποκαρβοξυλιωμένη μορφή του άγλυκου συστατικού της (3,4 DHPEA-EDA), υπερέχουν, πολλές φορές, ποσοτικά (Ryan et al. 2003, Rada et al. 2007).



**Εικόνα 9.** Υδρόλυση της ελαιοευρωπαϊνης προς δύο μορφές ολεανολικού οξέος και υδροξυτυροσόλη.

Η ανωμαλία αυτή έχει αποδοθεί σε αλληλομετατροπές (ισομερή ή διαλευδικές μορφές) που λαμβάνουν χώρα μεταξύ αυτών των ενώσεων (Paiva-Martins et al. 2003, Ryan et al. 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές *in vitro* δοκιμές δίνουν ισχυρές ενδείξεις για την ικανότητα της ελαιοευρωπαϊνης, του άγλυκου συστατικού της και της διαλδευδικής μορφής της να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου (Carrasco-Pancorbo et al. 2005, Nenadis & Tsimidou 2009).

Ερευνητές που υπέβαλαν σε ανάλυση εκχυλίσματα φύλλων ελιάς μιας αυστραλιανής ποικιλίας, υποστήριξαν ότι η ελαιοευρωπαϊνη μπορεί να ανέλθει σε συγκεντρώσεις ισοδύναμες με 264 mg τυροσόλης/g ξηρών φύλλων (Ryan et al. 2003). Άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι η ελαιοευρωπαϊνη μπορεί να βρεθεί και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, φθάνοντας σε πολικά εκχυλίσματα φύλλων ακόμη και σε μηδενικές συγκεντρώσεις (Jaron-Lujan et al. 2006a, 2007). Μερικοί ερευνητές υποστήριξαν ότι η ελαιοευρωπαϊνη ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας των φύλλων (Ranalli et al. 2006), ενώ άλλοι

παρατήρησαν ότι η αναλογία της ελαιοευρωπαϊνης προς την διαλδευδική μορφή της κυμαίνεται από 2 έως 10 (Savourmin et al. 2001, Ryan et al. 2003). Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα της διαλδευδικής μορφής της, ευρήματα διαφόρων σχετικών εργασιών υποδεικνύουν ότι αυτά επηρεάζονται από την ηλικία των φύλλων, τη χρονική περίοδο συλλογής τους και κυρίως από τις συνθήκες ξήρανσης, εκχύλισης και αποθήκευσης τους (Paiva-Martins et al. 2003, Ryan et al. 2002a, 2003). Οι μεγάλες αυτές διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων της ελαιοευρωπαϊνης είναι πιθανό να οφείλονται όχι μόνο σε αλληλομετατροπές μεταξύ των διαφόρων βασικών συστατικών της, αλλά και στο γεγονός ότι αυτό το σεκοϊριδοειδές μπορεί να εμφανίζεται και με άλλες ελαφρώς διαφοροποιημένες μορφές ή σαν τμήμα πιο σύνθετων ενώσεων (Nenadis & Tsimidou 2009). Ανάλογες με τις παραπάνω, είναι και οι παρατηρήσεις για την παρουσία και τα επίπεδα της υδροξυτυροσόλης, βασικού συστατικού του ελαιολάδου και του ελαιοκάρπου, η οποία αποτελεί, επίσης, ένα από τα βασικά συστατικά των φύλλων της ελιάς (Ryan et al. 2003).

Η παρουσία στα φύλλα της ελιάς του βερμπασκοζίτη, ενός άλλου σεκοϊριδοειδούς, δεν μπορεί, επίσης, να αγνοηθεί. Η αναλογία των επιπέδων βερμπασκοζίτη και ελαιοευρωπαϊνης σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς από ισπανικές ποικιλίες βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,05 έως 0,63 (Japon-Lujan & Luque de Castro 2007). Έχει αναφερθεί ότι ο βερμπασκοζίτης, στο μόριο του οποίου υπάρχουν δύο κατεχολικές ομάδες, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και προληπτική δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, κ.ά (Cayuella et al. 2006). Ακόμη, έχει υποστηριχθεί ότι η ικανότητα του βερμπασκοζίτη να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες μπορεί να ξεπερνά κατά 2 με 3 φορές εκείνη της υδροξυτυροσόλης (Aldini et al. 2006).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει, ίσως, ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός ότι στα σεκοϊριδοειδή, η συσχέτιση της δομής του μορίου τους με την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες είναι δύσκολη, καθώς τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με την δραστηρότητά τους είναι πολύ περιορισμένα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι π.χ. η ελαιοευρωπαϊνη είναι δυνατόν να υποστεί διάφορες δομικές αλλαγές και να προκύψουν πολλοί τύποι άγλυκου μέρους που να διαφέρουν δομικά άλλοτε λιγότερο και άλλοτε περισσότερο από αυτήν. Έτσι, μολονότι η αντιοξειδωτική συμπεριφορά της ελαιοευρωπαϊνης έχει διερευνηθεί σε διάφορα συστήματα, τα διαθέσιμα στοιχεία για τη σχετική δραστηρότητα των παραγώγων της είναι ελάχιστα. Από τα λίγα διαθέσιμα ευρήματα φαίνεται ότι κυρίως τα υδροξυτυροσολικά παράγωγα (παραγωγα ελαιοευρωπαϊνης) είναι δραστικά αντιοξειδωτικά (Servili et al. 2004, Carrasco-Pancorbo et al. 2005, Nenadis και

Tsimidou 2009) με σειρά δραστηριότητας που ποικίλλει ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες (McDonald et al. 2001, Nenadis & Tsimidou 2009). Αλλα σεκοϊριδοειδή, όπως ο λιγκστροζίτης και συναφή παράγωγα (τυροσολικά παράγωγα) δεν αναμένεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερη δράση, καθώς στερούνται βασικών δομικών χαρακτηριστικών, όπως η παρουσία κατεχολικών ομάδων (Servili et al. 2004). Στον Πίνακα 11 παρατίθενται τα σεκοϊριδοειδή που έχουν κατά καιρούς ταυτοποιηθεί σε φύλλα ελιάς.

**Πίνακας 11.** Συνοπτική παρουσίαση των σεκοϊριδοειδών σε φύλλα ελιάς

<b>Είδη σεκοϊριδοειδών</b>	<b>Βιβλιογραφικές αναφορές</b>
Διμεθυλοελαιοευρωπαϊνή	Ragazzi et al. 1973
Υδροξυτυροσόλη	Le Tutour & Guedon 1992, Le Floch et al. 1998
Λιγκστροζίτης	Kuwajima et al. 1988, De Nino et al. 1997, Le Floch et al. 1998, Ryan et al. 1999
Διμεθυλεστέρας ελαιοζίτη	De Nino et al. 1997
Ελαιοευρωπαϊνή	De Nino et al. 1997, Le Floch et al. 1998, Ryan et al. 1999, Savournin et al. 2001
Ελαιοζίτης	Kuwajima et al. 1988, Savournin et al. 2001
Τυροσόλη	Le Tutour & Guedon 1992, Le Floch et al. 1998
Βερμπασκοζίτης	Ryan et al. 1999, Savournin et al. 2001

## 21.6 Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε άλλα βιοδραστικά συστατικά

Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, και άλλες βιοδραστικές ουσίες, κυριότερες από τις οποίες είναι οι τριτερπενοειδείς ενώσεις. Μεταξύ των διαφόρων τριτερπενοειδών που βρίσκονται στα φύλλα της ελιάς κυριαρχούν τα υδροξυπεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα με κυριότερους αντιπροσώπους το ολεανολικό (3β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid) και το μασλινικό (2α, 3β-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) οξύ (Pérez-Camino & Cert 1999).

Η ερυθροδιόλη, η ουβαόλη, το ουρσολικό και το μασλινικό οξύ είναι ενώσεις που ανευρίσκονται συνήθως σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Πίνακας 12). Τα επίπεδα των βιοδραστικών αυτών συστατικών στα φύλλα της ελιάς, αν και επηρεάζονται από την ποικιλία και την περίοδο δειγματοληψίας, απαντώνται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (Somova et al. 2003, 2004). Εντούτοις, στο άμεσο μέλλον, τα βιοδραστικά αυτά συστατικά αναμένεται να προσελκύσουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, εξαιτίας των αντιυπερτασικών, αντιαθηροσκληρωτικών, αντιοξειδωτικών και καρδιοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων (Somova et al. 2003, 2004, Cayuella et al. 2006).

**Πίνακας 12.** Συνοπτική παρουσίαση των φαινολικών οξέων σε φύλλα ελιάς

Είδη φαινολικών οξέων	Βιβλιογραφικές αναφορές
Καφεϊκό οξύ	Le Floch et al. 1998
Χλωρογενικό οξύ	Heimler et al. 1992, Heimler et al. 1996
Σιναπικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Ολεανολικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Φερουλικό οξύ	Liakopoulos et al. 2001
Ομοβανιλινικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Υδροξυβενζοϊκό οξύ	Le Floch et al. 1998
Κουμαρικό οξύ	Liakopoulos et al. 2001
Πρωτοκατεχικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Σαλικυλικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Συριγγικό οξύ	Le Floch et al. 1998
Κιναμωμικό οξύ	Le Floch et al. 1998

Επισημαίνεται ότι υψηλότερα επίπεδα τέτοιων συστατικών μπορεί να παραληφθούν μετά από υδρόλυση των φύλλων της ελιάς με οξέα, επεξεργασία η οποία οδηγεί σε διάσπαση των πολυφαινολών σε απλούστερα μόρια όπως οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα (Bouaziz Sayadi 2005, De Leonardis et al. 2008). Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται η παραγωγή ολεανολικού οξέος και υδροξυτυροσόλης από ελαιοευρωπαϊνή μετά από υδρόλυσή της (Briante et al. 2002a).

## 22 Μέθοδοι παραλαβής των βιοδραστικών συστατικών

Ο όρος διαχείριση ενός φυτικού υλικού περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, την ξήρανση και την αποθήκευσή του καθώς επίσης και την τεχνική και τις συνθήκες εκχύλισης, δηλαδή τη φυσική κατάσταση του υλικού (ξηρό ή νωπό, κονιοποιημένο ή όχι, διάμετρο κόκκων), την αναλογία υλικού/διαλύτη, καθώς και το χρόνο και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Οι συνθήκες διαχείρισης ενός φυτικού υλικού είναι καθοριστικές της σύστασης και των ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος (Robards 2003).

Το ανερχόμενο βιομηχανικό ενδιαφέρον για φυτικά προϊόντα σε συνδυασμό με τα μειονεκτήματα πολλών χρησιμοποιούμενων τεχνικών όπως η χαμηλή αποδοτικότητα, η καταστροφή θερμοευαίσθητων συστατικών, η απαίτηση μεγάλων χρόνων εκχύλισης, η μεγάλη κατανάλωση διαλυτών και ποσοτήτων πρώτων υλών, η απαίτηση τοξικών διαλυτών, κ.ά., οδήγησαν στην ανάγκη καθορισμού βέλτιστων συνθηκών παραλαβής των επιθυμητών συστατικών. Έτσι, η εφαρμογή νεότερων πρακτικών στην παρασκευή εκχυλισμάτων βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πηγές όπως η χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων ή ρευστών σε υπερκρίσιμη κατάσταση, άρχισε σταδιακά να κατακτά έδαφος (Starmans &

Nijhuis 1996, Wang & Weller 2006). Η ίδια τάση άρχισε να ακολουθείται και για την παραλαβή πολυφαινολικών ενώσεων (Jarón-Luján et al. 2006b, 2006c, 2006d, Luque de Castro & Jarón-Luján 2006, Rada et al. 2007) συμπεριλαμβανομένων και τερπενοειδών συστατικών (Guinda et al. 2004, Sánchez Ávila et al. 2007), από φύλλα ελιάς.

**Πίνακας 13.** Συνήθεις μέθοδοι παρασκευής εκχυλισμάτων από φυσικά προϊόντα

<b>Μέθοδοι</b>	<b>Συνοπτική περιγραφή</b>
<i>Κλασικές πρακτικές</i>	
Έγχυμα (Infusion)	Ανάμιξη βρασμένου νερού και φυτικού υλικού, παραμονή μίγματος για ορισμένο χρόνο
Αφέψημα (Decoction)	Προσθήκη νερού σε φυτικό υλικό ή αντιστρόφως, βρασμός μίγματος για ορισμένο χρόνο
Βάμμα (Tincture)	Εμβάπτιση φυτικού υλικού σε μίγμα αιθανόλης/νερού (1/4, v/v) ( διάρκεια ζωής του εκχυλίσματος περίπου 2 έτη)
Χυμός (Juice)	Πολτοποίηση μίγματος νερού φυτικού υλικού και νερού σε μίξερ ή οικιακό αποχυμωτή
<i>Άλλες συμβατικές πρακτικές</i>	
Μούλιασμα (Maceration)	Ανάμιξη διαλύτη εκχύλισης και φυτικού υλικού, συνεχής διαβροχή υλικού για ορισμένο χρόνο
Εκχύλιση με ανάδευση (Shaking or agitation)	Ανάμιξη διαλύτη εκχύλισης και φυτικού υλικού, ανακίνηση ή ανάδευση μίγματος για ορισμένο χρόνο
Εκχύλιση Soxhlet (Soxhlet extraction)	Εκχύλιση του φυτικού υλικού από τον διαλύτη εκχύλισης σε συσκευή Soxhlet για ορισμένο χρόνο
<i>Σύγχρονες πρακτικές</i>	
Εκχύλιση με υπέρηχους (Sonication ή Ultrasound assisted extraction)	Εκχύλιση του φυτικού υλικού από τον διαλύτη εκχύλισης σε συσκευή υπερήχων για ορισμένο χρόνο
Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated solvent extraction)	Επιταχυνόμενη εκχύλιση του φυτικού υλικού από τον διαλύτη εκχύλισης
Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction)	Εκχύλιση του φυτικού υλικού από τον διαλύτη εκχύλισης σε συσκευή μικροκυμάτων για ορισμένο χρόνο
Εκχύλιση με ρευστά σε υπερκρίσιμη κατάσταση (Supercritical fluid extraction)	Εκχύλιση του φυτικού υλικού από τον διαλύτη εκχύλισης (ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση) για ορισμένο χρόνο

Πηγές: Launert 1989, Wang & Weller 2006

Εντούτοις, ελάχιστες είναι μέχρι τώρα οι εργασίες με αντικειμενικό σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών παραλαβής από τα φύλλα ελιάς των βιοδραστικών συστατικών. Στις περισσότερες εργασίες εξετάζεται, αντίθετα, η αξιοποίηση σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης στα φύλλα της ελιάς (Antolovich et al. 2000, Tura & Robards 2002, Luque de Castro & Jarón-Luján 2006, Jarón-Luján et al. 2006b, 2006c, 2006d, Wang & Weller 2006, Andrade et al. 2008).

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η επιλογή των κατάλληλων διαλυτών για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά στηρίζεται στη φύση και τα χαρακτηριστικά τόσο του φυτικού υλικού όσο και των βιοδραστικών συστατικών του (Antolovich et al. 2000, Tura & Robards 2002, Robards 2003).

Και αυτό, γιατί οι ιδιότητες του διαλύτη εκχύλισης όπως το pH, η πολικότητα, η πτητικότητα, η ευφλεκτότητα και το σημείο βρασμού του καθώς, επίσης, και οι ιδιότητες των βιοδραστικών συστατικών όπως η διαλυτότητα, η ευαισθησία στη θερμότητα και η σταθερότητα, μπορεί να διευκολύνουν ή και να δυσχεράνουν την εκχύλιση, καθορίζοντας αποφασιστικά τη σύσταση και τη βιοδραστικότητα του τελικού προϊόντος. Επιπρόσθετοι παράγοντες όπως η ασφάλεια της χρήσης και το κόστος των διαλυτών, πρέπει, επίσης, να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των συνθηκών εκχύλισης.

Οι συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή πολικών συστατικών από ξηρά ή νωπά φυτικά υλικά είναι νερό, μεθανόλη, αιθανόλη, αλλά και υδατοαλκοολικά διαλύματα (Antolovich et al. 2000, Tura & Robards 2002, Robards 2003, Pérez-Jiménez et al. 2008).

Η χρήση αλκοολούχων διαλυτών έχει συσχετιστεί με τη διάρρηξη των φυτικών κυτταρικών μεμβρανών και τη βέλτιστη παραλαβή των ενδοκυτταρικών συστατικών (Robards 2003), ενώ η προσθήκη νερού στο μέσο εκχύλισης έχει οδηγήσει σε αύξηση της απόδοσης (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Για την εκχύλιση πολικών συστατικών μπορεί, επιπλέον, να χρησιμοποιηθεί η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας ή και άλλοι πολικοί διαλύτες (Tura & Robards 2002, Robards 2003, Pérez-Jiménez et al. 2008). Στον Πίνακα 13 παρατίθενται οι συνήθεις μέθοδοι παρασκευής εκχυλισμάτων από φυσικά προϊόντα.

Άλλες δυνατότητες βελτιστοποίησης της εκχύλισης, είναι η χρήση ενζύμων ή η κατάλληλη ρύθμιση του pH του εκχυλιστικού μέσου. Με τέτοιες προσεγγίσεις, μπορεί να βελτιωθεί η εκχυλισσιμότητα των βιοδραστικών συστατικών, αλλά και να διασπαστούν σύνθετες μορφές των συστατικών σε απλούστερες (Antolovich et al. 2000, Tura & Robards 2002, Robards 2003, Pérez-Jiménez et al. 2008).

Κατά την εκχύλιση πολικών συστατικών, μη πολικοί διαλύτες όπως το εξάνιο και ο πετρελαϊκός αιθέρας μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση από το διάλυμα μη πολικών συστατικών όπως τα. καροτενοειδή, οι χλωροφύλλες και τα λιπίδια (Tura & Robards 2002, Robards 2003). Τερπενοειδείς ενώσεις των φύλλων της ελιάς όπως το ολεανολικό οξύ, το ουρσολικό οξύ, το μασλινικό οξύ, η ουβαόλη και η ερυθροδιόλη εκχυλίζονται, συνήθως, με αιθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα ή διχλωρομεθάνιο. Ακόμη, υγρό

CO<sub>2</sub> σε υπερκρίσιμη κατάσταση παρουσία κατάλληλων τροποποιητών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για την παραλαβή από φύλλα ελιάς τόσο πολικών, όσο και μη πολικών συστατικών (Le Floch et al. 1998, De Lucas et al. 2002, Luque de Castro & Jarpón-Luján 2006).

Αξίζει ακόμη ιδιαίτερα να επισημανθεί, ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από ένα φυτικό υλικό, επηρεάζεται άμεσα από την αναλογία φυτικού υλικού/μέσου, την διαθέσιμη επιφάνεια επαφής του υλικού με το μέσο, αλλά και τον χρόνο και την θερμοκρασία εκχύλισης (Tura & Robards 2002, Wang & Weller 2006). Ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες και παρατεταμένοι χρόνοι εκχύλισης πρέπει να αποφεύγονται, για λόγους προστασίας θερμοευαίσθητων και ευοξειδωτών φυτικών συστατικών (Wang & Weller 2006). Μεμονωμένες, όμως, περιπτώσεις μπορεί να αποκλίνουν από τον παραπάνω γενικό κανόνα, καθώς κατά την ανάκτηση επιθυμητών συστατικών από φυτικό υλικό μετά από την έκθεσή του σε μικροκύματα ή τη μείωση της αναλογίας υλικού/μέσου παρατηρήθηκε ελάττωση της ανάκτησης. Η ελάττωση αυτή αποδόθηκε σε αδυναμία διάχυσης των μικροκυμάτων σε όλο τον όγκο του εκχυλιστικού μέσου (Wang & Weller 2006).

### **23 Μέθοδοι προσδιορισμού των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων**

Το ενδιαφέρον ανεύρεσης φυτικών πηγών πλούσιων σε βιοδραστικά συστατικά, οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης διαφόρων μεθόδων μέτρησης των συγκεντρώσεων των συστατικών αυτών. Έτσι, αναπτύχθηκαν απλές και εύχρηστες φωτομετρικές μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν την εκτίμηση του περιεχομένου ενός φυτικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες και φλαβονοειδή με επαρκή αξιοπιστία. Επιπλέον, διαμορφώθηκαν και συμπληρωματικές χρωματογραφικές, κυρίως, τεχνικές οι οποίες επιτρέπουν πληρέστερη αξιολόγηση του δυναμικού των υλικών αυτών.

#### **23.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολών**

Για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η μέθοδος Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1974, Visioli & Galli 2002, Carrasco-Pancorbo et al. 2005). Η ανάλυση αυτή λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον και στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με τις υδροξυλιομάδες των φαινολικών ενώσεων. Με την αντίδραση αυτή, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται, ενώ το αντιδραστήριο ανάγεται σε μίγμα έγχρωμων οξειδίων που



έχει μπλε χρώμα. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες, εκφράζεται σε mg πρότυπης φαινόλης ανά kg (ή g) εκχυλίσματος ή φυτικού υλικού.

Επισημαίνεται ότι η επιλογή της πρότυπης φαινόλης καθώς και η σχετική συγκέντρωση των επιμέρους φαινολών στο αναλύμενο δείγμα, μπορούν να επηρεάσουν ουσιαστικά το αποτέλεσμα, καθώς η μοριακή απορρόφηση ανά δραστική ομάδα φαινολών διαφοροποιείται (Blekas et al. 2002, Hrnčirik & Fritsche 2004). Το ουσιαστικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή εκλεκτικότητά της, καθώς η παρουσία αναγόντων σακχάρων, ασκορβικού οξέος, αμινοξέων, ιόντων σιδήρου και ψευδαργύρου μπορεί να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό. Μεταξύ των μειονεκτημάτων αυτής της μεθόδου είναι, ακόμη, η διάρκεια της ανάλυσης (>1h) και το σχετικά υψηλό κόστος του ειδικού αντιδραστηρίου. Παρά τα μειονεκτήματά της όμως, αυτά, που έχουν προκαλέσει σοβαρές κριτικές, η μέθοδος αυτή φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων.

### 23.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Για την εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών ενός φυτικού υλικού, χρησιμοποιούνται δύο, κυρίως, μέθοδοι που στηρίζονται στην συμπλοκοποίηση μετάλλων-φλαβονοειδών (Naczk & Shahidi 2006). Η διαφοροποίηση των μεθόδων αυτών έγκειται στην απουσία ή παρουσία του αντιδραστηρίου  $\text{NaNO}_2$  και την ύπαρξη ή όχι οξέος. Κατά την παλαιότερη προσέγγιση, στην οποία η συμπλοκοποίηση γίνεται απουσία  $\text{NaNO}_2$  (Voirin 1983, Harborne 1989), ο σχηματισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον, που πιθανώς αποτρέπει τη συμμετοχή κατεχολικών ομάδων στη συμπλοκοποίηση. Όμως, σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχολικές ομάδες του δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξυ-4-καρβονυλο ομάδες των δακτυλίων A και C. Για το λόγο αυτό, η εκλεκτικότητα και των δύο αυτών μεθόδων έχει, πολλές φορές, αμφισβητηθεί σε περιπτώσεις ανάλυσης φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχαν ενώσεις με δομικά και χημικά χαρακτηριστικά συγγενή με αυτά των φλαβονοειδών (Malešev & Kuntić 2007).

### 23.3 Προσδιορισμός των επιμέρους φαινολικών συστατικών

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των επιμέρους φαινολικών συστατικών ενός φυτικού υλικού μπορεί να υλοποιηθούν, κυρίως, με τη βοήθεια της υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Η χρωματογραφία αυτή πραγματοποιείται με απολική στατική και πολική κινούμενη φάση, σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης. Η κινούμενη φάση αποτελείται συνήθως από νερό και έναν λιγότερο πολικό οργανικό διαλύτη

όπως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη, ενώ μικρή ποσότητα οξέος όπως οξικό, φωσφορικό ή μυρμηκικό οξύ, προστίθεται, πολλές φορές, στην κινούμενη φάση για επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού.

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των συστατικών στηρίζεται στα φάσματα απορρόφησης τους. Και αυτό γιατί δεν υπάρχει ένα κοινό μήκος κύματος που να επιτρέπει την εκλεκτική και βέλτιστη παρακολούθηση όλων των φαινολικών συστατικών. Επιπλέον, τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές των μοριακών συντελεστών απορρόφησης τους (Tsimidou et al. 1992, Robards 2003). Αυτοί είναι και οι λόγοι για τους οποίους οι ανιχνευτές συστοιχίας διόδων έχουν αποδειχθεί απαραίτητα αναλυτικά εργαλεία για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών συστατικών. Η έλλειψη διαθέσιμων προτύπων, το κόστος τους και οι παραπλήσιες φασματοσκοπικές ιδιότητες πολλών συστατικών, κατέστησαν, επιπλέον, αναγκαία την αξιοποίηση και άλλων ανιχνευτών όπως του φθορισμού, της φασματομετρίας μαζών και του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Robards 2003, Carrasco-Pancorbo et al. 2005, Luque de Castro & Japon-Lujan 2006, Bendini et al. 2007, Obied et al. 2007, Andrade et al. 2008).

Σε σύγκριση με την υδροχρωματογραφία, η αεριοχρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή μαζών αξιοποιείται πολύ λιγότερο στην ανάλυση των φαινολικών συστατικών των φυτικών υλικών. Και αυτό, γιατί η αεριοχρωματογραφία προϋποθέτει ότι όλες οι ουσίες που αναλύονται είναι πτητικές ή έχουν καταστεί, προηγουμένως, πτητικές με κατάλληλες αντιδράσεις (Robards 2003, Carrasco-Pancorbo et al. 2005, Luque de Castro & Japon-Lujan 2006). Εντούτοις, η αεριοχρωματογραφική μέθοδος βρίσκει ευρύτερη εφαρμογή στην ανάλυση των τριτερπενικών συστατικών.

#### **24. Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς**

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς έχει τα τελευταία χρόνια αποτελέσει αντικείμενο μελέτης διαφόρων ερευνητών (Soler-Rivas et al. 2000, Visioli & Galli 2002, Boskou et al. 2005, Boskou et al. 2006, Visioli et al. 2006, Khan et al. 2007).

Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίστηκε στη δοκιμή δέσμησης της συνθετικής ρίζας DPPH. Εφαρμογή της δοκιμής που στηρίζεται στην εκτίμηση της δέσμησης της κατιονικής ρίζας του ABTS έχει, επίσης, ανευρεθεί σε αρκετές μελέτες, ενώ άλλες δοκιμές εφαρμόζονται πολύ σποραδικά (Πίνακας 14).

**Πίνακας 14.** Δοκιμές εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς

Είδος δοκιμής	Βιβλιογραφικές αναφορές
Δοκιμή DPPH	Martins & Gordon 2001, Bouaziz & Sayadi 2005, Perez-Bonilla et al. 2006, Ferreira et al. 2007, Makris et al. 2007, Bouaziz et al. 2008, Buyukbalci & El 2008, Salta et al. 2007, Goulas et al. 2009, Mylonaki et al. 2009
Δοκιμή ABTS	Benavente-Garcia et al. 2000, Silva et al. 2006, Giao et al. 2007, Altiok et al. 2008

Εξαιτίας της μεγάλης διαφοροποίησης των συνθηκών ανάλυσης σε κάθε μελέτη, εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων για τη σειρά δραστηριότητας των διαφόρων εκχυλισμάτων ελιάς και των συστατικών τους, δεν είναι εφικτή. Η συνολική, όμως, αποτίμηση των ευρημάτων των διαφόρων μελετών, υποδεικνύει ότι τα πολικά, γενικά, εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς συνιστούν καλές πηγές αντιοξειδωτικών ουσιών, ενώ τα απολικά εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μικρή ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Perez-Bonilla et al. 2006).

Μεταξύ των διαφόρων συστατικών των φύλλων της ελιάς, σημαντική αντιοξειδωτική δράση έχει αποδοθεί τόσο σε πολικά συστατικά όπως η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά της, η ελαιοευρωπαϊνή και τα παράγωγά της, ο βερμπασκοζίτης, το καφεϊκό οξύ, η λουτεολίνη με τους γλυκοζίτες της, η ρουτίνη και η κερκετίνη, όσο και σε μη πολικά συστατικά όπως το ολεανολικό και ουρσολικό οξύ. Συγκριτική μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολικών εκχυλισμάτων ελιάς και των επιμέρους συστατικών τους και, συγκεκριμένα, της ελαιοευρωπαϊνής, της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης, της λουτεολίνης και του 7-Ο-γλυκοζίτη της, καθώς και του βερμπασκοζίτη, έδειξε ότι τα πολικά εκχυλίσματα παρουσίαζαν διπλάσια, περίπου, ικανότητα δέσμευσης της ρίζας ABTS σε σχέση με την ελαιοευρωπαϊνή (Benavente-Garcia et al. 2000). Η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης βρέθηκε να είναι ίση με αυτήν των εκχυλισμάτων, ενώ ο βερμπασκοζίτης, η λουτεολίνη και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της παρουσίασαν, επίσης, σημαντική αντιοξειδωτική δράση που ήταν, όμως, μικρότερη από αυτών των εκχυλισμάτων (Benavente-Garcia et al. 2000).

Άλλοι ερευνητές, συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική δράση πρότυπων ουσιών όπως η υδροξυτυροσόλη, η ελαιοευρωπαϊνή και το καφεϊκό οξύ με εκείνη διαφόρων πολικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, ανέφεραν ότι άλλα εκχυλίσματα παρουσίαζαν μικρότερη και άλλα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνη των πρότυπων ουσιών (Le Tutour & Guedon 1992, Bouaziz & Sayadi 2005).

Η υδροξυτυροσόλη, ουσία που προκύπτει από διάσπαση της ελαιοευρωπαϊνής και των παραγώγων της, έχει θεωρηθεί ως μια από τις πιο ισχυρές βιοδραστικές ουσίες των προϊόντων της ελιάς (Boskou et al. 2005, 2006). Και αυτό γιατί σχετικές έρευνες έδειξαν ότι

πολικά εκχυλίσματα που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε υδρόλυση με υδροχλωρικό οξύ και, επομένως, ήταν ιδιαίτερα πλούσια σε υδροξυτυροσόλη, παρουσίαζαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με πολικά εκχυλίσματα που δεν είχαν υποστεί υδρόλυση. Σημαντική αντιοξειδωτική δράση έχει αποδοθεί, επιπλέον, και στον γλυκοζίτη της υδροξυτυροσόλης, ο οποίος βρέθηκε να παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση μεγαλύτερη κατά 60% από εκείνη του trolox που αποτελεί το υδρόφιλο ανάλογο της βιταμίνης E (Chatterjee et al. 2007).

Αντιοξειδωτική δράση παραπλήσια με αυτήν της υδροξυτυροσόλης βρέθηκε να παρουσιάζει και η ελαιοευρωπαϊνή (Boskou 2006a, 2006b). Διατυπώθηκε, μάλιστα, η άποψη ότι η ουσία αυτή εμφάνιζε αντιοξειδωτική δράση η οποία ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες ήταν άλλοτε μικρότερη, άλλοτε ισοδύναμη και άλλοτε μεγαλύτερη από εκείνη της υδροξυτυροσόλης (Gordon et al. 2001, Goulas et al. 2009). Το άγλυκο συστατικό καθώς και η διαλδεϋδική μορφή της ελαιοευρωπαϊνής έχουν επιδείξει, επίσης, σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Paiva-Martins et al. 2003, Carrasco-Pancorbo et al. 2005).

Ο βερμπασκοζίτης βρέθηκε, ακόμη, να παρουσιάζει σημαντική ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Σχετικές, μάλιστα, μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα του βερμπασκοζίτη να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες ήταν 2-3 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της υδροξυτυροσόλης (Aldini 2006).

Υδροξυκινναμωμικά οξέα όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το χλωρογενικό οξύ βρέθηκαν, επίσης, να παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από κατεχίνες σε ίση συγκέντρωση (Medina et al. 2007), ενώ αντιοξειδωτική δράση καλύτερη από εκείνη του συνθετικού αντιοξειδωτικού BHA βρέθηκε να παρουσιάζει το καφεϊκό οξύ σε υδρόφοβα συστήματα (Medina et al. 2007).

Οι φλαβονοειδείς, γενικά, ουσίες των φύλλων της ελιάς βρέθηκαν, επίσης, να παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (Harvsteen 2002, Kosar et al. 2004). Έτσι, σε διάφορες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση ορισμένων φλαβονοειδών όπως η ρουτίνη, η λουτεολίνη και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της καθώς και η κερκετίνη, ήταν, συχνά, μεγαλύτερη από εκείνη της υδροξυτυροσόλης και της ελαιοευρωπαϊνής (Nagy et al. 2006, Goulas et al. 2009). Σχετικές, μάλιστα, *in vitro* μελέτες ανέφεραν ότι η διαβάθμιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών ενός εκχυλίσματος φύλλων ελιάς ήταν ρουτίνη > κατεχίνη ≈ λουτεολίνη > υδροξυτυροσόλη > διοσμετίνη > καφεϊκό οξύ > βερμπασκοζίτης > ελαιοευρωπαϊνή > 7-Ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης ≈ βανιλινικό οξύ ≈ 7-Ο-γλυκοζίτης διοσμετίνης > 7-Ο-γλυκοζίτης απιγενίνης > τυροσόλη

>βανιλίνη. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν και στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική δράση των πιο δραστικών φλαβονοειδών όπως η ρουτίνη, η κατεχίνη και η λουτεολίνη, μπορεί να είναι ανάλογη με αυτή του λυκοπενίου και σχεδόν 2,5 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των βιταμινών C και E (Benavente-Garcia et al. 2000). Έχει, μάλιστα, διατυπωθεί και η άποψη ότι η δράση αυτή μπορεί να αυξηθεί όταν οι ουσίες αυτές βρεθούν όλες μαζί, εξαιτίας της συνεργού συμπεριφοράς τους (Benavente-Garcia et al. 2000).

Σε ό,τι αφορά τα μη πολικά συστατικά των φύλλων της ελιάς, διαπιστώθηκε ότι, εκτός από την α-τοκοφερόλη, τόσο το ολεανολικό όσο και το ισομερές του ουρσολικό οξύ παρουσίαζαν αντιοξειδωτική δράση (Yin & Chan 2007). Πρόσφατα, οι Yin και Chan (2007) διερευνώντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος σε λιποσώματα, διαπίστωσαν ότι τα οξέα αυτά παρουσίαζαν, σε ορισμένες συνθήκες, ικανότητα δέσμευσης ριζών του ανιόντος του σουπεροξειδίου, ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων με μεταλλικά ιόντα και αναγωγική ικανότητα που ήταν καλύτερες από εκείνες της βιταμίνης E.

## **25. Μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων**

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός φυτικού εκχυλίσματος μπορούν να αξιοποιηθούν όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων και μιγμάτων τους. Άλλες προσεγγίσεις αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος, είναι ο προσδιορισμός του περιεχομένου του σε συστατικά με αντιοξειδωτική δράση όπως είναι το σύνολο των φαινολών και το σύνολο των φλαβονοειδών.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

Σκοπός της ερευνητικής αυτής προσπάθειας ήταν η διερεύνηση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών κρέατος χοίρου μετά από προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς. Η διερεύνηση αυτή ολοκληρώθηκε σε 4 φάσεις:

- Στην πρώτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα βελτιστοποίησης της διαδικασίας παραλαβής των αντιοξειδωτικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς με σκοπό την παρασκευή εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Στη δεύτερη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε *α*-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C.
- Στην τρίτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε *α*-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C.
- Στην τέταρτη φάση, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε *α*-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν σε κατάψυξη στους -18 °C.

## A. ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ

### Διερεύνηση της δυνατότητας παρασκευής εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με αντιοξειδωτικές ιδιότητες

#### 1. Υλικά και μέθοδοι

##### 1.1. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικής καθαρότητας αιθανόλη, ακετόνη, διαιθυλαιθέρας, οξικός αιθυλεστέρας, πετρελαϊκός αιθέρας, διγλωρομεθάνιο, αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ανθρακικό νάτριο, νιτρώδες νάτριο, τριχλωριούχο αργίλλιο, φωσφορικό οξύ και υδροχλωρικό οξύ του οίκου Merck (Darmstadt, Γερμανία). Από τον ίδιο οίκο χρησιμοποιήθηκαν ακόμη υδροχρωματογραφικής καθαρότητας μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. *Παρα*-(διμεθυλαμινο)-κινναμαλδεΰδη (p-DMACA), 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ (Trolox), 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), διαμμωνιακό άλας του 2,2-αζινοδισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ (ABTS) και υπερθειικό κάλιο ήταν του οίκου Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Ελαιευρωπαϊνή, βερμπασκοζίτης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και υδροξυτυροσόλη ήταν του οίκου Extrasynthese (Genay, Γαλλία). Γαλλικό οξύ, ρουτίνη, λουτεολίνη, α-τοκοφερόλη και κατεχίνη ήταν του οίκου Sigma -Aldrich GmbH (Sternheim, Γερμανία).

##### 1.2. Φυτικό υλικό

Η ελιά είναι δέντρο που χαρακτηρίζεται από δύο περιόδους βλάστησης φύλλων. Στις κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας, οι περίοδοι αυτές βλάστησης των φύλλων συμπίπτουν με τις εποχές της άνοιξης και του φθινοπώρου. Έτσι, η δειγματοληψία των φύλλων της ελιάς διενεργήθηκε μετά τη συγκομιδή του ελαιόκαρπου τον Νοέμβριο του 2009, από έναν ελαιώνα της περιοχής του Λιτοχώρου του Νομού Πιερίας. Τα συλλεχθέντα φύλλα προέρχονταν από ελαιόδεντρα (*Olea europaea* L.) της ποικιλίας Κορωνέϊκη και ήταν όλα φύλλα νέας βλάστησης με έντονο πράσινο χρώμα.

##### 1.3. Χημική ανάλυση (Proximate analysis) των φύλλων της ελιάς

Μετά τη συλλογή τους, δείγματα από τα φύλλα αυτά υποβλήθηκαν σε μια σειρά χημικών αναλύσεων σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από την AOAC (1984). Η



περιεκτικότητα σε υγρασία μετρήθηκε με ξήρανση των ομογενοποιημένων δειγμάτων σε αερόθερμο κλίβανο στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους (24 ώρες). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl χρησιμοποιώντας τον συντελεστή 6,25 για τη μετατροπή του αζώτου σε πρωτεΐνη. Η περιεκτικότητα σε λίπος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet, χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό αιθέρα ως διαλύτη εκχύλισης. Η περιεκτικότητα σε τέφρα μετρήθηκε υποβάλλοντας τα δείγματα σε αποτέφρωση σε κλίβανο 550 °C μέχρι σταθερού βάρους (6 ώρες). Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες υπολογίστηκε από την εκατοστιαία διαφορά του αθροίσματος της υγρασίας, της τέφρας, των πρωτεϊνών και του λίπους (Barminas et al. 1999). Οι πρωτεΐνες, το λίπος, οι υδατάνθρακες και η τέφρα εκφράστηκαν με βάση το νωπό βάρος των δειγμάτων, ενώ η περιεκτικότητα σε υγρασία με βάση τόσο το νωπό όσο και το ξηρό βάρος των δειγμάτων.

#### **1.4. Ξήρανση, άλεση και αποθήκευση των φύλλων της ελιάς**

Λαμβάνοντας υπόψη βιβλιογραφικές αναφορές για τις πιθανές επιπτώσεις των συνθηκών ξήρανσης, άλεσης και αποθήκευσης των φύλλων της ελιάς στην περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά συστατικά, τα συλλεχθέντα φύλλα πλύθηκαν επιμελώς και υποβλήθηκαν σε μια σειρά σχετικών δοκιμασιών.

Στην πρώτη από αυτές τις δοκιμασίες, μέρος των συλλεχθέντων φύλλων υποβλήθηκε σε ξήρανση σε αεροκλίβανο στους 40 °C για 2 μέρες και εξετάστηκε, στη συνέχεια, η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων των φύλλων αυτών σε σχέση με εκείνη των φρέσκων φύλλων. Στη δεύτερη δοκιμασία, μέρος των συλλεχθέντων φύλλων υποβλήθηκε σε άλεση και εξετάστηκε, στη συνέχεια, η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων των φύλλων αυτών σε σχέση με εκείνη φρέσκων φύλλων που είχαν υποβληθεί σε απλό τεμαχισμό. Στην τρίτη δοκιμασία, εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης (0, 1, 7, και 30 μέρες) στην αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων φρέσκων και αποξηραμένων φύλλων. Στην τέταρτη, πάλι, δοκιμασία εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης (20°C, -20°C) στην αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων φρέσκων και αποξηραμένων φύλλων που είχαν αποθηκευθεί για διάφορα χρονικά διαστήματα (0, 1, 7, και 30 μέρες).

#### **1.5. Εκχύλιση των φύλλων ελιάς**

Βιβλιογραφική ανασκόπηση των συνθηκών εκχύλισης των φύλλων της ελιάς υποδεικνύει ότι η παραλαβή των αντιοξειδωτικών συστατικών μπορεί να διενεργηθεί με χρήση

διαφόρων διαλυτών. Με στόχο τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης, διενεργήθηκε στη μελέτη αυτή συγκριτική εξέταση της εκχυλιστικής ικανότητας των συνηθέστερων πολικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών φαινολικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς. Έτσι εξετάστηκε η εκχυλιστική ικανότητα της μεθανόλης, της αιθανόλης, του ακετονιτριλίου και της ακετόνης καθώς και υδατικών διαλυμάτων τους σε διάφορες αναλογίες. Τα υδατικά διαλύματα της αιθανόλης εξετάστηκαν στην περιοχή αραιώσεων 30-80% (ό/ό), ενώ η εξέταση των άλλων διαλυτών περιορίστηκε στην αραιώση 50%. Στον ίδιο πειραματισμό εξετάστηκε, επιπλέον, και η εκχυλιστική ικανότητα του διαιθυλαιθέρα και του οξικού αιθυλεστέρα με βάση το σκεπτικό ότι λιγότερο πολικοί διαλύτες θα έπρεπε θεωρητικά να είναι περισσότερο κατάλληλοι για την εκχύλιση των λιπόφιλων φαινολών.

Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε σ' αυτήν την εξέταση, τα φύλλα της ελιάς υποβλήθηκαν αρχικά σε μια διαδικασία που απέβλεπε στην απομάκρυνση της περιεχόμενης χλωροφύλλης. Για το σκοπό αυτό, τα συλλεχθέντα φύλλα πλύθηκαν επιμελώς και υποβλήθηκαν σε ξήρανση σε αεροκλίβανο στους 40 °C για 2 μέρες. Μετά τη ξήρανσή τους, τα φύλλα υποβλήθηκαν σε άλεση (διάμετρος κόκκων <2 mm) με μύλο (IKA, M 20, το IKA, Staufen, Germany) και δείγμα βάρους περίπου 15 g ζυγίστηκε σε κωνική φιάλη των 250 ml και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα όπου υποβλήθηκε για 15 λεπτά σε έντονη ανατάραξη με 100 ml διχλωρομεθανίου. Μετά την ανατάραξη, το περιεχόμενο της φιάλης διηθήθηκε μέσα από χάρτινο φίλτρο Whatman No 1 και το διήθημα απορρίφθηκε. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε άλλες 3 φορές στην ίδια διαδικασία ανατάραξης με 100 ml διχλωρομεθανίου και διήθησης, προκειμένου να απομακρυνθεί από το δείγμα η περιεχόμενη χλωροφύλλη (Mylonaki et al. 2008).

Μετά τη διαδικασία αυτή, ποσότητα περίπου 5 g από το απαλλαγμένο χλωροφύλλης ξηρό φυτικό υλικό ζυγίστηκε μέσα σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 250 ml που ήταν εφοδιασμένη με γυάλινο πώμα και περιείχε τον διαλύτη εκχύλισης, που ήταν διαφορετικός σε κάθε πειραματισμό, σε ποσότητα 100 ml. Οι εκχυλίσεις διενεργήθηκαν απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας μαγνητικούς αναδευτήρες που λειτουργούσαν σε χαμηλή ταχύτητα για 4 συνολικά ώρες, σύμφωνα με τη μέθοδο των Mylonaki et al. (2008) όπως αυτή τελικά τροποποιήθηκε. Όταν οι εκχυλίσεις ολοκληρώθηκαν, το περιεχόμενο των φιαλών διηθήθηκε διαμέσου χάρτινου φίλτρου Whatman No 1 και τα διηθήματα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών.

### ***1.6. Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς***

Η ποσότητα των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα των αποξηραμένων φύλλων ελιάς προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu των Singleton et al. (1999) μετά από κατάλληλη τροποποίηση. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ποσότητα εκχυλίσματος όγκου 0,1 ml μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml και αναμίχθηκε με 6,4 ml αποσταγμένου νερού και 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με τη βοήθεια κυκλομίκτη (Vortex apparatus, Scientific Industries, Inc., Model K-550-GE). Το μείγμα αφήθηκε σε ηρεμία για 3 min και μετά την προσθήκη 3 ml από υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου περιεκτικότητας 7,5%, επώαστηκε για άλλα 60 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 2000g για 5 min και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου υγρού στα 760 nm σε φωτόμετρο (Spectrophotometer Shimadzu, Model UV-160A, Kyoto, Japan). Στο σημείο αυτό αξίζει να διευκρινιστεί ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που είναι μίγμα μολυβδαινικού νατρίου, βολφραμικού νατρίου και φωσφορικού οξέος, προκαλεί οξειδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονο σχηματισμό του αντίστοιχου συμπλόκου μολυβδαινίου-βολφραμίου που έχει χαρακτηριστική μπλε χρώση. Επισημαίνεται ότι η οξειδωση των φαινολικών ιόντων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu αφορά το σύνολο των φαινολικών ενώσεων και, επομένως, δεν επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών.

Κατά την εφαρμογή της μέθοδου Folin-Ciocalteu, το σύνολο των φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος/g ξηρών φύλλων. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ. Το πρότυπο αυτό διάλυμα παρασκευάζεται ζυγίζοντας περίπου 20 mg γαλλικού οξέος μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και συμπληρώνοντας μέχρι τη χαραγή με 60% υδατικό διάλυμα αιθανόλης. Ποσότητες 0,05-0,25 ml από αυτό το διάλυμα, που αντιστοιχούν σε 20-100 μg γαλλικού οξέος, μεταφέρονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 15 ml, αραιώνονται στα 6,5 ml με αποσταγμένο νερό, αναμιγνύονται με τη βοήθεια κυκλομίκτη με 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, αφήνονται σε ηρεμία για 3 min, ακολουθεί η προσθήκη 3 ml από υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου περιεκτικότητας 7,5% και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για άλλα 60 min στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης του υπερκείμενου υγρού στα 760

nm. Η ποσότητα του συνόλου των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα υπολογίζεται σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο αποξηραμένων φύλλων, με βάση την πρότυπη αυτή καμπύλη αναφοράς ( $y=a+bx$ , όπου  $y$  είναι η τιμή της απορρόφησης,  $a$  το σημείο τομής της καμπύλης με τον άξονα των  $y$ ,  $b$  η κλίση της καμπύλης και  $x$  η ποσότητα του γαλλικού οξέος σε mg) λαμβάνοντας υπόψη και τις αραιώσεις του δείγματος

### **1.7. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς**

Για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα των φύλλων χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μορφή της μεθόδου των Kim et al. (2003) που βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκων ενώσεων των φλαβονοειδών με ιόντα τρισθενούς αργιλίου. Εν συντομία, ένα κλάσμα (1 ml) από το εκχύλισμα αναμείχθηκε με 0,4 ml απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,03 ml διαλύματος 5%  $\text{NaNO}_2$  και το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 0,03 ml διαλύματος 10%  $\text{AlCl}_3$  και το μίγμα αφέθηκε να παραμείνει για ακόμη 5 λεπτά. Τέλος, 0,2 ml διαλύματος 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 0,24 ml απεσταγμένου νερού προστέθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης και η απορρόφηση του ροδόχρου διαλύματος μετρήθηκε στα 510 nm σε φωτόμετρο (Spectrophotometer Shimadzu, Model UV-160A, Kyoto, Japan) έναντι ενός τυφλού διαλύματος που παρασκευάστηκε κατά παρόμοιο τρόπο με αντικατάσταση του εκχυλίσματος από απεσταγμένο νερό. Η συνολική περιεκτικότητα των φλαβονοειδών υπολογίστηκε από καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας την κατεχίνη ως πρότυπη ουσία αναφοράς σε εύρος συγκεντρώσεων 10-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και εκφράστηκε σε ισοδύναμα mg κατεχίνης (CTE)/g ξηρών φύλλων ελιάς.

### **1.8. Προσδιορισμός ολικών φλαβανολών (κατεχίνη και επικατεχίνη) στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς**

Το σύνολο των φλαβανολών προσδιορίστηκε μετά από σχηματισμό συμπλόκου τους με *p*-DMACA, χρησιμοποιώντας μια βελτιστοποιημένη μεθοδολογία (Nigel and Glories, 1991). Εν συντομία, τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς (0,2 ml), κατάλληλα αραιωμένα με μεθανόλη, μεταφέρθηκαν σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης των 5 ml και αναμείχθηκαν με 0,5 mL διαλύματος 0,24 N HCl σε μεθανόλη, και 0,5 mL διαλύματος 0,2% *p*-DMACA σε μεθανόλη. Τα μίγματα αφέθηκαν να αντιδράσουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και η απορρόφηση τους μετρήθηκε στα 640 nm. Ένα τυφλό δείγμα παρασκευάστηκε επίσης με αντικατάσταση του δείγματος με μεθανόλη. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε

ισοδύναμα mg κατεχίνης (CTE)/g ξηρών φύλλων ελιάς.

### **1.9. Υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς**

Η υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα Shimadzu (Model UFLC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) το οποίο αποτελούνταν από μία αντλία (LC-20AD), έναν εξαερωτή (DGU-20A5), ένα σύστημα αυτόματης έγχυσης δειγμάτων (SIL-20AD), έναν κλίβανο στήλης (CTO-20A), ένα φωτοανιχνευτή συστοιχίας διόδων (SPD-M20A) και ένα φθορισμομετρικό ανιχνευτή (RF 551). Τα χρωματογραφήματα διοχετεύονταν για επεξεργασία μέσω ενός διαύλου επικοινωνίας (CBM-20A) σε εξωτερικό υπολογιστή που διέθετε κατάλληλο λογισμικό LC Solution Version 1.21 SP1, Shimadzu, Japan, για την απόκτηση δεδομένων και μαθηματικούς υπολογισμούς.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί διενεργούνταν σε χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης με υλικό πλήρωσης Nucleosil 100-5, C<sub>18</sub>, (Macherey-Nagel, Germany), κάτω από συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, στους 30 °C. Η κινούμενη φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν όμοια με αυτήν που προτάθηκε από τους Savournin et al. (2001) και αποτελούνταν από 79% αποσταγμένο νερό οξυνισμένο σε pH 3 με διάλυμα 0,1 M φωσφορικό οξύ (1000/2,3, ό/ό) και από 21% ακετονιτρίλιο οξυνισμένο με διάλυμα 0,1 M φωσφορικό οξύ (1000/2,3, ό/ό). Πριν από τη χρήση της, η κινούμενη φάση διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου 0,45 μm, απαερώθηκε με ήλιο και ρυθμίστηκε η ταχύτητα ροής της σε 1 ml/min. Πριν από την έγχυσή τους στη στήλη, τα εκχυλίσματα των δειγμάτων διηθήθηκαν διαμέσου σύριγγας εφοδιασμένης με PTFE φίλτρα 0.22 μm (Phenomenex, UK). Η ποσότητα έγχυσης του δείγματος ήταν 5 μl, ενώ ο χρόνος χρωματογράφησης ρυθμίστηκε στα 30 min.

Η ανίχνευση των εκλούμενων συστατικών διενεργήθηκε με τη βοήθεια του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών καθώς και του φθορισμομετρικού ανιχνευτή. Με τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, η καταγραφή των χρωματογραφημάτων γινόταν στα 245 nm που είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος για την ανίχνευση των σεκοϊριδοειδών όπως η ελαιοευρωπαϊνή, στα 280 nm που είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος για την ανίχνευση των φαινολών, καθώς και στα 335 nm που είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος για την ανίχνευση των φλαβονοειδών και των κινναμικού τύπου φαινολικών ουσιών. Ακόμη, η καταγραφή του UV-Vis φάσματος κάθε χρωματογραφικής κορυφής γινόταν με τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών στην περιοχή 200-450 nm.

Για τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή, επιλέχθηκαν μήκη κύματος (280 nm για τη διέγερση και 320 nm για την εκπομπή του φθορισμού) που ήταν χαρακτηριστικά της υδροξυτυροσόλης και της ελαιοευρωπαϊνης.

Οι εκλούμενες φαινολικές ουσίες αναγνωρίστηκαν από τη σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους με τους χρόνους πρότυπων ουσιών που αναλύθηκαν με τις ίδιες συνθήκες. Επιβεβαίωση της ταυτότητάς τους πραγματοποιήθηκε επίσης με βάση τα UV φάσματα που καταγράφηκαν με τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και, επιπλέον, με εφαρμογή της μεθόδου προσθήκης πρότυπων ουσιών. Για λόγους ποσοτικού προσδιορισμού, πρότυπα διαλύματα ελαιοευρωπαϊνης (50-1.500 µg/ml), 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης (5-25 µg/ml), βερμπασκοζίτη (25-100 µg/ml), 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (5-50 µg/ml), 4-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (5-50 µg/ml), λουτεολίνης (5-40 µg/ml), ρουτίνης (10-60 µg/ml) και υδροξυτυροσόλης (5-30 µg/ml) σε μεθανόλη, υποβλήθηκαν, επίσης, σε χρωματογραφική ανάλυση.

#### ***1.10. Προσδιορισμός της α-τοκοφερόλης σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς***

Για τον προσδιορισμό της α-τοκοφερόλης στα φύλλα ελιάς εφαρμόστηκε η μέθοδος των Botsoglou et al. (1998). Σύμφωνα με αυτήν, το δείγμα (0,5 g) ομογενοποιήθηκε με 100 µl διαλύματος πυροκατεχόλης και 5 ml ενός μεθανολικού διαλύματος KOH και, στη συνέχεια, σαπωνοποιήθηκε με επώαση σε υδρόλουτρο 80 °C για 15 λεπτά. Μετά την σαπωνοποίηση, προστέθηκαν 5 ml εξανίου και 1 ml νερού και το μίγμα, αφού αναμίχθηκε καλά, φυγοκεντρήθηκε στα 2000g επί 2 min. Ένα μέρος από την υπερκείμενη φάση εξατμίστηκε σε ρεύμα N<sub>2</sub> μέχρι ξηρού στους 30 °C. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε μεθανόλη και χρωματογραφήθηκε σε υδροχρωματογράφο (UFLC Shimadzu system, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) όπως περιγράφεται από τους Zapel & Csallany (1983). Η χρωματογραφική στήλη (15 cm x 0.46 cm) περιείχε Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 µm, ενώ η κινούμενη φάση ήταν μεθανόλη που διέρρεε τη στήλη με ταχύτητα ροής 1,5 ml/min. Η ανίχνευση της α-τοκοφερόλης γινόταν στα 292 nm, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός βασιζόταν στα ύψη των χρωματογραφικών κορυφών που καταγράφονταν καθώς και στην πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

#### ***1.11. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH•***

Η δοκιμασία DPPH όπως εφαρμόστηκε, αποτελεί μικρή τροποποίηση της μεθόδου που

περιγράφεται από τους Goupy et al. (1999). Αυτή η φασματοφωτομετρική δοκιμασία στηρίζεται στην αρχή ότι τα αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται στα εκχυλίσματα αντιδρούν και δεσμεύουν τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>, της οποίας η μείωση της συγκέντρωσης καταγράφεται από την ελάττωση της απορρόφησης στα 515 nm. Σε περίπτωση που όλη η ποσότητα της ρίζας DPPH<sup>•</sup> καταναλωθεί από τις αντιοξειδωτικές ουσίες, το χρώμα του αρχικού διαλύματος μεταβάλλεται από καστανοκόκκινο σε κίτρινο.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, ποσότητα 0,05 ml από κάθε εκχύλισμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου προστίθεται ποσότητα 1,95 ml μεθανολικού διαλύματος 60 μM DPPH<sup>•</sup> και ακολουθεί έντονη ανάμιξη σε κυκλομίκτη. Μετά την ανάμιξη, οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 30 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 515 nm (Shimadzu, Model UV-160A, Kyoto, Japan). Παράλληλα, διενεργείται ανάμιξη ποσότητας 0,05 ml από τον διαλύτη των εκχυλισμάτων, που χρησιμεύει ως μάρτυρας, με 1,95 ml μεθανολικού διαλύματος 60 μM DPPH<sup>•</sup> και φωτομέτρηση στα 515 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε επί τη βάση της μείωσης της απορρόφησης του DPPH, εκφραζόμενη ως εκατοστιαίο ποσοστό της απορρόφησης ενός τυφλού διαλύματος DPPH.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε ισοδύναμα mmol Trolox/g ξηρών φύλλων. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων μεθανολικών διαλυμάτων Trolox, το οποίο συνιστά το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E. Η περιοχή τελικών συγκεντρώσεων ήταν 0,08-1,28 mM Trolox. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση  $y=a+bx$  που εκφράζει την πρότυπη αυτή καμπύλη αναφοράς, όπου  $y$  είναι η τιμή της απορρόφησης,  $a$  το σημείο τομής της καμπύλης με τον άξονα των  $y$ ,  $b$  η κλίση της καμπύλης και  $x$  η ποσότητα του Trolox σε mmol ισοδύναμα Trolox (TE), λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις του δείγματος.

### ***1.12. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με τη δοκιμή δέσμησης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>***

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η δοκιμή δέσμησης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η δοκιμή αυτή διενεργήθηκε σύμφωνα με τη βελτιωμένη μέθοδο των Re et al. (1999), μετά από ελαφρά τροποποίηση. Η μέθοδος αυτή, που επίσης ονομάζεται και μέθοδος TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity),

είναι κατάλληλη για την εκτίμηση τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων ουσιών με αντιοξειδωτική δράση. Κατά τη μέθοδο αυτή σχηματίζεται, αρχικά, ένα κατιόν της ρίζας ABTS με πρασινογάλαζο χρώμα διαμέσου της αντίδρασης ενός υδατικού διαλύματος 7 mM ABTS με υδατικό διάλυμα 2,45 mM (τελική συγκέντρωση) υπερθειικού καλίου. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι και διαρκεί 12-16 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την παρασκευή του, το χρωμοφόρο είναι σταθερό για περισσότερο από 2 ημέρες όταν διατηρείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η προσθήκη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας στο χρωμοφόρο αυτό προκαλεί τον αποχρωματισμό του σε ένα βαθμό ο οποίος εξαρτάται από την αντιοξειδωτική δράση της ουσίας και εκτιμάται σε σχέση με την αντιοξειδωτική δράση του Trolox, το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπη ουσία.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, το διάλυμα του κατιόντος της ρίζας ABTS (χρωμοφόρο) αραιώνεται με μεθανόλη ώστε να παρουσιάζει απορρόφηση 0,7 στα 734 nm. Επιπλέον, δείγματα των εκχυλισμάτων αραιώνονται με μεθανόλη έτσι ώστε μετά από προσθήκη μιας ποσότητας 50 μl από κάθε εκχύλισμα σε 2,45 ml του αραιωμένου χρωμοφόρου, να προκαλείται μείωση της απορρόφησης κατά 20-80%. Οι μετρήσεις της απορρόφησης γίνονταν ακριβώς 1 min μετά την αρχική ανάμιξη, ενώ μετρήσεις της απορρόφησης των διαλυτών διενεργούνταν σε κάθε ανάλυση.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σε σχέση με το Trolox, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων μεθανολικών διαλυμάτων Trolox (συγκεντρώσεις 0-15 μM). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε σε ισοδύναμα Trolox ανά γραμμάριο αποξηραμένων φύλλων με βάση την εξίσωση  $y=a+bx$  που εκφράζει την πρότυπη αυτή καμπύλη αναφοράς, όπου  $y$  είναι η τιμή της απορρόφησης,  $a$  το σημείο τομής της καμπύλης με τον άξονα των  $y$ ,  $b$  η κλίση της καμπύλης και  $x$  η ποσότητα του Trolox σε mg, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις του δείγματος.

### **1.13. Στατιστική ανάλυση**

Για τη διενέργεια της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) και για τους ελέγχους των υποθέσεων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με χρήση του Levene test (Πετρίδης 2000). Σε περιπτώσεις που διαπιστώθηκε έλλειψη κανονικότητας ή ομοιογένειας των στοιχείων, εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός των πρωτογενών πειραματικών δεδομένων, ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις επανέφερε την



κανονικότητα και την ομοιογένεια διακύμανσης των στοιχείων (Πετρίδης 2000). Για τη διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς, καθώς και την επίδραση των διαλυτών εκχύλισης στην παραλαβή από τα φύλλα των φαινολικών ουσιών, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης διακύμανσης δύο κατευθύνσεων, με χρήση του γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model, Analysis of Variance, GLM-ANOVA).

## **2. Αποτελέσματα και συζήτηση**

### **2.1. Συλλογή των φύλλων**

Η ελιά είναι ένα αειθαλές δέντρο και έτσι φύλλα διαφόρων ηλικιών μπορούν να βρεθούν ταυτόχρονα στο φύλλωμά του. Στα ενήλικα δέντρα, η διάρκεια ζωής των φύλλων είναι μέχρι τρία έτη, μολονότι τα πιο πολλά φύλλα πέφτουν κατά τη διάρκεια του δεύτερου έτους της ζωής τους. Καθόλη όμως την καλλιεργητική περίοδο (από Μάρτιο έως Νοέμβριο), τα φύλλα βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της οποίας νέα φύλλα εμφανίζονται συνεχώς (Sanz-Cortes et al. 2002).

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, τα φύλλα που συγκεντρώθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν νέα/αναπτυσσόμενα φύλλα με έντονο πράσινο χρώμα. Και αυτό γιατί έχει αναφερθεί ότι τα φύλλα αυτά, ανεξάρτητα από την ποικιλία της ελιάς και την περίοδο συλλογής τους, περιέχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαιοευρωπαϊνης (Ranalli et al. 2006). Αντίθετα, τα κιτρινοπράσινα φύλλα και ιδιαίτερα τα κίτρινα φύλλα που είναι κοντά στο στάδιο πτώσης, εμφανίζουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ελαιοευρωπαϊνης, γεγονός που υποδεικνύει ότι το περιεχόμενο σε ελαιοευρωπαϊνή επηρεάζεται σημαντικά από το χρώμα και την ηλικία των φύλλων. Υποστηρίζεται ότι η ελαιοευρωπαϊνή αποδομείται σταδιακά με την πάροδο της ηλικίας των φύλλων εξαιτίας βιοχημικών μεταβολών στις οποίες το ενδογενές ένζυμο β-γλυκοσιδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Briante et al. 2001, Briante et al. 2002).

### **2.2. Επεξεργασία και αποθήκευση των φύλλων**

Έχοντας υπόψη ότι οι συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης των φύλλων θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη χημική σταθερότητα των περιεχόμενων φαινολικών ουσιών (Paiva-Martins et al. 2009), πρώτος στόχος της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση των αποτελεσμάτων της άλεσης (λεπτοκομμένα έναντι αλεσμένων φύλλων), της ξήρανσης (νωπά

έναντι αποξηραμένων φύλλων), της διάρκειας αποθήκευσης (0, 1, 7, και 30 ημέρες) και της θερμοκρασίας αποθήκευσης (20 °C έναντι -20 °C) μόνων ή σε συνδυασμούς επί της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φύλλων, όπως αυτή εκφράζονταν με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup>.

Παρατηρήθηκε ότι η άλεση και η αποθήκευση για 1 ημέρα στους 20 °C των φρέσκων φύλλων είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση ( $P \leq 0,05$ ) της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας από 0,84 σε 0,34 mmol TE/g ξηρών φύλλων (Πίνακας A1).

**Πίνακας A1.** Επίδραση της άλεσης καθώς και της διάρκειας και της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμή DPPH<sup>•</sup> των φύλλων ελιάς

	Ημέρες αποθήκευσης	Θερμοκρασία αποθήκευσης	DPPH <sup>•</sup> , mmol TE/g ξηρών φύλλων*
Φρέσκα φύλλα	0	20 °C	0,84±0,07 <sup>a</sup>
Αλεσμένα φρέσκα φύλλα	1	20 °C	0,34±0,05 <sup>b</sup>
Αλεσμένα φρέσκα φύλλα	1	-20 °C	0,81±0,04 <sup>a</sup>
Αλεσμένα φρέσκα φύλλα	7	-20 °C	0,67±0,04 <sup>c</sup>
Αλεσμένα ξηρά φύλλα	1	20 °C	1,45±0,06 <sup>d</sup>
Αλεσμένα ξηρά φύλλα	7	20 °C	1,39±0,08 <sup>d</sup>
Αλεσμένα ξηρά φύλλα	30	20 °C	1,48±0,04 <sup>d</sup>
Αλεσμένα ξηρά φύλλα	30	-20 °C	1,42±0,06 <sup>d</sup>

\* Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 μετρήσεις.

<sup>a,b,c,d</sup> Τιμές στην ίδια στήλη με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ( $P > 0,05$ )

Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν ήταν σημαντική (από 0,84 σε 0,81 mmol TE/g ξηρών φύλλων) όταν τα αλεσμένα φρέσκα φύλλα αποθηκεύονταν για 1 ημέρα στους -20 °C και όχι στους 20 °C. Σε περίπτωση που η αποθήκευση των φύλλων στους -20 °C επιμηκυνόταν από 1 σε 7 ημέρες, η αντιοξειδωτική ικανότητα των λεπτοκομένων φρέσκων φύλλων μειωνόταν ( $P \leq 0,05$ ) από 0,81 σε 0,67 mmol TE/g ξηρών φύλλων.

Όταν τα φρέσκα φύλλα υποβάλλονταν, πριν από την άλεσή τους, σε ξήρανση στους 40 °C για 2 ημέρες και στη συνέχεια αποθηκεύονταν για 1 ημέρα στους 20 °C, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα παρουσίαζε αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) από 0,84 σε 1,45 mmol TE/g ξηρών φύλλων. Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των φύλλων δεν μεταβαλλόταν ( $P > 0,05$ ) ακόμη και όταν η διάρκεια αποθήκευσής τους στους 20 °C παρατεινόταν σε 7 ημέρες (1,39 mmol TE/g ξηρών φύλλων) ή σε 30 ημέρες (1,48 mmol TE/g ξηρών φύλλων), αλλά και ακόμη όταν τα φύλλα αυτά αποθηκεύονταν στους -20 °C για 30 ημέρες (1,42 mmol TE/g ξηρών φύλλων). Η σταθερότητα αυτή των αλεσμένων και αποξηραμένων φύλλων θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαδικασία ξήρανσης η οποία είχε τη δυνατότητα να απενεργοποιεί τη δράση των οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων εμποδίζοντας, έτσι, την αποδόμηση των αντιοξειδωτικών συστατικών των φύλλων. Επιπλέον έχει διατυπωθεί η

άποψη ότι η αποξηράνση των φύλλων όχι μόνο μειώνει τη δραστηριότητα του νερού και μειώνει την ενζυματική καταστροφή μερικών πολυφαινολών αλλά επίσης ευνοεί και την σύνθεση της ελαιοευρωπαϊνης (Paiva-Martins & Gordon 2001).

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα Α1 συνάγεται το συμπέρασμα ότι η ξήρανση των νωπών φύλλων ελιάς στους 40 °C για 2 ημέρες πριν από την άλεσή τους μπορεί να ενισχύσει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα όπως αυτή εκφράζεται με τη δοκιμή δέσμησης της ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες άλλων ερευνητών (Paiva-Martins et al. 2009) οι οποίοι ανέφεραν ότι η αποθήκευση φύλλων ελιάς που είχαν αποξηραθεί στους 37 °C επί 2 ημέρες πριν από την άλεσή τους, δεν είχε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις της ελαιοευρωπαϊνης στα φρέσκα φύλλα. Ξήρανση φρέσκων φύλλων ελιάς στους 40 °C επί 2 ημέρες έχει επίσης πρόσφατα προταθεί και από άλλους ερευνητές (Silva et al. 2006).

### **2.3. Εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς**

Διάφοροι διαλύτες και διαδικασίες εκχύλισης έχουν προταθεί για την παραλαβή των πολυφαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς. Μη πολικοί διαλύτες όπως ο διαιθυλαιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας καθώς και πολικοί διαλύτες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη και/ή τα υδατικά τους διαλύματα σε διάφορες αναλογίες έχουν δοκιμαστεί για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς με χρήση διαφόρων συνδυασμών χρόνων εκχύλισης και θερμοκρασίας (Savournin et al. 2001, Briante et al. 2002, Bouaziz & Sayadi 2005, Meirinhos et al. 2005, Japon-Lujan et al. 2006b, Silva et al. 2006, Ferreira et al. 2007, Ciou et al. 2007, Paiva-Martins et al. 2007, Salta et al. 2007, Papoti & Tsimidou 2009, Lee et al 2009, Hayes et al. 2011). Ωστόσο, η χρήση αυτών των διαλυτών εκχύλισης έχει συχνά οδηγήσει σε μεγάλες διακυμάνσεις σε ό,τι αφορά το είδος και την ποσότητα των ανακτηθέντων πολυφαινολικών συστατικών (Lesage-Meessen et al. 2001). Αν και θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι τέτοιες μεγάλες διακυμάνσεις θα μπορούσαν να οφείλονται σε γεωγραφικούς, εποχιακούς, γενετικούς ή μεθοδολογικούς παράγοντες (Romero et al. 2002), εντούτοις δεν είναι δυνατόν να αποκλειστεί και η πιθανότητα ότι σημαντικό μέρος αυτής της διακύμανσης οφειλόταν στη διαδικασία εκχύλισης των πολυφαινολικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς.

Η επιλογή της διαδικασίας εκχύλισης συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών εκχύλισης, του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας εκχύλισης θεωρείται πολύ κρίσιμη διαδικασία για την παραλαβή, γενικά, των πολυφαινολικών συστατικών από φρούτα και λαχανικά

(Robards 2003). Και αυτό γιατί η ανάκτηση πολυφαινολών από φυτικά υλικά επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τον διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση. Η χημική δομή καθεμιάς από αυτές τις φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα η πολικότητα του μορίου τους παίζει καθοριστικό ρόλο στην αύξηση της διαλυτότητας αυτών των ενώσεων και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την εκχυλισσιμότητα τους και, κατά συνέπεια, την αποτελεσματικότητα των διαλυτών εκχύλισης (Allothman et al. 2009). Συνεπώς, είναι δύσκολο να αναπτυχθεί μια πρότυπη διαδικασία εκχύλισης που να είναι κατάλληλη για την εκχύλιση όλων των φαινολικών ενώσεων από τα φυτά.

Στην παρούσα μελέτη, διενεργήθηκε συγκριτική διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων πολικών διαλυτών όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο, που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση των πολυφαινολικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς. Λαμβάνοντας, όμως, υπόψη ότι οι λιγότερο πολικοί διαλύτες θεωρούνται πλέον κατάλληλοι για την εκχύλιση των λιπόφιλων φαινολών, διάφοροι απολικοί διαλύτες όπως ο διαιθυλαιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας συμπεριλήφθηκαν, επίσης, σ' αυτήν την αξιολόγηση. Τα υδατικά διαλύματα της αιθανόλης εξετάστηκαν στην περιοχή αραιώσεων 30-80% (ό/ό), ενώ τα διαλύματα των άλλων πολικών διαλυτών στην αραιώση 50%. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα του πλέον κατάλληλου διαλύτη εξετάστηκε σε διάφορους χρόνους εκχύλισης. Οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό μαγνητική ανατάραξη σε χαμηλή ταχύτητα για 4 ώρες στο σκοτάδι, χρησιμοποιώντας κωνικές φιάλες των 250-ml που περιείχαν 5 g ξηρών φύλλων ελιάς απαλλαγμένων χλωροφύλλης και 100 ml από κάθε διαλύτη, σύμφωνα με τη μέθοδο των Mylonaki et al. (2008) μετά από κάποιες τροποποιήσεις.

**Πίνακας Α2.** Η εκχυλιστική ικανότητα διαφόρων διαλυτών στην παραλαβή των πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς

Διαλύτες εκχύλισης	Σύνολο φαινολών, mg GAE/g ξηρών φύλλων
<i>Μη πολικοί διαλύτες</i>	
Διαιθυλαιθέρας	3,6 ± 0,8 <sup>a</sup>
Οξικός αιθυλεστέρας	8,2 ± 1,1 <sup>b</sup>
<i>Πολικοί διαλύτες</i>	
Υδατική μεθανόλη, 50%	32,4 ± 0,6 <sup>c</sup>
Υδατική ακετόνη, 50%	44,3 ± 1,0 <sup>d</sup>
Υδατικό ακετονιτρίλιο, 50%	51,4 ± 1,4 <sup>e</sup>
Υδατική αιθανόλη, 30%	23,1 ± 0,6 <sup>f</sup>
Υδατική αιθανόλη, 40%	39,1 ± 0,8 <sup>g</sup>
Υδατική αιθανόλη, 50%	30,7 ± 0,9 <sup>c</sup>
Υδατική αιθανόλη, 60% (βέλτιστος διαλύτης)	45,2 ± 1,1 <sup>d</sup>
Υδατική αιθανόλη, 80%	46,1 ± 1,3 <sup>d</sup>

\* Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 μετρήσεις.

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Τιμές στην ίδια στήλη με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05).

Τα αποτελέσματα (Πίνακας Α2) έδειξαν ότι η εκχυλιστική ικανότητα των πολικών διαλυτών ήταν πολύ υψηλότερη από εκείνη των λιγότερο πολικών διαιθυλαιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα. Αν και για ορισμένες φαινόλες έχουν αναφερθεί φτωχές ανακτήσεις από τον οξικό αιθυλεστέρα, συχνά προτείνεται η χρήση του για την εκχύλιση πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς (Ceccon et al. 2001).

Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι εκλεκτικός για μικρού και μέσου μοριακού βάρους φαινόλες (Visioli et al. 1999), επιτρέποντας εκχύλιση και καθαρισμό ταυτόχρονα, διευκολύνοντας την παραλαβή των απλών φαινολών (Lesage-Meessen et al. 2001) και τη διαδοχική παραλαβή φαινολικών κλασμάτων (Visioli et al. 1999). Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα από τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα στην εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς δεν ήταν ενθαρρυντικά.

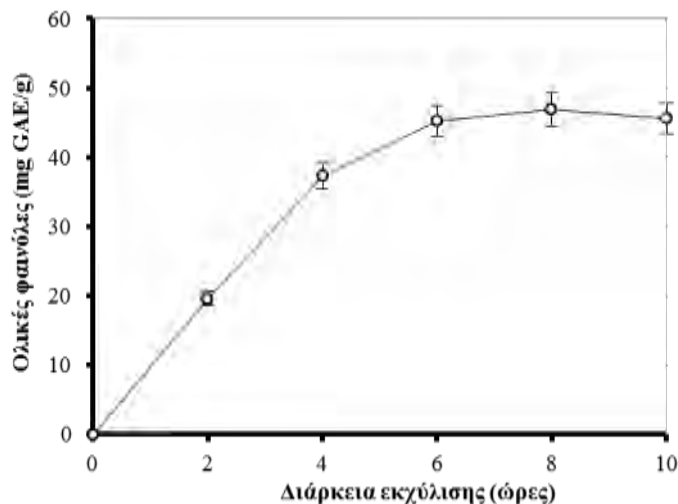
Ακόμη από τον Πίνακα Α2 διαπιστώθηκε ότι τα υδατικά διαλύματα του ακετονιτρίλιου και της ακετόνης παρουσίασαν τις καλύτερες ( $P \leq 0,05$ ) ανακτήσεις μεταξύ των πολικών διαλυτών που εξετάστηκαν. Μέχρι σήμερα, το ακετονιτρίλιο δεν έχει προταθεί ως διαλύτης εκχύλισης για φύλλα ελιάς, εξαιτίας, πιθανώς, της μικρής πτητικότητάς του αλλά και της τοξικότητάς του που αποτελούν σημαντικά εμπόδια για τη χρήση του σε κρέας και κρεατοσκευάσματα. Τα αποτελέσματα από την εξέταση των άλλων πολικών διαλυτών κατέδειξαν την υπεροχή των υδατικών διαλυμάτων της αιθανόλης στην παραλαβή των φαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς. Πέρα από τη μεγάλη εκχυλιστική της ικανότητα εξαιτίας του πολικού της χαρακτήρα, η αιθανόλη υπερείχε, επίσης, έναντι των άλλων πολικών διαλυτών και στον βαθμό τοξικότητάς της ο οποίος είναι πολύ μικρός. Και αυτό γιατί η χρήση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ως πρόσθετων για το κρέας, έκανε υποχρεωτική την ανάπτυξη διαδικασιών εκχύλισης που να βασίζονται σε σχετικά φθηνούς, εύκολα επανακτούμενους και μη τοξικούς διαλύτες όπως είναι τα υδατικά διαλύματα της αιθανόλης.

Η μελέτη του Πίνακα Α2 κατέδειξε, επιπλέον, ότι η εκχυλιστική ικανότητα των υδατοαιθανολικών διαλυμάτων δεν μπορούσε να συσχετιστεί με την περιεκτικότητά τους σε αιθανόλη. Και αυτό γιατί όταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του εκχυλιστικού μέσου αυξανόταν πάνω από το 50%, η εκχυλιστική του ικανότητα επίσης αυξανόταν, ενώ όταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη μειωνόταν κάτω από το 50%, η εκχυλιστική ικανότητα, αντίθετα, αυξανόταν. Αξίζει να επισημανθεί ότι σε περιεκτικότητες αιθανόλης 60% και 80%, η εκχυλιστική ικανότητα ήταν πολύ καλύτερη από αυτήν σε περιεκτικότητες αιθανόλης 30% και 40%.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έδειξαν ότι η υποβοηθούμενη από υπέρηχους εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών από τα φύλλα της ελιάς με υδατοαιθανολικά διαλύματα κορυφωνόταν σε περιεκτικότητα αιθανόλης 59% (Jaron-Lujan et al. 2006a). Επίσης, δεν έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που έδειξαν ότι η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς με υδατοαιθανολικά διαλύματα ήταν βέλτιστη σε περιεκτικότητα αιθανόλης 80% (Jaron-Luján et al. 2006b). Ακόμη, είναι σε συμφωνία με μελέτες που αναφέρουν ότι η διαλυτότητα των πολυφαινολών σε υδατοαιθανολικά διαλύματα θα μπορούσε να μεταβληθεί από αλλαγές στην περιεκτικότητα σε αιθανόλη, οι οποίες επηρεάζουν ιδιότητες όπως η πυκνότητα και η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη (Cacace & Mazza 2003). Και αυτό γιατί θεωρώντας ότι πολλά από τα φαινολικά συστατικά των φύλλων της ελιάς είναι γλυκοζίτες, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι οι διαλυτότητές τους μπορεί να είναι μεγαλύτερες σε περιεκτικότητες αιθανόλης 40% παρά 50%.

Από την άλλη πλευρά, η ελαιοευρωπαϊνή, η οποία είναι λιγότερο πολική από τους γλυκοζίτες, θα έπρεπε να είναι περισσότερο διαλυτή σε περιεκτικότητες αιθανόλης 60% παρά σε 50%. Στο σημείο αυτό θα πρέπει ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός ότι αν και η εκχυλιστική ικανότητα των υδατοαιθανολικών διαλυμάτων δεν διέφερε σε περιεκτικότητες αιθανόλης 60% και 80%, η περιεκτικότητα 60% θεωρήθηκε ως η βέλτιστη επιλογή γιατί, εξαιτίας του περισσότερο πολικού χαρακτήρα της, έδινε τη δυνατότητα να επιτευχθεί μια καλύτερη ισορροπία ανάκτησης μεταξύ των πολικών και των λιγότερο πολικών συστατικών των φύλλων της ελιάς.

Εκτός από τον διαλύτη εκχύλισης, η διάρκεια της εκχύλισης είναι μια άλλη μεταβλητή η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη διαδικασία εκχύλισης παρέχοντας επαρκή χρόνο για την πλήρη διαβροχή του δείγματος. Διερεύνηση της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στην εκχυλιστική ικανότητα υδατοαιθανολικού διαλύματος με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 60% έδειξε ότι η βέλτιστη εκχύλιση πολυφαινολών από φύλλα ελιάς με αυτόν τον διαλύτη επιτυγχανόταν μετά από μαγνητική ανάδευση επί 6 ώρες σε χαμηλή ταχύτητα στους 20 °C στο σκοτάδι.



**Εικόνα Α1.** Η επίδραση της διάρκειας εκχύλισης στην ικανότητα εκχύλισης πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς. Οι τιμές σε κάθε σημείο μέτρησης αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 3 αναλύσεων.

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν παρατείνοντας τη διάρκεια της εκχύλισης σε 8 ή και 10 ώρες δεν έδειξαν ( $P>0,05$ ) βελτίωση της εκχυλιστικής ικανότητας όπως άλλωστε φαίνεται και στην Εικόνα Α1.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε σχετική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Mylonaki et al. 2008) στις οποίες προτείνεται χρόνος εκχύλισης 5 ωρών χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Ωστόσο, έρχονται σε πλήρη αντίθεση με άλλες μελέτες (Jarón-Luján et al. 2006) στις οποίες συνιστάται εκχύλιση 10 ή και 24 ωρών με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 59%. Η αντίθεση αυτή είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αλλά ενδέχεται να οφείλεται στο μικρότερο όγκο του διαλύτη εκχύλισης (8 ml) που χρησιμοποιήθηκε για δείγμα φύλλων βάρους 1 g σε σύγκριση με τις άλλες μελέτες.

#### **2.4. Χημική σύσταση των φύλλων της ελιάς**

Η κατά προσέγγιση χημική ανάλυση (proximate analysis) των φύλλων της ελιάς έδωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα Α3. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ήταν γενικά σε συμφωνία με αυτά που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες (Feggeros et al. 1995, Martin et al. 2003, Makris et al. 2007), αν και σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Delgado-Oertinez et al. 2000, Boudhriou et al. 2009). Αυτή η ασυνέπεια θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία της ελιάς, η εποχή της συγκομιδής, η ηλικία των φύλλων και η λίπανση του φυλλώματος, οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν την περιεκτικότητα των

φύλλων σε πρωτεΐνες (Gomez Cabrera et al. 1992, Molina Alcaide & Nefzaoui 1996, Delgado Pertinez et al. 1998). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, τα φύλλα της ελιάς είναι δυνατόν να θεωρηθούν ως μια πλούσια φυσική πηγή πρωτεϊνών που δικαιολογεί τη χρήση τους στη διατροφή των ζώων (Martin Garcia et al. 2003).

**Πίνακας Α3.** Χημική σύσταση των φύλλων της ελιάς

Συστατικά	Συγκέντρωση*
Υγρασία (g/100 g φρέσκων φύλλων)	47,2 ± 0,4
Οργανική ύλη (g/100 g ξηρών φύλλων)	91,8 ± 0,7
Τέφρα (g/100 g ξηρών φύλλων)	8,2 ± 0,6
Πρωτεΐνες (g/100 g ξηρών φύλλων)	8,6 ± 0,1
Κυτταρίνες (g/100 g ξηρών φύλλων)	18,6 ± 0,2
Λίπη (g/100 g ξηρών φύλλων)	4,6 ± 0,1

\* Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 3 μετρήσεις.

### **2.5. Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε ολικές πολυφαινόλες, ολικά φλαβονοειδή, ολικές φλαβανόλες και α-τοκοφερόλη**

Η ποσότητα των ολικών πολυφαινολών στα αποξηραμένα και ελεύθερα χλωροφύλλης φύλλα ελιάς προσδιορίστηκε σε 45,2 mg GAE/g (Πίνακας Α4). Η τιμή αυτή είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης που δείχνουν τιμές 20,58 ή 40,27 mg GAE/g φρέσκων ή αποξηραμένων φύλλων ελιάς, αντίστοιχα (Makris et al. 2007). Ωστόσο, είναι πολύ μεγαλύτερη από την τιμή 26 mg GAE/g που αναφέρθηκε σε μια πρόσφατη μελέτη για αποξηραμένα φύλλα ελιάς της ποικιλίας Καλαμών (Botsoglou et al. 2012).

Μολονότι η περιεκτικότητα των πολυφαινολικών συστατικών στα φύλλα της ελιάς δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως διερευνηθεί, έχει βρεθεί ότι μπορεί να κυμαίνεται από 1,5 έως 7,0 g GAE/200 g φρέσκων φύλλων (Niaounakis & Halvadakis 2004). Αποκλίσεις από αυτήν την περιοχή τιμών θα μπορούσαν να αποδοθούν στην επίδραση της ποικιλίας της ελιάς, στην εποχή της συλλογής των φύλλων, στην ηλικία των φύλλων (Gómez Cabrera et al. 1992, Molina Alcaide & Nefzaoui 1996, Delgado Pertinez et al. 1998), καθώς και σε διαφορές στην πολικότητα των διαλυτών εκχύλισης (Luthria et al. 2006). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι χρησιμοποιώντας εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα ή μεθανόλη ως διαλύτες εκχύλισης, οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών που καταγράφονται είναι 0,18, 1,6 ή 16,8 mg GAE/g ξηρών φύλλων, αντίστοιχα (Le Floch et al. 1998), γεγονός που καταδεικνύει ότι, όσο υψηλότερη είναι η πολικότητα του διαλύτη, τόσο αυξάνεται η εκχυλιστική του ικανότητα.



**Πίνακας Α4.** Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε ολικές πολυφαινόλες, ολικά φλαβονοειδή, ολικές φλαβανόλες και  $\alpha$ -τοκοφερόλη

Συστατικά	Συγκέντρωση*
Ολικές πολυφαινόλες (mg GAE/g ξηρών φύλλων)	45,2 $\pm$ 1,1
Ολικά φλαβονοειδή (mg CTE/g ξηρών φύλλων)	15,32 $\pm$ 0,58
Ολικές φλαβανόλες (mg CTE/g ξηρών φύλλων)	0,03 $\pm$ 0,003
$\alpha$ -Τοκοφερόλη (μg/g ξηρών φύλλων)	198,6 $\pm$ 16,2

\* Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση από 3 μετρήσεις.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα Α4, η συνολική περιεκτικότητα φλαβονοειδών στα αποξηραμένα και ελεύθερα χλωροφύλλης φύλλα ελιάς προσδιορίστηκε σε 15,32 mg CTE/g. Αυτή η τιμή δεν διαφέρει πολύ από την τιμή 12,46 mg CTE/g που βρέθηκε πρόσφατα σε αποξηραμένα φύλλα ελιάς της ποικιλίας Καλαμών (Botsoglou et al. 2012). Επίσης, η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά στην τιμή 16,78 mg CTE/g που βρέθηκε σε αποξηραμένα φύλλα ελιάς, από άλλους ερευνητές (Makris et al. 2007).

Σε ό,τι αφορά τις φλαβανόλες οι οποίες αποτελούνται κυρίως από κατεχίνη και επικατεχίνη, η περιεκτικότητά τους στα αποξηραμένα και ελεύθερα χλωροφύλλης φύλλα ελιάς προσδιορίστηκε σε 0,03 mg CTE/g (Πίνακας Α4). Η τιμή αυτή που είναι σχετικά χαμηλή, βρίσκεται πολύ κοντά στην τιμή 0,021 mg CTE/g ξηρών φύλλων που ανακοινώθηκε από άλλους ερευνητές (Makris et al. 2007).

Από τον Πίνακα Α4 διαπιστώνεται, επίσης, ότι η περιεκτικότητα των φύλλων σε  $\alpha$ -τοκοφερόλη ήταν 198,6 μg/g ξηρών φύλλων. Η συγκέντρωση αυτή φαίνεται μεγάλη αλλά δεν είναι και πολύ μεγαλύτερη από την τιμή 316 nmol/g που είναι ισοδύναμη με 136,1 μg/g ξηρών φύλλων και ανακοινώθηκε από τους Mohamed et al. (2007). Η αφθονία των τοκοφερολών στα φύλλα συσχετίζεται με την παρουσία χρωστικών στους φυτικούς ιστούς όπου προστατεύουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης (Havauw et al. 2003).

## **2.6. Περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε επιμέρους φαινολικά συστατικά με υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων**

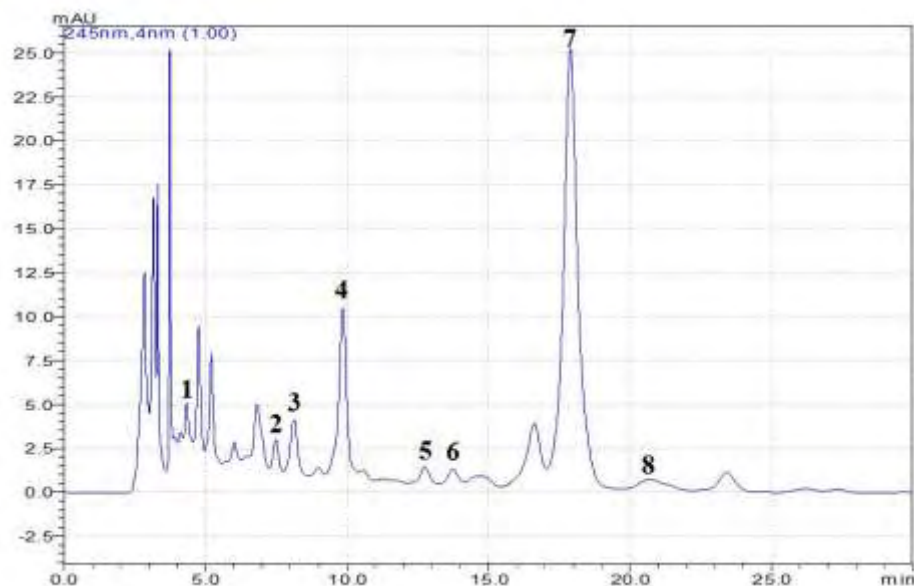
Η περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε επιμέρους φαινολικά συστατικά διερευνήθηκε με υγροχρωματογράφο (LC) εξοπλισμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών (DAD). Για την πληρέστερη διερεύνηση της σύστασης των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς σε φαινολικά συστατικά, η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγιναν σε διάφορα μήκη κύματος, αφού τα συστατικά αυτά παρουσιάζουν διαφορετικά μέγιστα απορρόφησης (Robards 2003).

Παρά το γεγονός ότι η χρησιμοποίηση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών παρείχε τη δυνατότητα παρακολούθησης όλων των μηκών κύματος, τα συμπεράσματα στηρίχθηκαν στις πληροφορίες που παρείχε η καταγραφή των χρωματογραφημάτων κυρίως στα 245 nm, 280 nm και 335 nm. Η καταγραφή στα 245 nm στόχευε στην παρακολούθηση της ελαιοευρωπαϊνης και των συναφών σεκοϊριδοειδών, ενώ στα 280 nm στην παρακολούθηση του συνόλου των φαινολικών συστατικών (απλών φαινολών, σεκοϊριδοειδών, φλαβονοειδών και παραγώγων του κινναμωμικού οξέος). Ακόμη, η καταγραφή στα 335 nm στόχευε στην εκλεκτική παρακολούθηση των φλαβονοειδών και των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος. Η χρησιμοποίηση, επιπλέον, του φθορισμομετρικού ανιχνευτή, χάρη στην υψηλή του ευαισθησία, επέτρεπε την εκλεκτική παρακολούθηση της υδροξυτυροσόλης και της ελαιοευρωπαϊνης (Ryan *et al.* 2001). Η παρακολούθηση αυτών των ενώσεων έγινε στα χαρακτηριστικά μήκη κύματος διέγερσης (280 nm) και εκπομπής φθορισμού (320 nm) των φαινολικών ενώσεων.

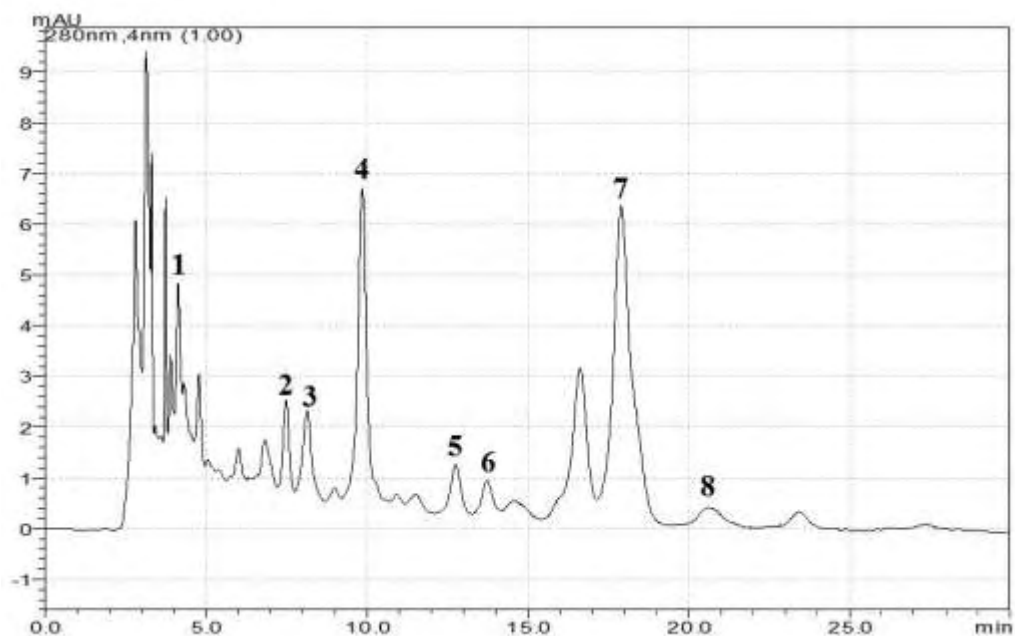
Παρόλα αυτά, η ταυτοποίηση των εκλούμενων συστατικών στάθηκε επίπονη διαδικασία, η ολοκλήρωση της οποίας απαίτησε διεξοδικές δοκιμές, εκτενή μελέτη βιβλιογραφικών στοιχείων και λεπτομερή ανάλυση χρωματογραφικών δεδομένων. Και αυτό γιατί τα περισσότερα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς φαίνεται ότι είναι δομικά συγγενή μεταξύ τους και παρουσιάζουν παρόμοιους χρόνους κατακράτησης και παραπλήσια φάσματα στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τελικά, η ταυτοποίηση των συστατικών βασίστηκε για τα περισσότερα από αυτά στους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα UV-Vis κάθε χρωματογραφικής κορυφής, στη σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα διαθέσιμων προτύπων, καθώς και σε βιβλιογραφικά δεδομένα.

LC-DAD ανάλυση του υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς έδειξε αρκετές κύριες χρωματογραφικές κορυφές, οι οποίες επί τη βάση των χρόνων κατακράτησής τους και των UV-Vis φασμάτων αναγνωρίστηκαν ως σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπαϊνη και βερμπασκοζίτης), φλαβόνες (λουτεολίνη, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονόλες (ρουτίνη), και υποκατεστημένες φαινόλες (υδροξυτυροσόλη).

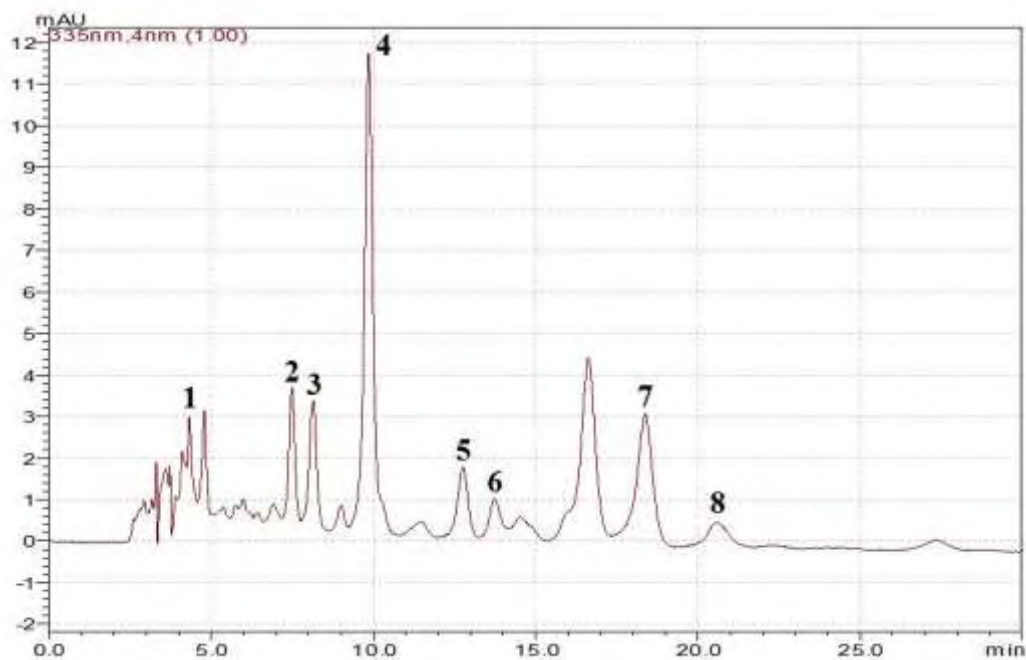
Αντιπροσωπευτικά υδροχρωματογραφήματα του υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στα 245, 280, 335 και 280/320 nm (λεκπομπής/λδιέγερσης) παρουσιάζονται στις Εικόνες A2, A3, A4 και A5, αντίστοιχα



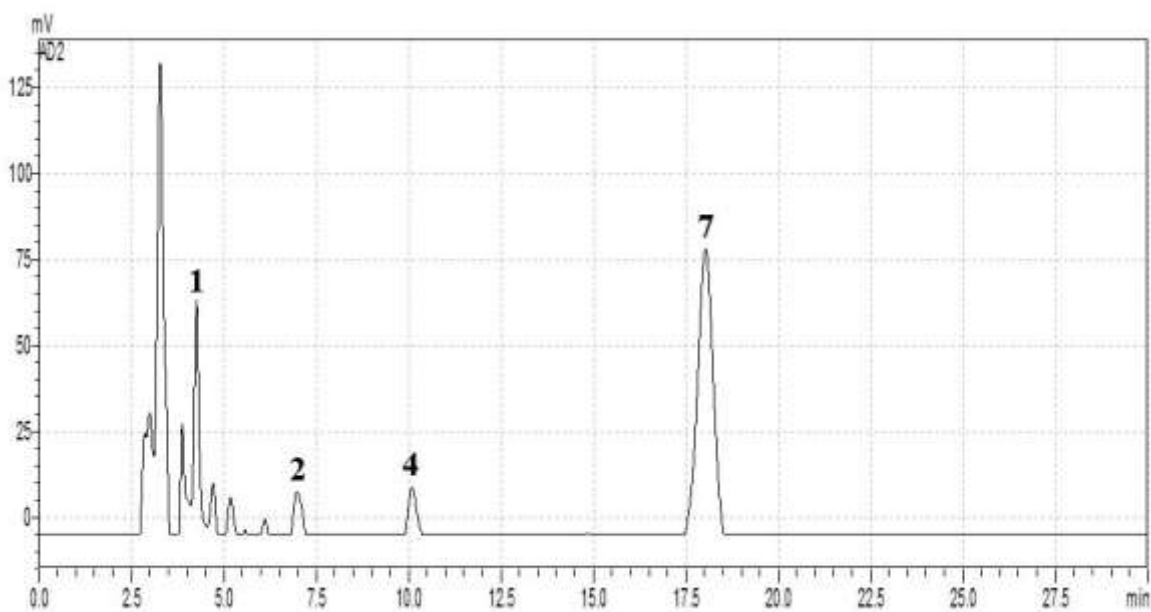
**Εικόνα Α2.** Αντιπροσωπευτικό υδροχρωματογράφημα υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στα 245 nm. Κορυφές: υδροξυτυροσόλη (1), ρουτίνη 2, βερμπασκοζίτης (3), 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (4), 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης (5), 4-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (6), ελαιουερωπαΐνη (7) και λουτεολίνη (8).



**Εικόνα Α3.** Αντιπροσωπευτικό υδροχρωματογράφημα υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στα 280 nm. Οι κορυφές στα διάφορα μήκη κύματος είναι όπως στην Εικόνα Α2.



**Εικόνα Α4.** Αντιπροσωπευτικό υδροχρωματογράφημα υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στα 335 nm. Οι κορυφές στα διάφορα μήκη κύματος είναι όπως στην Εικόνα Α2.



**Εικόνα Α5.** Αντιπροσωπευτικό υδροχρωματογράφημα υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς 280/320 nm (λεξc./λεμισ.). Οι κορυφές στα διάφορα μήκη κύματος είναι όπως στην Εικόνα Α2.

Κάτω από τις συνθήκες της ανάλυσης, η σειρά έκλουσης των κύριων συστατικών ακολουθούσε την παρακάτω πορεία. Αρχικά εκλουόταν η υδροξυτυροσόλη, ακολουθούσε η έκλουση της ρουτίνης, του βερμπασκοζίτη και των φλαβονοειδών 7-Ο-γλυκοζίτη της

λουτεολίνης, 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης και 4-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Την έκλυση αυτών διαδέχονταν η έκλυση του σεκοϊριδοειδούς ελαιοευρωπαϊνή και του φλαβονοειδούς λουτεολίνη. Οι χρόνοι κατακράτησης, οι συγκεντρώσεις και οι μέγιστες απορροφήσεις του υπεριώδους φάσματος των κύριων αυτών φαινολικών συστατικών παρουσιάζονται στον Πίνακα Α5.

**Πίνακας Α5.** Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα της ελιάς

Φαινολικές ενώσεις	Χρόνοι κατακράτησης, min	Συγκεντρώσεις,* mg/g ξηρών φύλλων	Μέγιστες UV απορροφήσεις, nm
Υδροξυτυροσόλη	4,2	1,45 ± 0,22	280
Ρουτίνη	7,4	2,21 ± 0,38	356, 254
Βερμπασκοζίτης	8,0	4,12 ± 0,44	335, 280, 250
7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της λουτεολίνης	10,0	3,06 ± 0,26	348, 266, 254
7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης	12,7	0,42 ± 0,12	338, 266
4- <i>O</i> -γλυκοζίτης της λουτεολίνης	13,7	0,89 ± 0,31	340, 268
Ελαιοευρωπαϊνή	18,3	32,18 ± 0,56	248, 280
Λουτεολίνη	20,7	1,82 ± 0,32	356, 254

\* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση από 3 μετρήσεις.

Όλες αυτές οι φαινολικές ενώσεις έχουν προηγουμένως ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (Altiok et al. 2008, Bouzaiz & Sayadi 2005, Briante et al. 2002, Pereira et al. 2007). Οι Benavente-García et al. (2000) ταυτοποίησαν πέντε ομάδες φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα της ελαιοευρωπαϊνής και του βερμπασκοζίτη που ανήκουν στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών, του 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, του 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης, των 7-γλυκοζιτών της διοσμετίνης, της λουτεολίνης και της διοσμετίνης που ανήκουν στην ομάδα των φλαβονών, της ρουτίνης που ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών, της κατεχίνης που ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών και της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης, της βανιλίνης, του βανιλινικού οξέος και του καφεϊκού οξέος που ανήκουν στην ομάδα των υποκατεστημένων φαινολών. Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, η ελαιοευρωπαϊνή ήταν η κυριότερη ένωση στα φύλλα της ελιάς ακολουθούμενη από την υδροξυτυροσόλη, τους γλυκοζίτες της λουτεολίνης και απιγενίνης, καθώς και τον βερμπασκοζίτη. Στο σημείο αυτό θα ήταν ίσως χρήσιμο να αναφερθεί, ότι η υδροξυτυροσόλη είναι ουσία πρόδρομη της ελαιοευρωπαϊνής, ενώ ο βερμπασκοζίτης είναι ένας συζευγμένος γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης και του καφεϊκού οξέος. Σε μερική συμφωνία με τα παραπάνω, οι Papoti & Tsimidou (2009) ανέφεραν ότι ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 4-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και η λουτεολίνη βρέθηκε να

αντιπροσωπεύουν περίπου το 60-70% της συνολικής περιεκτικότητας των φύλλων της ελιάς σε φλαβονοειδή συστατικά. Επίσης, οι Pereira et al. (2007) χαρακτήρισαν την ελαιοευρωπαϊνή και τον 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης ως τις φαινολικές ενώσεις που απαντούν στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς.

Σε μια άλλη μελέτη, οι ενώσεις που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια υγροχρωματογραφίας και φασματογραφίας μαζών (HPLC-MS) σε φρέσκα φύλλα ελιάς 10 διαφορετικών ποικιλιών ήταν η υδροξυτυροσόλη, η ρουτίνη, ο βερμπασκοζίτης, ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 4-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η ελαιοευρωπαϊνή και ο λιγκστροζίτης (Silva et al. 2006). Στη μελέτη αυτή βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων εξαιτίας, πιθανώς, των διαφορετικών ποικιλιών ελιάς, των διαφορετικών περιόδων συλλογής των φύλλων και των διαφορετικών διαδικασιών ξήρανσης (Briante et al. 2002). Μεταξύ των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή (Silva et al. 2006), ο βερμπασκοζίτης, ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και η ελαιοευρωπαϊνή είχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ η ελαιοευρωπαϊνή ανιχνεύθηκε σε δύο διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία στα δείγματα μιας ισομερούς μορφής της ένωσης αυτής. Η ισομερής αυτή ελαιοευρωπαϊνή, που ονομάστηκε ελαιοευρωζίτης, έχει επίσης εντοπιστεί στον καρπό της ελιάς (Ryan et al. 2001) αλλά και σε φύλλα της ελιάς (Savournin et al. 2001, Lee-Huang et al. 2003).

Δεν θα πρέπει να παραληφθεί να αναφερθούν τα αποτελέσματα και άλλων μελετών τα οποία υποδεικνύουν την ταυτοποίηση 5 φλαβονών (7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της διοσμετίνης, λουτεολίνη και διοσμετίνη), μιας φλαβονόλης (ρουτίνη) και μιας φλαβανόλης (κατεχίνη) σε φύλλα ελιάς 5 διαφορετικών ποικιλιών (Garcia et al. 2000). Οκτώ φλαβονοειδή και συγκεκριμένα ο 7,4-*O*-διγλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η ρουτίνη, ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 4-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η διοσμετίνη, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και προσδιοριστεί σε φύλλα ελιάς πορτογαλικών ποικιλιών (Meirinhos et al. 2005). Οι ενώσεις τυροσόλη, καφεϊκό οξύ και βερμπασκοζίτης ήταν παρούσες στα περισσότερα από τα δείγματα, αλλά σε μερικά από αυτά βρίσκονταν μόνο σε ίχνη. Η ρουτίνη και ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης δεν ανιχνεύονταν σε όλα τα δείγματα, αλλά και όταν ανιχνεύονταν βρίσκονταν σε μικρές ποσότητες. Αυτό σημαίνει ότι αυτές οι ενώσεις δεν θα πρέπει να θεωρούνται χαρακτηριστικές των φλαβονοειδών ενώσεων των φύλλων της ελιάς. Πρόσφατα, μια άλλη μελέτη (Hayes et al. 2011) υπέδειξε την παρουσία ελαιοευρωπαϊνης και βερμπασκοζίτη (σεκοϊριδοειδή), υδροξυτυροσόλης και

τυροσόλης (υποκατεστημένες φαινόλες), και 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης, και 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (φλαβόνες) σε εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς. Οι αναφερθείσες διακυμάνσεις στη σύνθεση των φαινολικών συστατικών των φύλλων θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορές στην εκχύλιση και στις αναλυτικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν και/ή την επίδραση της ποικιλίας της ελιάς (Benavente-García et al. 2000, Pereira et al. 2007, Kiritsakis et al. 2010, Mylonaki et al. 2008).

### **2.7. Αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της ελιάς**

Έχει αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση γενικά των φυτικών υλών βρίσκεται σε καλή συσχέτιση με το περιεχόμενό τους σε φαινολικές ενώσεις (Skerget et al. 2005). Ωστόσο, μεταξύ των φαινολών των φύλλων της ελιάς οι ορθο-δифαινόλες και ειδικά η υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Papadopoulos & Boskou 1991, Tsimidou et al. 1992, Baldioli et al. 1996). Αντίθετα, η τυροσόλη και άλλες μονοφαινόλες όπως τα οξέα παρα-υδροξυβενζοϊκό, ορθο-κουμαρικό και παρα-κουμαρικό, δεν είναι καλά αντιοξειδωτικά (Litridou et al. 1997). Ακόμη, πολυφαινόλες όπως τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή και οι υποκατεστημένες φαινόλες μπορούν να παρουσιάσουν συνεργική συμπεριφορά όταν αναμιχθούν, όπως έχει παρατηρηθεί σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με υψηλό περιεχόμενο σε ελαιευρωπαϊνή (Benavente-García et al. 2000). Επομένως, ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των φύλλων της ελιάς θα πρέπει πάντα να συνοδεύεται από εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους.

Η αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της ελιάς εκτιμήθηκε επί τη βάση τόσο της δοκιμής δέσμησης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> όσο και της δοκιμής δέσμησης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η προσέγγιση DPPH φαίνεται ότι συνιστά μια ταχεία και ακριβή μέθοδο για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων. Με την δοκιμή δέσμησης της ρίζας DPPH<sup>•</sup>, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς εκτιμήθηκε σε 1,45 mmol TE/g ξηρών φύλλων. Η τιμή αυτή είναι εντός της περιοχής τιμών 1,68 και 1,23 mmol TE/g που έχουν αναφερθεί από τους Mylonaki et al. (2008) και Makris et al. (2007), αντίστοιχα, για τα ξηρά φύλλα της ελιάς. Ωστόσο, είναι υψηλότερη από την τιμή 0,85 mmol TE/g ξηρών φύλλων που έχει σε προηγούμενη μελέτη μας (Botsoglou et al. 2012). Η υψηλότερη τιμή DPPH που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να οφείλεται στην καλύτερη διαδικασία εκχύλισης που επηρέασε την ποσότητα των πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών που εκχυλίστηκαν.

Η δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές (Miller et al. 2000) για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων φυτικών υλών, όπως μούρα (3,9 mmol TE/100 g), δημητριακά (1,2-3,5 mmol TE/100 g), κοινά φρούτα (1,2 mmol TE/100 g), λαχανικά (0,40 mmol TE/100 g), και πίτυρα ρυζιού (24,3 mmol TE/100 g). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της ελιάς με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> που βρέθηκε στη μελέτη αυτή ήταν αισθητά υψηλότερη από αυτές που προαναφέρθηκαν.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> χαρακτηρίζονται από μεγάλη επαναληψιμότητα και είναι συγκρίσιμα με εκείνα άλλων μεθόδων εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης όπως είναι η δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η προσέγγιση ABTS βασίζεται σε αντιδραστήρια ή χρωμοφόρα τα οποία είναι διαλυτά τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες και, επομένως, μπορούν να χρησιμεύσουν για ταυτόχρονη μέτρηση τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών. Εντούτοις, η δοκιμασία αυτή έχει επικριθεί γιατί το ABTS δεν αποτελεί μια φυσιολογική πηγή ελευθέρων ριζών και, ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατόν, ίσως, να αντιπροσωπεύει επακριβώς *in vivo* καταστάσεις (Prior et al. 2005).

Με τη δοκιμασία ABTS, η αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της ελιάς εκτιμήθηκε σε  $1,83 \pm 0,07$  mmol TE/g ξηρών φύλλων. Η τιμή αυτή είναι ελαφρώς μεγαλύτερη αλλά μπορεί να συγκριθεί με τις τιμές 1,67 (Botsoglou et al. 2012) και 1,52 (Botsoglou et al. 2010) TE mmol/g ξηρών φύλλων που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Η τιμή αυτή έρχεται επίσης σε συμφωνία με τη μελέτη των Benavente-García et al. (2000) οι οποίοι ανέφεραν τιμή ABTS ίση προς 1,58 mmol TE/g ξηρών φύλλων. Οι ερευνητές μάλιστα αυτοί διαπίστωσαν επιπλέον ότι η τιμή αυτή ήταν αυξημένη κατά 72% σε σχέση με τη μέση τιμή που θα μπορούσε θεωρητικά να προκύψει αν προσθέτονταν οι τιμές ABTS όλων των επί μέρους συστατικών των φύλλων της ελιάς. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι τα φαινολικά συστατικά των φύλλων της ελιάς όταν αναμιγνύονται παρουσιάζουν συνεργό συμπεριφορά στην αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί ότι η τιμή ABTS που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν μεγαλύτερη από εκείνες που αναφέρθηκαν από άλλους ερευνητές για τις βιταμίνες E (0,97 mmol TE/g ξηρών φύλλων) και C (0,99 mmol TE/g ξηρών φύλλων), γεγονός που καταδεικνύει ότι τα φύλλα της ελιάς που εξετάστηκαν στη μελέτη αυτή είχαν υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό από αυτές τις ενώσεις (Van den Berg et al. 1999).



## ΔΕΥΤΕΡΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ

**Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε α-λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C**

### 1. Υλικά και μέθοδοι

#### 1.1. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Οι διαλύτες αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, εξάνιο, πετρελαϊκός αιθέρας και διχλωρομεθάνιο, ήταν του οίκου Merck (Darmstadt, Γερμανία). Τα αντιδραστήρια ανθρακικό νάτριο, υδροξείδιο του καλίου, φωσφορικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, πυροκατεχόλη, 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), υδροχλωρική γουανιδίνη, 5,5'-διθειοδισ(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB), τριχλωροξικό οξύ, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και ουρία ήταν του οίκου Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Οι πρότυπες ουσίες α-τοκοφερόλη και αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) ήταν, επίσης, του οίκου Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### 1.2. Εκχύλισμα φύλλων ελιάς

Από ελαιόδεντρα (*Olea europaea* L.) της ποικιλίας Κορωνέϊκη συλλέχθηκαν αμέσως μετά τη συγκομιδή των καρπών το μήνα Νοέμβριο, φύλλα νέας βλάστησης με έντονο πράσινο χρώμα τα οποία, αφού πλύθηκαν επιμελώς με νερό, υποβλήθηκαν σε ξήρανση σε αεροκλίβανο στους 40 °C για 2 μέρες. Μετά τη ξήρανσή τους, τα φύλλα υποβλήθηκαν σε άλεση (διάμετρος κόκκων <2 mm) σε μύλο (IKA, M 20, το IKA, Staufen, Germany) και ένα μέρος βάρους περίπου 100 g τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 2 L. Στην ίδια φιάλη προστέθηκαν 500 ml διχλωρομεθανίου και ακολούθησε έντονη ανατάραξη με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα επί 15 min. Το περιεχόμενο της φιάλης διηθήθηκε μέσα από χάρτινο φίλτρο Whatman No 1 και το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε άλλες 3 φορές στην ίδια διαδικασία ανατάραξης προκειμένου να απομακρυνθεί η περιεχόμενη χλωροφύλλη

(Mylonaki et al. 2008).

Μετά την απομάκρυνση της χλωροφύλλης, ποσότητα περίπου 34 g από το στερεό υπόλειμμα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 1000 ml που ήταν εφοδιασμένη με γυάλινο πώμα και περιείχε 680 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 60%. Ακολούθησε η εκχύλιση των φύλλων με ανατάραξη του περιεχομένου της φιάλης με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου επί 6 ώρες. Όταν η εκχύλιση ολοκληρώθηκε, το περιεχόμενο της φιάλης διηθήθηκε διαμέσου χάρτινου φίλτρου Whatman No 1 και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι σταθερού όγκου με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotavapor) στους 45 °C υπό κενό. Το ιξώδες υπόλειμμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε φιαλίδιο σκούρου χρώματος και ο όγκος του ρυθμίστηκε στα 15 ml με προσθήκη αιθανόλης. Το διάλυμα αυτό περιείχε πολυφαινόλες σε συγκέντρωση ισοδύναμη προς 100 mg γαλλικού οξέος (GAE)/ml εκχυλίσματος.

### **1.3. Χοίροι και σιτηρέσια**

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 12 Landrace X Large White θηλυκοί χοίροι που εκτρέφονταν εντατικά υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε μια χοιροτροφική εκμετάλλευση της περιοχής της Καρδίτσας. Εφαρμόζοντας ένα εντελώς τυχαίο σχεδιασμό, τα ζώα κατανεμήθηκαν ανά 6 σε δύο διατροφικές μεταχειρίσεις. Και στις δύο μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκε το ίδιο εμπορικό σιτηρέσιο, το οποίο όμως διέφερε μεταξύ των μεταχειρίσεων στην πηγή των λιπιδίων. Στη μία μεταχείριση (S), η πηγή των λιπιδίων ήταν το ηλιέλαιο σε ποσοστό 3%, ενώ στην άλλη μεταχείριση (L) ήταν το λινέλαιο σε ποσοστό 3%. Και αυτό γιατί το φυτικό έλαιο που προστίθεται συνήθως στα σιτηρέσια των χοίρων για την αύξηση του ενεργειακού τους περιεχομένου είναι το ηλιέλαιο, ενώ το φυτικό έλαιο που προστίθεται στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων για τον εμπλουτισμό του κρέατος τους σε *n-3* λιπαρά οξέα είναι το λινέλαιο.

Καθόλη τη διάρκεια της εκτροφής που διήρκεσε 90 ημέρες, χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές διαδικασίες αναπαραγωγής και διαχείρισης. Στο τέλος της εκτροφής, τα ζώα, τα οποία είχαν βάρος περίπου 85 kg, αναισθητοποιήθηκαν με ηλεκτρισμό, θανατώθηκαν και υποβλήθηκαν σε αφαίμαξη. Τα σφάγια χωρίστηκαν στη μέση και αφέθηκαν προς ψύξη στους 4 °C για 24 ώρες πριν από τον τεμαχισμό τους. Τα συλλεχθέντα φιλέτα του επιμήκη ραχιαίου μυός καθαρίστηκαν από το επιφανειακό λίπος, συσκευάστηκαν υπό κενό και διατηρήθηκαν κατεψυγμένα στους -20 °C μέχρι την ημέρα που παρασκευάστηκαν τα μπιφτέκια (λιγότερο από 2 εβδομάδες).

#### **1.4. Βασική χημική ανάλυση (Proximate analysis) του χοιρινού κρέατος**

Δείγματα του επιμήκους ραχιαίου μυός υποβλήθηκαν σε μια σειρά χημικών αναλύσεων σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από την AOAC (1984). Η περιεκτικότητα σε υγρασία μετρήθηκε με ξήρανση των ομογενοποιημένων δειγμάτων σε αερόθερμο κλίβανο στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους (24 ώρες). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl χρησιμοποιώντας τον συντελεστή 6,25 για τη μετατροπή του αζώτου σε πρωτεΐνη. Η περιεκτικότητα σε λίπος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet, χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό αιθέρα ως διαλύτη εκχύλισης.

#### **1.5. Προσδιορισμός της σύνθεσης του χοιρινού κρέατος σε λιπαρά οξέα**

Για τον προσδιορισμό της σύνθεσης του χοιρινού κρέατος σε λιπαρά οξέα, τα λιπίδια εκχυλίστηκαν από το κρέας με την μέθοδο των Lee et al. (1996). Κατά τη μέθοδο αυτή, τα δείγματα κρέατος (5 g)

ομογενοποιήθηκαν με 50 ml διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2/1, ό/ό) επί 1,5 min σε αναμκτήρα Waring (Waring Products, New Hartford, CT, USA). Τα ομογενοποιημένα διηθήθηκαν διαμέσου χάρτινου φίλτρου Whatman No. 1 μέσα σε διαχωριστική χοάνη στην οποία, στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 ml 0,5% NaCl για τον διαχωρισμό του διηθήματος σε δύο φάσεις. Το μίγμα ανακινήθηκε ήπια και αφέθηκε σε ηρεμία μέχρις ότου ο διαχωρισμός των φάσεων να γίνει σαφής. Η υδατομεθανολική φάση απορρίφθηκε, ενώ η χλωροφορμική φάση συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Μέρος των απομενόντων λιπιδίων σαπωνοποιήθηκε και τα λιπαρά οξέα μετατράπηκαν σε μεθυλεστέρες σύμφωνα με τη διαδικασία εκχύλισης-μετεστεροποίησης των Sukhija & Palmquist (1988).

Ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε χρησιμοποιώντας ένα αεριοχρωματογραφικό σύστημα (Shimadzu, Model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) εφοδιασμένο με τριχοειδή γυάλινη στήλη (Supelco column, model 24110-u SP-2380™) μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και πάχους στιβάδας 2 μm. Η θερμοκρασία της στήλης ορίστηκε αρχικά στους 70 °C και διατηρήθηκε στο σημείο αυτό επί 0,3 min. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 180 °C με ρυθμό μεταβολής 30 °C/min και διατηρήθηκε στο σημείο αυτό επί 10 min. Τελικά, η θερμοκρασία της στήλης ανυψώθηκε στους 225 °C με ρυθμό μεταβολής 5 °C/min και διατηρήθηκε εκεί επί 3 min. Η θερμοκρασία τόσο της θυρίδας έγχυσης όσο και του ανιχνευτή ιονισμού της φλόγας ρυθμίστηκε στους 240 °C.

Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων βασίστηκε σε συγκρίσεις των χρόνων κατακράτησης των κορυφών των δειγμάτων με τους χρόνους κατακράτησης πρότυπων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Supelco FAME Mix 18919, Bellefonte, PA, USA). Επιπλέον, βασίστηκε και σε συνεγχύσεις αγνώστων και προτύπων σε περιπτώσεις που αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών των δειγμάτων ολοκληρώθηκαν και μετατράπηκαν σε εκατοστιαία αναλογία διαμέσου του προγράμματος Shimadzu, Model Class-VP chromatography data system. Η σχετική περιεκτικότητα κάθε μεθυλεστέρα λιπαρού οξέος υπολογίστηκε ως εκατοστιαίο ποσοστό του συνόλου των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.

### ***1.6. Παρασκευή των χοιρινών μπιφτεκιών και πειραματικός σχεδιασμός***

Μετά την απόψυξη του στους 4 °C, ο επιμήκης ραχιαίος (LD) μυς από τους χοίρους και των δύο διατροφικών μεταχειρίσεων κόπηκε σε μικρούς κύβους και τεμαχίστηκε δύο φορές σε μηχανή κιμά (Stiebel Eltron International, KFW 3i/03121, Germany) διαμέσου δίσκου με οπές 4 mm. Από το κρέας των χοίρων της μεταχείρισης (L) παρασκευάστηκαν 5 ομάδες χοιρινών μπιφτεκιών, συγκεκριμένα η ομάδα αρνητικού μάρτυρα (CONT), η ομάδα θετικού μάρτυρα (ATOC) με προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης και 3 ομάδες με προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (TP100, TP200 και TP300). Στην ομάδα αρνητικού μάρτυρα (CONT), τα συστατικά ανά κιλό μπιφτεκιών ήταν ως ακολούθως: 965 γρ κρέας, 17 ml απεσταγμένου νερού, 3 ml αιθανόλης και 15 g χλωριούχου νατρίου. Η ομάδα ATOC είχε ίδια βασική σύνθεση με εκείνη της CONT αλλά περιείχε, επιπλέον, 50 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλης/kg μπιφτεκιών, ενώ οι ομάδες TP100, TP200 και TP300 που είχαν επίσης ίδια βασική σύνθεση με εκείνη της CONT, περιείχαν εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με συγκεντρώσεις σε ολικές πολυφαινόλες 100, 200 και 300 mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents) GAE/kg, αντίστοιχα. Η προσθήκη των αντιοξειδωτικών πρόσθετων στις 4 αυτές ομάδες έγινε αντικαθιστώντας στη βασική σύνθεση τα 3 ml της καθαρής αιθανόλης από 3 ml αιθανόλης που περιείχαν την κατάλληλη ποσότητα των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών.

Η επιλογή των επιπέδων προσθήκης των ολικών πολυφαινολών βασίστηκε σε πρόσφατα δημοσιευθέντα στοιχεία που αφορούσαν την επίδραση της χρήσης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και άλλων φυσικών αντιοξειδωτικών στην ποιότητα και διάρκεια ζωής νωπών μπιφτεκιών από βοδινό (Hayes et al. 2010), καθώς και την επίδραση χοιροτροφών με προσθήκη φύλλων ελιάς στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου χοιρινού κρέατος (Botsoglou et al. 2012). Εξάλλου, η επιλογή του επιπέδου προσθήκης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης

έγινε με βάση αναφορές που δείχνουν παρόμοια αντιοξειδωτική συμπεριφορά όταν προστίθεται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 50 και 100 mg/kg σε μοντέλα κρέατος (Wong et al. 1995), καθώς και προ-οξειδωτική επίδραση όταν προστίθεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 mg/kg (Lampi & Piironen 1998, Verma & Sahoo 2000).

Αμέσως μετά την προσθήκη όλων των επιθυμητών συστατικών στον αλεσμένο κιμά, τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν (Blender, HGB55E, Snijders Scientific, Tilburg, Holland) και παρασκευάστηκαν μπιφτέκια με βάρος 50 g, διάμετρο 9 cm και πάχος 0,8 cm, χρησιμοποιώντας τρυβλία Petri. Τα μπιφτέκια κάθε ομάδος χωρίστηκαν κατά τυχαίο τρόπο σε τρεις υποομάδες. Τα μπιφτέκια της πρώτης υποομάδος χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας πειραματικής φάσης (B), ενώ τα μπιφτέκια της δεύτερης και της τρίτης υποομάδος χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της Γ και Δ πειραματικής φάσης, αντίστοιχα.

Έτσι, τα νωπά μπιφτέκια της πρώτης υποομάδος περιτυλίχθηκαν σε διαπερατή από οξυγόνο ( $6000-8000 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24$  ώρες) μεμβράνη πολυβινυλοχλωριδίου (Wrap Film Systems, Halesfield 14, Telford TF7 4QR, Shropshire, UK) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο 4 °C κάτω από λευκό φως φθορισμού (περίπου 600 lx) προσομοιώνοντας τις συνθήκες βιτρίνας λιανικής πώλησης για 9 ημέρες.

Αντίθετα, τα μπιφτέκια της δεύτερης υποομάδος τοποθετήθηκαν σε αερόθερμο κλίβανο προθερμασμένο στους 180 °C και ψήθηκαν επί 16 min, γυρίζοντας τα μπιφτέκια κάθε 4 min. Οι συνθήκες αυτές καθορίστηκαν από προκαταρκτικές δοκιμές που στόχευαν στην ανεύρεση των συνθηκών που θα επέτρεπαν την επίτευξη θερμοκρασίας 71 °C στο θερμικό κέντρο των μπιφτεκίων. Τα ψητά μπιφτέκια, αμέσως μετά την ψύξη τους, περιτυλίχθηκαν στη διαπερατή από οξυγόνο μεμβράνη πολυβινυλοχλωριδίου και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο 4 °C κάτω από λευκό φως φθορισμού προσομοιώνοντας τις συνθήκες βιτρίνας λιανικής πώλησης για 9 ημέρες. Τα βάρη των μπιφτεκίων πριν και μετά το ψήσιμό τους, καταγράφηκαν μετά από ψύξη στους 4 °C και οι απώλειες κατά το ψήσιμο υπολογίστηκαν για 6 επαναλήψεις ανά μεταχείριση.

Εξάλλου, τα νωπά μπιφτέκια της τρίτης υποομάδος περιτυλίχθηκαν, επίσης, στη διαπερατή από οξυγόνο μεμβράνη πολυβινυλοχλωριδίου και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο -18 °C κάτω από λευκό φως φθορισμού (περίπου 600 lx) προσομοιώνοντας τις συνθήκες βιτρίνας λιανικής πώλησης, για 180 ημέρες.

### **1.7. Μέτρηση pH και ικανότητας συγκράτησης ύδατος**

Για τη μέτρηση του pH στον επιμήκη ραχιαίο μύ (LD) των χοίρων και στα μπιφτεκία, δείγματα βάρους 10 g ομογενοποιήθηκαν μέσα σε 90 ml απεσταγμένου νερού με χρήση ομογενοποιητή Ultra Turrax T25 (Janke and Kunkel, IKA-Labortechnik, GmbH & Co, Staufen, Γερμανία) στις 24.000 rpm επί 1 min. Το pH των ομογενοποιημένων δειγμάτων μετρήθηκε στους 20 °C με τη βοήθεια φορητού πεχαμέτρου (PHM 201 Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Για την εκτίμηση της ικανότητας συγκράτησης ύδατος (WHC) των LD μιών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απώλειας οπού (drip loss). Για τη μέτρηση της απώλειας οπού, δείγματα επιμήκους ραχιαίου μύς από σφάγια 24 ωρών που διατηρούνταν σε χώρο 4 °C ζυγίστηκαν και, στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε δικτυωτά τα οποία ήταν αναρτημένα στο στόμιο δοχείων κατά τρόπο ώστε τα δείγματα να μην έρχονται σε επαφή με τα τοιχώματα των δοχείων. Τα δοχεία με τα δείγματα αφέθηκαν επί 48 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια, τα δείγματα κρέατος συλλέχθηκαν, απομακρύνθηκε με προσοχή η επιφανειακή υγρασία με τη βοήθεια απορροφητικού χαρτιού και ζυγίστηκαν. Οι απώλειες υγρών εκφράστηκαν ως εκατοστιαίο ποσοστό του αρχικού βάρους του δείγματος (Honikel 1998).

### **1.8. Μέτρηση του χρώματος των μπιφτεκιών**

Οι μετρήσεις του χρώματος της επιφανείας των ψημένων μπιφτεκιών διενεργήθηκαν με χρήση χρωματομέτρου (Konica Minolta Chroma Meter CR-410, Japan) το οποίο περιελάμβανε κεφαλή μέτρησης (CR-410), φωτιστική πηγή και επεξεργαστή δεδομένων (DP-400). Πριν από την έναρξη των μετρήσεων, γινόταν βαθμονόμηση του χρωματομέτρου στο χρωματικό σύστημα L\*, a\*, b\*, χρησιμοποιώντας την λευκή πλάκα βαθμονόμησης (CR-A44) του κατασκευαστή. Η τιμή L\* υποδεικνύει τη φωτεινότητα (L\*=0 σκοτεινό, L\*=100 φωτεινό), η τιμή a\* υποδεικνύει την ερυθρότητα (+60=ερυθρό, -60=πράσινο), ενώ η τιμή b\* υποδεικνύει την ωχρότητα (+60=κίτρινο, -60=μπλε). Οι μετρήσεις του χρώματος γίνονταν σε θερμοκρασία δωματίου επί της επιφανείας κάθε μπιφτεκιού εις τριπλούν σε τρεις τυχαία επιλεγμένες περιοχές.

### **1.9. Προσδιορισμός των συζευγμένων διενίων**

Η εκτίμηση της οξειδωσης των λιπιδίων βασίστηκε στον προσδιορισμό τόσο των συζευγμένων διενίων και των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, τα οποία είναι πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων, όσο και στον προσδιορισμό της μηλονικής

διαλδεύδης, η οποία είναι ένα δευτερογενές προϊόν της οξειδωσης των λιπιδίων.

Τα συζευγμένα διένια προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Sirinivasan et al. (1996) μετά από κάποιες τροποποιήσεις. Τα δείγματα μπιφτεκιών (0,5 g) εναιωρήθηκαν σε 5 ml απεσταγμένου νερού και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή Ultra Turrax T25 (Janke and Kunkel, IKA-Labor Technik, GmbH & Co, Staufen, Γερμανία). Μέρος όγκου 0,5 ml του εναιωρήματος εκχυλίστηκε με 5 ml διαλύματος εξανίου/ισοπροπανόλης (3/1, ό/ό) επί 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2000g επί 5 min και η απορρόφηση της υπερκείμενης στιβάδας μετρήθηκε στα 233 nm. Η συγκέντρωση των συζευγμένων διενίων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας  $25.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mmol/mg δείγματος κρέατος.

#### ***1.10. Προσδιορισμός των υδροϋπεροξειδίων***

Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος, IDF, (Shantha & Decker 1994). Κατά τον προσδιορισμό αυτό, τα δείγματα μπιφτεκιών εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Lee et al. (1996) που περιγράφηκε ήδη στην ενότητα 1.5 της παρούσας φάσης για την παραλαβή των λιπιδίων. Μέρος των λιπιδίων αυτών, βάρους 0,01 έως 0,30 g ανάλογα με την έκταση της οξειδωσης, αναμίχθηκαν με 9,8 ml διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης μέσα σε γυάλινο σωληνάριο με τη βοήθεια αναμίκτη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,05 ml διαλύματος θειοκυανικού αμμωνίου και το δείγμα αναμίχθηκε με τη βοήθεια αναμίκτη. Ακολούθησε η προσθήκη 0,05 ml διαλύματος δισθενούς σιδήρου και το δείγμα αφού αναμίχθηκε και πάλι με τη βοήθεια αναμίκτη, επώαστηκε επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά την επώαση, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 500 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε χλιοστοϊσοδύναμα υπεροξειδίων/kg κρέατος.

#### ***1.11. Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεύδης***

Η μηλονική διαλδεύδη (MDA) προσδιορίστηκε με μια εκλεκτική φασματοφωτομετρική μέθοδο που βασίζεται σε παραγωγή τρίτης τάξης του φάσματος απορρόφησης της ουσίας (Botsoglou et al. 1994). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, δείγματα μπιφτεκιών βάρους 1 g αναμίχθηκαν με 10 ml 5% υδατικού διαλύματος τριχλωροξικού οξέος και 5 ml εξανίου που περιείχε 0,8% βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT). Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με ομογενοποιητή Ultraturrax (IKA) επί 30 s σε υψηλή ταχύτητα και φυγοκεντρήθηκε επί 3

min στα 3000g. Η υπερκείμενη στιβάδα του εξανίου απορρίφθηκε και 2,5 ml από την υδατική στιβάδα μεταφέρθηκαν σε άλλο σωλήνα και αναμίχθηκαν με 1,5 ml 0,8% υδατικού διαλύματος 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος. Το μίγμα επώαστηκε στους 70 °C επί 30 min, ψύχθηκε, στη συνέχεια, κάτω από νερό βρύσης και υποβλήθηκε σε συμβατική φασματοφωτομετρία (Shimadzu, Model UV-160A, Tokyo, Japan) στην περιοχή 400-650 nm. Παραγωγή τριτής τάξεως του συμβατικού φάσματος που καταγράφηκε με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min οδήγησε στην καταγραφή του αντίστοιχου φάσματος τρίτης παραγώγου. Η συγκέντρωση της MDA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  υγρού ιστού) στα δείγματα υπολογίστηκε με βάση το ύψος της κορυφής τρίτης παραγώγου στα 521,5 nm και αναφορά σε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

### ***1.12. Προσδιορισμός των καρβονλίων των πρωτεϊνών***

Η οξείδωση των πρωτεϊνών αξιολογήθηκε με βάση τόσο την ταχύτητα σχηματισμού των καρβονυλικών ομάδων όσο και την ταχύτητα μείωσης των σουλφυδρυλικών ομάδων. Η συνολική περιεκτικότητα των καρβονυλικών ομάδων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Oliver et al. (1987) μετά από μικρές τροποποιήσεις ώστε να είναι κατάλληλη και για την ανάλυση του κρέατος.

Κατά τη μέθοδο αυτή, 1 g μπιφτεκιών ομογενοποιήθηκε με 20 ml 0,05 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7,2) με τη βοήθεια ομογενοποιητή Ultra Turrax. Από το ομογενοποιημένο μίγμα παραλήφθηκαν 2 μέρη όγκου 0,5 ml το καθένα τα οποία και αναμίχθηκαν με 0,5 ml 20% διαλύματος τριχλωροξικού οξέος σε 2 ξεχωριστούς σωλήνες και φυγοκεντρήθηκαν. Οι πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν στους 2 σωλήνες πλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα HCl/ακετόνης (3/100, ό/ό) και, στη συνέχεια, με διάλυμα 10% τριχλωροξικού οξέος προς απομάκρυνση των χρωμοφώρων του κρέατος. Το ίζημα που απέμεινε στον ένα σωλήνα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 1 ml 2N HCl προκειμένου να διενεργηθεί ποσοτικός προσδιορισμός της περιεχόμενης πρωτεΐνης, ενώ το ίζημα στον άλλο σωλήνα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 1 ml διαλύματος 0,2% 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH) (β/ό) σε 2 N HCl προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της συγκεντρώσεως των καρβονυλικών ομάδων. Και οι δύο αυτοί σωλήνες αφέθηκαν επί 1 ώρα στο σκοτάδι προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική ανάδευση, το περιεχόμενό τους φυγοκεντρήθηκε και τα ιζήματα που προέκυψαν πλύθηκαν μία φορά με 5 ml διαλύματος 20% τριχλωροξικού οξέος και τρεις φορές με 5 ml διαλύματος αιθανόλης/οξικού αιθυλεστέρα (1/1, ό/ό) ώστε να απομακρυνθούν τα ίχνη του DNPH.



Τελικά, τα ιζήματα και των δύο σωλήνων διαλύθηκαν σε 2 mL διαλύματος 6 M υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου, pH 6,5.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα υπολογίστηκε από την απορρόφηση στα 280 nm του περιεχομένου του σωλήνα στον οποίο το ίζημα είχε αναμιχθεί με HCl. Για τον ποσοτικό αυτό προσδιορισμό, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού σε 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου και 6 M διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης, pH 6,5 και οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν σύμφωνα με μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Εξάλλου, η συγκέντρωση στα δείγματα των καρβονυλικών ομάδων υπολογίστηκε από την απορρόφηση στα 370 nm του περιεχομένου του σωλήνα στον οποίο το ίζημα είχε αναμιχθεί με το DNPH και εκφράστηκε ως nmol καρβονυλικών ομάδων ανά mg πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας  $21,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **1.13. Προσδιορισμός των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών**

Η συνολική περιεκτικότητα των σουλφυδρυλικών ομάδων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Eymard et al. (2009). Κατά τη μέθοδο αυτή, 1 g μπιφτεκίων ομογενοποιήθηκε με 20 ml 0,05 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7,2) με τη βοήθεια ομογενοποιητή Ultra Turrax. Από το ομογενοποιημένο μίγμα παραλήφθηκε 1 ml και αναμείχθηκε με 9 ml 0,05 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7,2) που περιείχε 0.6 M NaCl, 6 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και 8 M ουρία. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε, και 3 ml από την υπερκείμενη στιβάδα επώαστηκαν στους 40 °C επί 15 min με 0,04 ml διαλύματος 0,01 M 5,5'-διθειοδις(2-νιτροβενζοϊκού οξέος) (DTNB) σε 0,05 M οξικού νατρίου. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412 nm σε φωτόμετρο (Shimadzu UV 160A, Kyoto, Japan) και η περιεκτικότητα των σουλφυδρυλικών ομάδων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μmoles σουλφυδρυλικών ομάδων ανά mg πρωτεΐνης.

### **1.14. Προσδιορισμός της α-τοκοφερόλης**

Η εκχύλιση της α-τοκοφερόλης από το χοιρινά μπιφτεκία διενεργήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Botsoglou et al. (1998). Σύμφωνα με αυτήν, δείγμα μπιφτεκίων βάρους 0,5 g ομογενοποιήθηκε με 100 μl διαλύματος πυροκατεχόλης και 5 ml μεθανολικού διαλύματος KOH και, στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο διάλυμα σαπωνοποιήθηκε με επώαση σε

υδρόλουτρο 80 °C επί 15 λεπτά. Μετά τη σαπωνοποίηση, προστέθηκαν 5 ml εξανίου και 1 ml νερού και το μίγμα, αφού αναμίχθηκε καλά, φυγοκεντρήθηκε στα 2000g. Ένα μέρος από την υπερκείμενη φάση εξατμίστηκε σε ρεύμα N<sub>2</sub> μέχρι ξηρού στους °C. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε μεθανόλη και χρωματογραφήθηκε σε υγροχρωματογράφο (UFLC Shimadzu system, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) όπως περιγράφεται από τους Zapel & Csallany (1983). Η χρωματογραφική στήλη (15 cm x 0.46 cm) περιείχε Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 μm, ενώ η κινούμενη φάση ήταν μεθανόλη που διέρευε τη στήλη με ταχύτητα ροής 1,5 ml/min. Η ανίχνευση της α-τοκοφερόλης γινόταν στα 292 nm, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός με βάση πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

### ***1.15. Οργανοληπτική αξιολόγηση***

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από επταμελές επιτελείο εκπαιδευμένων εργαστηριακών συνεργατών και αφορούσε τόσο φρέσκα όσο και κατεψυγμένα επί 6 μήνες χοιρινά μπιφτέκια τα οποία είχαν ψηθεί σε αερόθερμο κλίβανο στους 180 °C επί 16 min. Πριν από το ψήσιμό τους, τα κατεψυγμένα μπιφτέκια αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα ψητά μπιφτέκια επισημάνθηκαν με τριψήφιους τυχαίους αριθμούς, κόπηκαν σε φέτες, τοποθετήθηκαν σε χάρτινα πιάτα και σερβιρίστηκαν μέσα σε 2 min από το ψήσιμό τους σε τυχαία σειρά στους αξιολογητές. Σε κάθε συνεδρία αξιολόγησης παρουσιάζονταν 3 δείγματα από τις διάφορες μεταχειρίσεις (CONT, TP100, TP200, TP300 και ATOC), τα οποία αξιολογούνταν διαδοχικά. Οι αξιολογητές είχαν κληθεί να εκτιμήσουν την οσμή και τη γεύση οσφραϊνόμενοι δυνατά και δοκιμάζοντας κάθε δείγμα. Η εκτίμηση βασιζόταν σε μια κλίμακα εννέα διαβαθμίσεων σύμφωνα με τους Lawless & Heymann (1998). Διαβάθμιση 1 σήμαινε "δεν μου αρέσει καθόλου", διαβάθμιση 5 σήμαινε "ούτε μου αρέσει ούτε δεν μου αρέσει" και διαβάθμιση 9 σήμαινε "Μου αρέσει πολύ». Οι αξιολογητές ακολούθησαν την πρακτική καθαρισμού του στόματος μεταξύ των συνεδριών αξιολόγησης τρώγοντας ένα μικρό κομμάτι λευκό ψωμί και ξεπλένοντας το στόμα τους με νερό.

### ***1.16. Στατιστική ανάλυση***

Για τη διενέργεια της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0.1 (SPSS Ltd., Woking, Surrey, UK) και έγινε χρήση του γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model). Για όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) ενός, δύο ή τριών παραγόντων,

ενώ οι συγκρίσεις των μέσων όρων των ομάδων έγιναν με τη δοκιμή Tukey (Πετρίδης 2000). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με χρήση της δοκιμής Levene (Πετρίδης 2000). Σε περιπτώσεις που διαπιστώθηκε έλλειψη κανονικότητας ή ομοιογένειας των διακυμάνσεων, έγιναν οι κατάλληλοι μετασχηματισμοί των πρωτογενών πειραματικών δεδομένων, οι οποίοι σε όλες τις περιπτώσεις επανέφεραν την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διακύμανσης των στοιχείων (Πετρίδης 2000). Στατιστικώς σημαντική θεωρήθηκε μια διαφορά με επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P \leq 0,05$ ).

## 2. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 2.1. Επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των ζωοτροφών στη βασική χημική σύσταση, στο pH και στην απώλεια οπού του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων

Τα αποτελέσματα της βασικής χημικής ανάλυσης δειγμάτων του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων παρουσιάζονται στον Πίνακα Β1. Οι διαφορετικές διατροφικές μεταχειρίσεις δεν είχαν καμία επίδραση ( $P > 0,05$ ) στις πρωτεΐνες, την υγρασία και το λίπος των LD μυών. Παράμετροι της ποιότητας του κρέατος όπως το  $pH_{24}$  και η απώλεια οπού, δεν επηρεάστηκαν ( $P > 0,05$ ), επίσης, από τις διατροφικές μεταχειρίσεις. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με ανακοινώσεις άλλων ερευνητών (Lahucky et al. 2007, Tik et al. 2007, Lahucky et al. 2010).

Το pH των μυικών ιστών είναι ένας σημαντικός δείκτης της ποιότητας του κρέατος από τεχνολογική άποψη και μπορεί επίσης να επηρεάσει την οργανοληπτική ποιότητα του νωπού κρέατος (Nam et al. 2009). Σύμφωνα με τους Freise et al. (2005), ο ρυθμός της γλυκόλυσης αποτελεί επίσης παράγοντα-κλειδί για την ανάπτυξη της χρώσης στο κρέας, δεδομένου ότι η γρήγορη γλυκόλυση προκαλεί ταχεία μείωση του pH των μυών που οδηγεί σε μια ανοιχτόχρωμη επιφάνεια και απώλεια οπού.

**Πίνακας Β1.** Επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των χοιροτροφών στη βασική χημική σύσταση, στο pH και στην απώλεια οπού του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων

	Ηλιέλαιο	Λινέλαιο
Πρωτεΐνες, %	22,8 ± 0,2*	22,6 ± 0,1
Υγρασία, %	73,6 ± 0,3	73,2 ± 0,3
Λίπος, %	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2
pH <sub>24</sub>	5,74 ± 0,03	5,79 ± 0,02
Απώλεια οπού, %	5,12 ± 0,20	5,26 ± 0,11

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια σειρά με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά για  $P > 0,05$ .

Στην παρούσα μελέτη, τόσο η ομάδα των χοίρων που διατράφηκε με 3% ηλιέλαιο όσο

και 3% λινέλαιο, είχαν φυσιολογικές τιμές απώλειας οπού (Πίνακας B1), οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την κανονική διαμόρφωση της τιμής του pH και της ικανότητας συγκράτησης ύδατος και υποδεικνυαν την καλή κατάσταση των ζώων πριν από την σφαγή (Mortensen et al. 2006). Σύμφωνα με τους Gil et al. (2008), η απώλεια οπού σχετίζεται με οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η σκληρότητα και το χυμώδες, ενώ μύες με μεγαλύτερη απώλεια υγρών και, συνεπώς, μικρότερη ικανότητα συγκράτησης ύδατος, σχετίζονται με χαμηλή τρυφερότητα και χυμώδες.

## 2.2 Επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των ζωοτροφών στη σύσταση σε λιπαρά οξέα του επιμήκους ραχιαίου μυός των χοίρων

Η επίδραση της πηγής των λιπιδίων της χοιροτροφής στη σύσταση σε λιπαρά οξέα των LD μυών των χοίρων παρουσιάζεται στον Πίνακα B2.

**Πίνακας B2.** Επίδραση της πηγής των λιπιδίων των ζωοτροφών στη σύσταση σε λιπαρά οξέα του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων

Λιπαρά οξέα	Ποσοστά % του συνόλου των λιπαρών οξέων	
	Ηλιέλαιο	Λινέλαιο
C12:0 λανρικό	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,02
C14:0 μυριστικό	1,02 ± 0,06	1,09 ± 0,08
C16:0 παλμιτικό	21,26 ± 0,24	20,81 ± 0,36
C16:1 παλμιτοελαϊκό	1,90 ± 0,12	1,59 ± 0,22
C18:0 στεατικό	11,66 ± 0,18 <sup>a</sup>	14,02 ± 0,24 <sup>b</sup>
C18:1 ελαϊκό	35,88 ± 0,17	35,16 ± 0,36
C18:2 (n-6) λινελαϊκό	22,96 ± 0,27 <sup>a</sup>	16,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
C18:3 (n-3) α-λινολενικό	1,38 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,24 ± 0,08 <sup>b</sup>
C20:0 αραχιδικό	0,12 ± 0,06	0,14 ± 0,04
C20:1 γαδολεϊκό	0,68 ± 0,06	0,61 ± 0,10
C20:3 (n-6) εικοσιτριενικό	0,85 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,06 <sup>b</sup>
C20:4 (n-6) αραχιδονικό	0,96 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>b</sup>
C20:5 (n-3) εικοσιπεντενοϊκό (EPA)	0,05 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>b</sup>
C22:5 (n-3) εικοσιδυοπεντενοϊκό (DPA)	0,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,06 <sup>b</sup>
C22:6 (n-3) εικοσιδυοεξενοϊκό (DHA)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Κορεσμένα (SFA)	34,14 ± 0,28 <sup>a</sup>	36,12 ± 0,17 <sup>b</sup>
Μονοακόρεστα (MUFA)	38,46 ± 0,22 <sup>a</sup>	37,36 ± 0,28 <sup>b</sup>
Πολυακόρεστα (PUFA)	26,60 ± 0,29	25,94 ± 0,37
n-6 PUFA	24,77 ± 0,32 <sup>a</sup>	17,62 ± 0,28 <sup>b</sup>
n-3 PUFA	1,83 ± 0,14 <sup>a</sup>	8,32 ± 0,22 <sup>b</sup>
Λόγος n-6/n-3	13,54 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,12 <sup>b</sup>
Λόγος PUFA/SFA	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,04 <sup>b</sup>

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση 6 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup> τιμές στην ίδια σειρά με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά για P>0,05.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύσταση των μυών σε λιπαρά οξέα αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές διαιτητικές μεταχειρίσεις. Εξαιτίας της χορήγησης του ηλιελαίου που είναι πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ, η ομάδα αυτή παρουσίασε υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) αναλογία λινελαϊκού οξέος και, συνεπώς, μια μεγαλύτερη ( $P < 0,05$ ) αναλογία *n*-6 λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. Αντικατάσταση του ηλιελαίου της χοιροτροφής από λινέλαιο, οδήγησε σε μείωση ( $P \leq 0,05$ ) της αναλογίας των *n*-6 λιπαρών οξέων και μία συνακόλουθη αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) της αναλογίας των *n*-3 λιπαρών οξέων. Η αύξηση της αναλογίας των *n*-3 λιπαρών οξέων οφειλόταν στην αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) των αναλογιών του  $\alpha$ -λινολενικού οξέος, του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (EPA) και του εικοσιδυοπεντενοϊκού (DPA), αλλά όχι του εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA) στον μυϊκό ιστό του χοίρου. Ως συνέπεια αυτών των αλλαγών, η αναλογία των κορεσμένων λιπαρών οξέων αυξήθηκε ( $P \leq 0,05$ ) και η αναλογία των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων μειώθηκε ( $P \leq 0,05$ ), ενώ η αναλογία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) παρέμεινε αμετάβλητη ( $P > 0,05$ ).

Τα προφίλ των λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι σε γενική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Hoz et al. 2003, Kouba et al. 2003), αλλά σε αντίθεση με κάποιες άλλες μελέτες (Enser et al. 2000) που αναφέρουν αύξηση σε όλα τα ευεργετικά *n*-3 λιπαρά οξέα με μακρά αλυσίδα, όπως το DHA, σε μυϊκούς ιστούς χοίρων που τρέφονταν με σιτηρέσια εμπλουτισμένα σε *n*-3 λιπαρά οξέα.

Ο Πίνακας B2 δείχνει επίσης ότι η αύξηση των *n*-3 λιπαρών οξέων συνοδευόταν από αντίστοιχη μείωση ( $P \leq 0,05$ ) του αραχιδονικού οξέος. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλους ερευνητές, οι οποίοι επίσης διαπίστωσαν μείωση του αραχιδονικού οξέος στην καρδιά και τους υπερακάνθιους μύες, αλλά όχι στους επιμήκεις ραχιαίους μύες, όταν λινέλαιο προστέθηκε στην τροφή των χοίρων (Nolan et al. 1995).

Οι συγγραφείς αυτοί διατύπωσαν την άποψη ότι αυτή η μείωση ήταν πιθανότατα αποτέλεσμα της υπεροξειδωσής του αραχιδονικού οξέος. Μία άλλη άποψη ήταν ότι τα *n*-3 και *n*-6 PUFAs ανταγωνίζονταν για τα ίδια ένζυμα κατά τον μεταβολισμό επιμήκυνσης και αποκορεσμού τους, με το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ να είναι η πρόδρομος ουσία του EPA και του DHA, και το λινελαϊκό οξύ η πρόδρομος ουσία του αραχιδονικού και του DPA οξέος. Έτσι, η αύξηση των *n*-3 PUFAs οδήγησε σε αντίστοιχη μείωση του αραχιδονικού οξέος.

### 2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο pH νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C

Η επίδραση των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς στις τιμές pH των νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν σε συνθήκες ψύξης, παρουσιάζεται στον Πίνακα Β3. Καθόλη την περίοδο συντήρησης των 9 ημερών, οι τιμές pH των μπιφτεκιών όλων των ομάδων δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους και ήταν στην περιοχή τιμών 5,82-5,75, που είναι συγκρίσιμη με εκείνη που αναφέρθηκε από άλλους ερευνητές για LD μύες χοίρων (Faustman & Cassens 1990, Carpenter et al. 2007, Choe et al. 2011).

**Πίνακας Β3.** Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις τιμές pH νωπών χοιρινών μπιφτεκιών κατά την συντήρησή τους στους 4 °C

	Τιμές pH κατά τη συντήρηση των νωπών μπιφτεκιών			
	0 ημέρες	3 ημέρες	6 ημέρες	9 ημέρες
CONT	5,82±0,01	5,78±0,02	5,79±0,02	5,76±0,03
TP100	5,82±0,02	5,80±0,01	5,81±0,02	5,79±0,02
TP200	5,80±0,01	5,79±0,03	5,77±0,04	5,75±0,03
TP300	5,81±0,01	5,81±0,02	5,78±0,02	5,77±0,03
ATOC	5,81±0,01	5,78±0,02	5,79±0,03	5,77±0,04

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια σειρά με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά για  $P > 0,05$ .

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτες που αναφέρουν ότι οι τιμές pH νωπών χοιρινών μπιφτεκιών δεν επηρεάζονταν από τη διάρκεια της συντήρησης (Park & Jin 2007) ή την προσθήκη αντιοξειδωτικών (Rojas & Brewer 2007, Paiva-Martins et al. 2009, Hayes et al. 2010). Βρίσκονται, όμως, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι οι τιμές pH νωπών χοιρινών μπιφτεκιών μειώνονταν με την πάροδο του χρόνου συντήρησης (Lee et al. 2010) ή αυξάνονταν με την προσθήκη αντιοξειδωτικών (Mc Carthy et al. 2001, Lee et al. 2010).

### 2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα των νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C

Το χρώμα του κρέατος είναι ένα από τα πιο κρίσιμα χαρακτηριστικά τα οποία οι καταναλωτές λαμβάνουν υπόψη τους όταν αποφασίζουν την αγορά κρέατος. Στον Πίνακα Β4 παρουσιάζονται οι παράμετροι του χρώματος όπως αυτές μετρήθηκαν στην επιφάνεια των νωπών χοιρινών μπιφτεκιών κατά την διάρκεια της συντήρησής τους σε ψύξη.

Στις ομάδες CONT και TP100, οι τιμές  $a^*$  (ερυθρότητα) μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σταδιακά με το χρόνο συντήρησης φθάνοντας την 9η ημέρα στις τιμές 2,46 και 2,77, αντίστοιχα. Στις

ομάδες TP200, TP300 και ATOC, αντίθετα, οι τιμές  $a^*$  παρέμεναν αμετάβλητες ( $P>0,05$ ) μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα, αλλά στη συνέχεια μειώνονταν ( $P\leq 0,05$ ) σταδιακά φθάνοντας την 9<sup>η</sup> ημέρα στις τιμές 4,63, 5,18 και 4,29, αντίστοιχα. Συνεπώς, η προσθήκη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στη δόση των 200 ή 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg επέτρεπαν την καταγραφή στην επιφάνεια των νωπών μπιφτεκιών υψηλότερων τιμών  $a^*$  σε σχέση με τη δόση των 100 mg GAE/kg.

Οι τιμές  $a^*$  εξαρτώνται, κυρίως, από τη χημική κατάσταση της μυοσφαιρίνης του κρέατος, αφού οι υψηλότερες τιμές  $a^*$  υποδηλώνουν χαμηλότερη αναλογία της οξειδωμένης χρωστικής. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg επέτρεπε την καταγραφή την 6<sup>η</sup> και την 9<sup>η</sup> ημέρα υψηλότερων ( $P\leq 0,05$ ) τιμών  $a^*$  σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες (Πίνακας B4).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την ευεργετική επίδραση αντιοξειδωτικών πρόσθετων σε κρεατοσκευάσματα εμπλουτισμένα σε  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα (Lee et al. 2006). Ωστόσο, έρχονται σε αντίθεση με κάποιες πρόσφατες μελέτες που ανέφεραν ότι εκχυλίσματα φύλλων ελιάς στις δόσεις των 100 ή 200 mg GAE/kg δεν μπορούσαν να αλλάξουν την τάση μείωσης των τιμών  $a^*$  σε νωπό κρέας χοίρου ή σε χοιρινά λουκάνικα που ήταν αποθηκευμένα σε διάφορες συνθήκες (Hayes et al. 2010, Hayes et al. 2011). Η διακύμανση αυτή της αποτελεσματικότητας των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς μεταξύ των διαφόρων μελετών θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί σε διαφορές στη διαδικασία οξείδωσης της οξυμυοσφαιρίνης κάτω από συνθήκες μειωμένης ενζυματικής δραστηριότητας, όπου η θερμοκρασία αποθήκευσης, η μέθοδος συσκευασίας, το είδος των μυικών ιστών και η ένταση του φωτός (φωτο-οξείδωση) αποτελούν σημαντικούς παράγοντες (McDougall 1982), καθώς επίσης και σε διαφορές στα είδη του κρέατος, τη γενετική, ή τη διαχείριση των ζώων.

Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς έναντι του αποχρωματισμού του κρέατος, μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων που υπήρχαν σε αυτά τα εκχυλίσματα. Αρκετοί συγγραφείς έχουν συσχετίσει την ερυθρότητα των κρεατοσκευασμάτων με την οξείδωση των λιπιδίων, υποστηρίζοντας ότι η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί σε μείωση της ερυθρότητας (Fernandez-Lopez et al. 2004, 2005). Άλλωστε, ο αποχρωματισμός των νωπών μπιφτεκιών αποδίδεται γενικά στην οξείδωση του δισθενούς σιδήρου της αίμης προς την τρισθενή μορφή που επάγεται από τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων (Yin & Faustman 1993). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η οξυμυοσφαιρίνη μετατρέπεται σε μεταμυοσφαιρίνη και η

χρώση μεταβάλλεται από ένα ευχάριστο φωτεινό κόκκινο σε ανεπιθύμητο καφέ.

Σε ό,τι πάλι αφορά την  $\alpha$ -τοκοφερόλη, αν και διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη E, όταν προστίθεται στις χοιροτροφές, μπορεί να βελτιώσει το χρώμα χοιρινών φιλέτων που συντηρούνται σε ψύξη (Asghar et al. 1991, Monahan et al. 1994, Lanari et al. 1995, Dirinck et al. 1996), εντούτοις τα αποτελέσματα πολλών άλλων σχετικών μελετών δείχνουν μεγάλες διακυμάνσεις ή υποστηρίζουν ότι η σταθερότητα του χρώματος του κρέατος δεν βελτιώνεται με την προσθήκη στις ζωοτροφές της βιταμίνης E (Cannon et al. 1996, Jensen et al. 1997). Στην παρούσα μελέτη, η ανάλυση δειγμάτων από τις ομάδες CONT και ATOC έδειξε ότι περιείχαν  $\alpha$ -τοκοφερόλη σε συγκεντρώσεις 1,4 και 48,2 mg/kg, αντίστοιχα. Από τον Πίνακα B4 διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση των 1.4 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλης/kg που βρέθηκε στα μπιφτέκια της CONT ομάδας δεν ήταν επαρκής για να παράσχει τη μέγιστη ερυθρότητα στα νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C. Αντίθετα, η συγκέντρωση των 48.2 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλης/kg που βρέθηκε στα μπιφτέκια της ATOC ομάδας έδωσε ίδια ερυθρότητα με την ομάδα TP200 που αντιστοιχούσε σε προσθήκη εκχυλίσματος φύλλων σε δόση 200 mg GAE/kg.

**Πίνακας B4.** Επίδραση των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς στο χρώμα ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C

	1 <sup>η</sup> ημέρα	3 <sup>η</sup> ημέρα	6 <sup>η</sup> ημέρα	9 <sup>η</sup> ημέρα
$L^*$				
CONT	54,12 ±0,06	54,06±0,08	53,44±0,04	49,86±0,07
TP100	54,34±0,08	54,15±0,06	53,97±0,07	50,18±0,07
TP200	53,84±0,05	53,72±0,09	53,91±0,06	50,47±0,04
TP300	53,96±0,11	53,81±0,05	53,76±0,11	51,18±0,09
ATOC	53,79±0,06	53,94±0,04	53,99±0,10	50,72±0,04
$a^*$				
CONT	6,16±0,04	5,47±0,03	3,82±0,06	2,46±0,03
TP100	6,09±0,03	5,36±0,06	4,15±0,02	2,77±0,02
TP200	5,94±0,04	6,17±0,02	5,19±0,05	4,63±0,05
TP300	6,11±0,04	6,46±0,04	5,72±0,04	5,18±0,03
ATOC	5,81±0,05	6,18±0,04	5,12±0,03	4,29±0,06
$b^*$				
CONT	14,21±0,03	14,11±0,04	14,27±0,05	14,36±0,06
TP100	13,96±0,04	13,83±0,03	13,91±0,03	13,98±0,04
TP200	13,84±0,07	13,94±0,05	13,72±0,02	13,77±0,05
TP300	13,78±0,04	13,89±0,04	13,92±0,04	14,02±0,03
ATOC	13,85±0,03	13,94±0,06	14,03±0,06	13,97±0,03

Τα αποτελέσματα αυτά δεν έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Jensen et al.



(1998) που υποστήριξαν ότι συγκέντρωση 2,7 mg  $\alpha$ -τοκοφερόλης/kg μυικού ιστού ήταν επαρκής για τη διασφάλιση της σταθερότητας του χρώματος νωπών χοιρινών φιλέτων. Ο μηχανισμός με τον οποίο η βιταμίνη E των μυών βελτιώνει την σταθερότητα του χρώματος δεν είναι σαφής, αλλά η στενή σύνδεση του αποχρωματισμού με τις οξειδωτικές διεργασίες των λιπιδίων είναι γνωστή στο νωπό κρέας (Chan et al. 1997). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, μειωμένη οξείδωση μυοσφαιρίνης έχει παρατηρηθεί σε βοδινό και χοιρινό κρέας στο οποίο η οξείδωση των λιπιδίων παρεμποδίζονταν από υψηλά επίπεδα βιταμίνης E (Faustman et al. 1989, Monahan et al. 1994).

Εκτός από τις τιμές  $a^*$ , και οι τιμές  $L^*$  (φωτεινότητα) επηρεάστηκαν ( $P \leq 0,05$ ) από τον χρόνο συντήρησης των νωπών χοιρινών μπιφτεκιών. Οι τιμές  $L^*$  αν και αμετάβλητες μέχρι την 6η ημέρα, παρουσίασαν απότομη μείωση ( $P \leq 0,05$ ) την 9<sup>η</sup> ημέρα, σε όλες τις ομάδες. Ωστόσο, στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC, η μείωση της τιμής  $L^*$  την 9η ημέρα ήταν λιγότερο σοβαρή σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, πιθανότατα λόγω της προσθήκης των αντιοξειδωτικών ουσιών (Πίνακας B4). Η μείωση των τιμών  $L^*$  μπορεί να επηρεάσει τη συνολική αποδοχή των προϊόντων με βάση το κρέας (Teets et al. 2008). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιεκτικότητα σε νερό συσχετίζεται θετικά με τη φωτεινότητα του κρέατος, η μείωση των τιμών  $L^*$  θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί στην απώλεια του νερού (η οποία δεν εκτιμήθηκε στην παρούσα μελέτη) κατά την συντήρηση των δειγμάτων υπό ψύξη. Και αυτό γιατί η απώλεια του νερού θα μπορούσε να αυξήσει τις συγκεντρώσεις της χρωστικής της αίμης μειώνοντας, έτσι, τις τιμές  $L^*$  (Lawrie 1998, Estevez et al. 2003). Ανάλογα ευρήματα έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες που συνέκριναν τις μεταβολές της χρώσης κρέατος χοίρων ελευθέρως βοσκής με εκείνες κρέατος χοίρων βιομηχανικής εκτροφής κατά τη διάρκεια της συντήρησής του (Estevez et al. 2003).

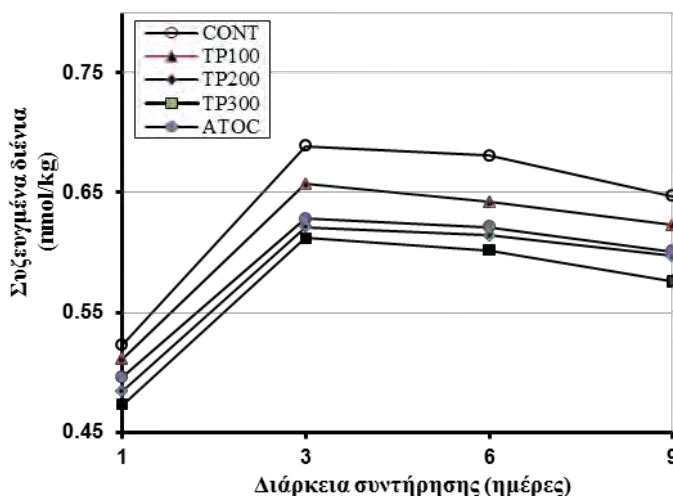
Σε ό,τι τέλος αφορά την επίδραση του χρόνου συντήρησης καθώς και την επίδραση των αντιοξειδωτικών στις τιμές  $b^*$  (ωχρότητα) των νωπών χοιρινών μπιφτεκιών, από τον Πίνακα B4 διαπιστώνεται ότι δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές ( $P > 0,05$ ) τάσεις μεταξύ των ομάδων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη.

### ***2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε νωπά χοιρινά μπιφτεκία που συντηρούνταν στους 4 °C***

Θεωρώντας ότι η εκκίνηση της οξείδωσης των λιπιδίων πραγματοποιείται, συνήθως, με τη δράση ελευθέρων ριζών, ο προσδιορισμός των πρωτογενών προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Και αυτό γιατί η πρωτογενής οξείδωση των

λιπιδίων στο κρέας και ιδιαίτερα σε χοιρινό κρέας εμπλουτισμένο σε *n-3* λιπαρά οξέα, έχει ελάχιστα διερευνηθεί, αφού οι περισσότερες ερευνητικές εργασίες σχετικά με την οξειδωτική σταθερότητα των κρεάτων βασίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον προσδιορισμό των δευτερογενών μόνο προϊόντων της οξείδωσης.

Στο πρωτογενές στάδιο της οξείδωσης των λιπιδίων, οι μη συζευγμένοι διπλοί δεσμοί που υπάρχουν στα ακόρεστα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε συζευγμένους διπλούς δεσμούς, οι οποίοι είναι δυνατόν, στη συνέχεια, να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά (Teets & Were 2008). Στην Εικόνα Β1 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συζευγμένων διενίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε ψύξη στους 4 °C επί 9 ημέρες. Μία ημέρα μετά την έναρξη της συντήρησης, οι ομάδες TP200, TP300 και ATOC των μπιφτεκιών παρουσίαζαν μειωμένο ( $P \leq 0,05$ ) σχηματισμό συζευγμένων διενίων σε σχέση με τις ομάδες TP100 και CONT, στις οποίες, μάλιστα, οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων δεν διέφεραν μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στις δόσεις των 200 και 300 mg GAE/kg, καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg.



**Εικόνα Β1.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων σε νωπά μπιφτέκια.

Οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων που καταγράφηκαν την 1<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, παρουσίασαν σημαντικές αυξήσεις ( $P \leq 0,05$ ) κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, σε όλες τις ομάδες. Οι συγκεντρώσεις αυτές δεν παρουσίασαν περαιτέρω αύξηση την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, αλλά αντίθετα εμφάνισαν μια τάση μείωσης η οποία,

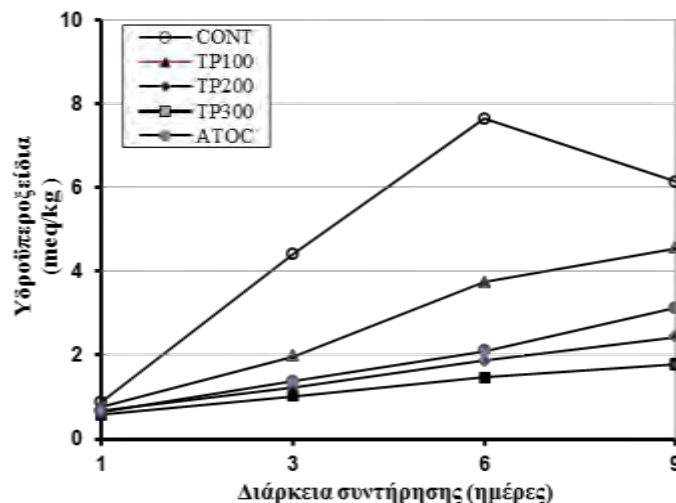
όμως, δεν ήταν σημαντική. Η μείωση αυτή συνεχίστηκε και την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης με αποτέλεσμα την καταγραφή σημαντικά μειωμένων ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεων συζευγμένων διενίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο σχηματισμός των συζευγμένων διενίων σχετίζεται με την παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, η τάση μείωσης των συζευγμένων διενίων υποδεικνύει ότι ο ρυθμός αποσύνθεσης των υδροϋπεροξειδίων ήταν υψηλότερος από την ταχύτητα σχηματισμού των συζευγμένων διενίων. Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί σε νωπό χοιρινό κρέας που περιείχε εκχυλίσματα φύλλων μουστάρδας, την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής του σε ψύξη (Lee et al. 2010).

Συγκριτική εξέταση των τελικών συγκεντρώσεων που καταγράφηκαν την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ομάδες CONT and TP100 παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων με μέσες τιμές 0,647 και 0,623 mmol/kg, αντίστοιχα. Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις με μέσες τιμές 0,597 και 0,601 mmol/kg, αντίστοιχα, ενώ η ομάδα TP300 παρουσίασε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις με μέση τιμή 0,576 mmol/kg. Με βάση τα παραπάνω, η ομάδα TP300 παρεμπόδιζε την παραγωγή των συζευγμένων διενίων κατά περίπου 9%.

## ***2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C***

Ο αριθμός υπεροξειδίων (Peroxide value, POV) αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των υδροϋπεροξειδίων που σχηματίζονται σαν πρωτογενή προϊόντα κατά το αρχικό στάδιο της οξείδωσης των λιπιδίων (Teets & Were 2008). Οι ενώσεις, όμως, αυτές είναι πολύ δραστικές και μπορεί να μειώνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τροφίμων που περιέχουν λιπίδια (Juntachote et al. 2007a).

Στην Εικόνα B2 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα φύλλων ελιάς ή  $\alpha$ -τοκοφερόλη και συντηρούνταν στους 4 °C επί 9 ημέρες. Την 1<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες TP200, TP300 και ATOC παρουσίαζαν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις υδροϋπεροξειδίων (0,58-0,69 meq υπεροξειδίων/kg) σε σχέση με τις ομάδες TP100 και CONT (0,78-0,89 meq υπεροξειδίων/kg). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στις δόσεις των 200 και 300 mg GAE/kg, καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg.



**Εικόνα Β2.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια.

Οι συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων που καταγράφηκαν την 1<sup>η</sup> ημέρα, παρουσίασαν μία ανοδική πορεία με σημαντικές αυξήσεις ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες τόσο κατά την 3<sup>η</sup> όσο και κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Ωστόσο, ενώ στις ομάδες TP100, TP200, TP300 και ATOC η ανοδική αυτή πορεία συνεχίστηκε και κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα, στην ομάδα CONT οι συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων παρουσίασαν την 9<sup>η</sup> ημέρα σημαντική μείωση ( $P \leq 0,05$ ). Η μείωση αυτή υποδεικνυε ότι στο χρονικό αυτό σημείο της συντήρησης και χωρίς την παρουσία αντιοξειδωτικών, ο ρυθμός αποσύνθεσης των υδροϋπεροξειδίων ήταν υψηλότερος από τον ρυθμό σχηματισμού τους. Παρά τη μείωση, όμως, αυτή, η ομάδα CONT παρουσίαζε την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) μέση συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων (6,14 meq υπεροξειδίων/kg) από τις ομάδες TP100 (4,56 meq υπεροξειδίων/kg), TP200 (2,43 meq υπεροξειδίων/kg), και ATOC (3,12 meq υπεροξειδίων/kg), ενώ η ομάδα TP300 εμφάνιζε την χαμηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων (1,78 meq υπεροξειδίων/kg) σε σχέση με τις άλλες ομάδες.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε γενική συμφωνία με προηγούμενους ερευνητές οι οποίοι παρατήρησαν τη μέγιστη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων σε νωπό χοιρινό κρέας που περιείχε εκχυλίσματα φύλλων μουστάρδας, την 7<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής του σε ψύξη (Lee et al. 2010). Σε άλλες μελέτες με λουκάνικα γαλοπούλας που περιείχαν αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου (Barbut et al. 1985) και με φρέσκα χοιρινά λουκάνικα που περιείχαν εκχύλισμα δεντρολίβανου (Georgantelis et al. 2007) ανακοινώθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων παρατηρήθηκε μετά από 14 ημέρες συντήρησης στους 4 °C

και ακολουθούνταν, τις επόμενες ημέρες, από σημαντική μείωση. Επίσης, και οι Antequera et al. (1992) παρατήρησαν τη μέγιστη συγκεντρώνση υδροϋπεροξειδίων σε χοιρομέρι την 15η ημέρα της συντήρησής του στους 4 °C, ακολουθούμενη, τις επόμενες ημέρες, από σημαντική μείωση.

### ***2.7. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C***

Η επιδεκτικότητα των νωπών χοιρινών μπιφτεκίων στην οξείδωση των λιπιδίων κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, ως συνάρτηση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ή  $\alpha$ -τοκοφερόλης, απεικονίζεται στην Εικόνα Β3. Η συντήρηση των δειγμάτων σε ψύξη προκαλούσε σε όλες τις ομάδες αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA), ενός δευτερογενούς προϊόντος της οξείδωσης των λιπιδίων που χρησιμοποιείται ως δείκτης.

Ωστόσο, ο βαθμός οξείδωσης των λιπιδίων διέφερε ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των ομάδων. Οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) στα μπιφτέκια της ομάδος CONT στα οποία δεν είχαν χρησιμοποιηθεί αντιοξειδωτικά. Τα μπιφτέκια, πάλι, της ομάδος TP100, αν και ήταν και αυτά εξίσου εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ, παρουσίαζαν συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας CONT αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100) καθυστερούσε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με την ομάδα CONT, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από τη δόση των 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200). Ακόμη, η ομάδα TP200 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδος ATOC, η οποία, με τη σειρά της, εμφάνιζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP300. Συνεπώς, η ομάδα TP300 παρουσίαζε τις χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης μεταξύ των ομάδων, γεγονός που υποδηλώνει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg προκαλούσε τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην οξείδωση των λιπιδίων.

Το διαβαθμισμένο αυτό αποτέλεσμα μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στις διάφορες δόσεις, που παρατηρήθηκε την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό ψύξη, είναι σε συμφωνία με προηγούμενους συγγραφείς οι οποίοι ανέφεραν ότι τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς είχαν ένα θετικό γραμμικό αποτέλεσμα δόσης και

αντιοξειδωτικής δράσης σε μοντέλα μυών βοοειδών (Hayes et al. 2009). Πρόσφατα, άλλοι ερευνητές, επίσης, ανέφεραν ότι η προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε δόσεις των 100 και 200 GAE/kg σε νωπά βοδινά μπιφτέκια είχε ως συνέπεια τη μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους (Hayes et al. 2010). Επιπλέον, η χρήση του χυμού φύλλων της ελιάς έχει προταθεί για την παράταση της σταθερότητας του ηλιελαίου κατά την θέρμανσή του (Frag et al. 2007). Θα πρέπει ακόμη να σημειωθεί η αναφορά των Bouaziz et al. (2008) ότι η προσθήκη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε συγκέντρωση 400 ppm μπορούσε να παρεμποδίσει την επιδείνωση της τάγγισης των ελαίων, καθώς και εκείνη των Carpenter et al. (2006) ότι εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε συγκέντρωση 50 µg/ml μπορούσε να προστατεύσει τα κύτταρα κατά του οξειδωτικού στρες. Πρόσφατες μελέτες έχουν, επίσης, καταδείξει τη δυνατότητα αναστολής της οξειδωσης των λιπιδίων σε φιλέτα στήθους γαλόπουλων που συντηρούνται σε ψύξη, με την προσθήκη στις πτηνοτροφές αλεσμένων φύλλων ελιάς (Botsoglou et al. 2008, Botsoglou et al. 2010, Govaris et al. 2010).

Αξίζει ίσως ιδιαίτερα να επισημανθεί το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της MDA στα εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ χοιρινά μπιφτέκια της CONT ομάδος της παρούσης μελέτης ήταν αρκετά μεγαλύτερες από εκείνες που βρέθηκαν στις εξίσου εμπλουτισμένες σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ χοιρινές μπριζόλες της CONT ομάδος πρόσφατης προηγούμενης εργασίας (Botsoglou et al. 2012). Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο τεμαχισμός του κρέατος έχει ως αποτέλεσμα την ελευθέρωση ιόντων Fe από τα κύτταρα και κυρίως την ανάμειξη του αίματος που περιέχει ιόντα Fe με τις κατεστραμμένες μυικές ίνες. Επιπλέον, όμως, θα μπορούσε να αποδοθεί και στην προσθήκη του NaCl το οποίο θα μπορούσε να αυξήσει σε σημαντικό βαθμό την οξειδωση των λιπιδίων, εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε στοιχεία όπως ο σίδηρος και ο χαλκός που μπορούν να αυξήσουν την ταχύτητα των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Αρκετές μελέτες σχετικά με την επίδραση του NaCl στην οξειδωση των λιπιδίων έχουν υποδείξει την δράση του ως προ-οξειδωτικό (Kanner et al. 1991) διαμέσου της αύξησης της ενεργότητας ή της βελτίωσης της διαλυτότητας του τρισθενούς σιδήρου με τα χλωριούχα ανιόντα του NaCl (Osinchak et al. 1992). Η χρήση του εμπορικού NaCl στην επεξεργασία των κρεατοσκευασμάτων μπορεί να προκαλέσει αύξηση των οξειδωμένων λιπιδίων και των τελικών προϊόντων τους κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε απλή ψύξη ή κατάψυξη (Osinchak et al. 1992).

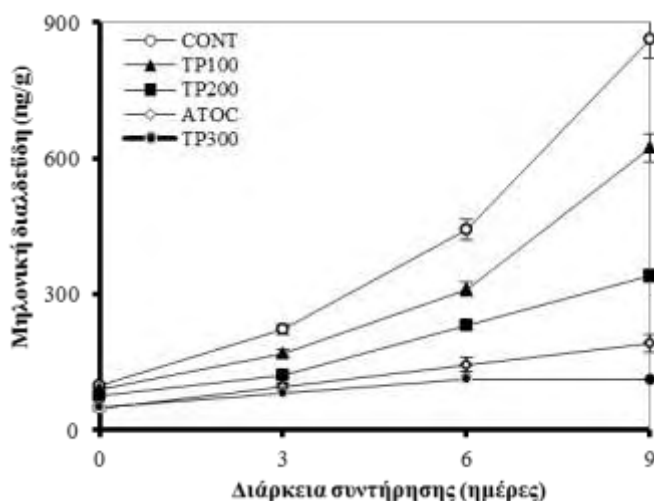
Όπως σαφώς απεικονίζεται στην Εικόνα Β3, η αντιοξειδωτική δράση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης ήταν μάλλον έντονη μειώνοντας την οξειδωση των λιπιδίων στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια

την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους σε ψύξη κατά περίπου 78%. Η συμπεριφορά αυτή δεν συνάδει με τα αποτελέσματα μιας μελέτης σχετικά με την επίδραση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης και άλλων φυσικών αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων σε φρέσκα χοιρινά λουκάνικα που συντηρούνταν στους 4 °C (Georgantelis et al. 2007). Και αυτό γιατί στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε ότι η  $\alpha$ -τοκοφερόλη προκαλούσε μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων κατά μόνο 34% την 10<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους σε ψύξη. Άλλωστε, έχει προηγουμένως αναφερθεί ότι η προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος δεν προκαλούσε μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων (Mitsumoto et al. 1993, Higgins et al. 1998, Kerry et al. 1998). Οι Kerry et al. (1998) κατέδειξαν ότι η εξωγενής προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης διαλυμένης σε 5% έλαιο σόγιας δεν προσέφερε κανένα σημαντικό πλεονέκτημα στην αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων σε χοιρινό κρέας σε σχέση με τη χορήγησή της με την ζωοτροφή. Επιπλέον, οι Kerry et al. (1998) ανέφεραν ότι η οξειδωτική σταθερότητα στήθους γαλοπούλας εμπλουτισμένου με εξωγενή  $\alpha$ -τοκοφερόλη διαλυμένη σε 1% λεπτόρευστο ορυκτέλαιο ήταν μικρότερη από ό,τι σε μπιφτέκια με ενδογενή τοκοφερόλη, παρόλο που τα μπιφτέκια με εξωγενή  $\alpha$ -τοκοφερόλη περιείχαν 95 φορές περισσότερη βιταμίνη E.

Αρκετοί ερευνητές (Mitsumoto et al. 1993, Higgins et al. 1998, Kerry et al. 1998) που ασχολήθηκαν με τη σύγκριση της χορήγησης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης με την ζωοτροφή και την άμεση προσθήκη της στο κρέας, χρησιμοποίησαν, συνήθως, έλαιο ως φορέα των αντιοξειδωτικών. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί κρεατοσκευάσματα που περιείχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις εξωγενών τοκοφερολών δεν ήταν τόσο αποτελεσματικά στην αναστολή της οξείδωσης, καθώς τα αντιοξειδωτικά συνδέονταν, κατά κύριο λόγο, με το κλάσμα της τριακυλογλυκερίνης. Έχει δειχθεί ότι όταν τα πολικά φωσφολιπίδια εκχυλίζονται από τους μύες και, στη συνέχεια, τοποθετούνται σε ένα αιώρημα ελαίου που περιέχει τοκοφερόλη, η εξωγενής τοκοφερόλη παραμένει με τα ουδέτερα λιπίδια του ελαίου και πολύ λίγη ενσωματώνεται στα φωσφολιπίδια που προστέθηκαν (Sigfusson & Hultin 2002α). Κατά συνέπεια, όταν η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) εφαρμόζεται στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης χρησιμοποιώντας ως φορέα έλαιο, στοχεύει τις ουδέτερες τριακυλογλυκερόλες αντί των πολικών φωσφολιπιδίων και, κατά συνέπεια, δεν ενεργεί ως ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες με κρέας κοτόπουλου και μοσχαρίσιο κιμά έχουν δείξει ότι σημαντικές ποσότητες των εξωγενών τοκοφερολών μπορεί να κατευθυνθούν προς τα λιγότερο σταθερά φωσφολιπίδια με την επιλογή του κατάλληλου φορέα (Sigfusson & Hultin 2002α, Sigfusson & Hultin 2002β,

Wills et al. 2007). Χρησιμοποιώντας ένα πολικό φορέα όπως η αιθανόλη, σημαντικές ποσότητες τοκοφερόλης ενσωματώθηκαν στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ σχεδόν καθόλου ενσωμάτωση δεν παρατηρήθηκε όταν το μη-πολικό αραβοσιτέλαιο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας.

Με σκοπό την επιβεβαίωση της σημασίας που έχει η επιλογή του κατάλληλου φορέα για την διοχέτευση ενός συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού στην περιοχή όπου η οξείδωση αρχίζει και/ή διαδίδεται, σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε ο πειραματισμός που περιγράφεται παρακάτω. Παρασκευάστηκαν 18 χοιρινά μπιφτέκια τα οποία κατανεμήθηκαν εξίσου σε 3 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα δεν προστέθηκε κανένα αντιοξειδωτικό (ομάδα CONT), ενώ στις δύο άλλες ομάδες προστέθηκε  $\alpha$ -τοκοφερόλη στη συγκέντρωση των 50 mg/kg. Στη βασική τους σύνθεση, τα συστατικά ανά κιλό μπιφτεκίων ήταν ως ακολούθως: 965 γρ χοιρινός κιμάς, 17 ml απεσταγμένου νερού, 3 ml αιθανόλης και 15 g NaCl.

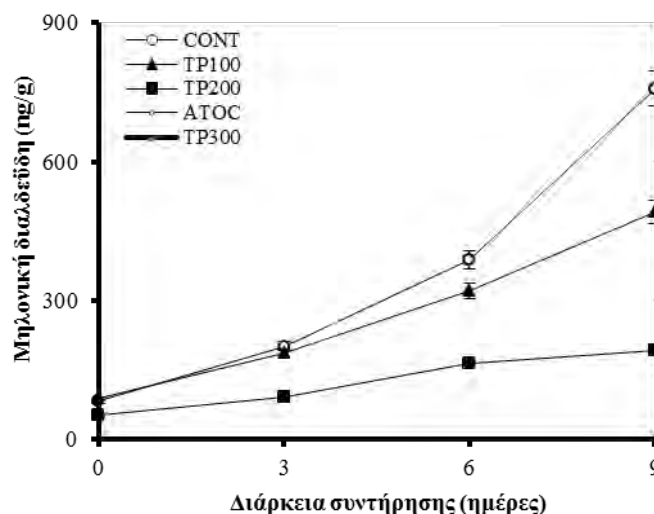


**Εικόνα Β3.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεΐδης σε νωπά μπιφτέκια.

Στις ομάδες με  $\alpha$ -τοκοφερόλη, τα 3 ml της αιθανόλης είχαν αντικατασταθεί από διάλυμα της κατάλληλης ποσότητας  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε 3 ml αιθανόλης (TOCE) ή σε 3 ml ελαίου αραβοσίτου (TOCC). Αμέσως μετά την προσθήκη της  $\alpha$ -τοκοφερόλης, τα μίγματα του κιμά υποβλήθηκαν σε διαδικασία λεπτοτεμαχισμού μέχρις ότου ληφθεί μια ομοιογενής μάζα. Η μάζα αυτή διαμορφώθηκε σε μπιφτέκια με διάμετρο 9 cm και πάχος 0,8 cm χρησιμοποιώντας τρυβλία Petri (50 g/μπιφτέκι). Τα μπιφτέκια όλων των ομάδων μεταφέρθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 4 °C και συντηρήθηκαν εκεί επί 9 ημέρες. Τα



αποτελέσματα της ανάλυσης της μηλονικής διαλδεύδης που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, έδειξαν ότι η προσθήκη της α-τοκοφερόλης προκαλούσε μείωση ( $P \leq 0,05$ ) της οξείδωσης των λιπιδίων κατά 35% όταν ο φορέας ήταν το αραβοσιτέλαιο και κατά 75% όταν ο φορέας ήταν η αιθανόλη (Εικόνα B4). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν επιπλέον πόσο σημαντικό θέμα είναι ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών κατανομής των χρησιμοποιούμενων αντιοξειδωτικών μεταξύ των διαφόρων φάσεων των τροφίμων πριν από την επιλογή του κατάλληλου φορέα διαλύτη.



**Εικόνα B4.** Επίδραση της προσθήκης α-τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg με φορέα αιθανόλη (ομάδα TOCE) ή αραβοσιτέλαιο (ομάδα TOCC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεύδης σε νωπά μπιφτέκια.

## 2.8. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων των πρωτεϊνών με τη μέθοδο DNPH χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης των πρωτεϊνών (Levine et al. 1990, Levine et al. 1994). Είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος όταν επιζητείται η διερεύνηση της οξειδωτικής κατάστασης των πρωτεϊνών και βλαβών σε κύτταρα και ιστούς (Chevion et al. 2000, Dalle-Donne et al. 2003) ή όταν εξετάζεται η οξείδωση των πρωτεϊνών σε συστήματα τροφίμων (Rowe et al. 2004b, Vuorela et al. 2005, Ventanas et al. 2006). Παρόλα αυτά, η μέθοδος έχει αμφισβητηθεί σε ό,τι αφορά την επαναληψιμότητα και την ευαισθησία της (Cao et al. 1995, Fagan et al. 1999). Στις πρώτες σχετικές έρευνες, η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε σε περίπου 5% (Reznick & Packer 1994).

Οι καρβονυλικές ενώσεις σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής αποικοδόμησης των πλευρικών αλυσίδων πρωτεϊνικών υπολειμμάτων της λυσίνης, προλίνης, αργινίνης και

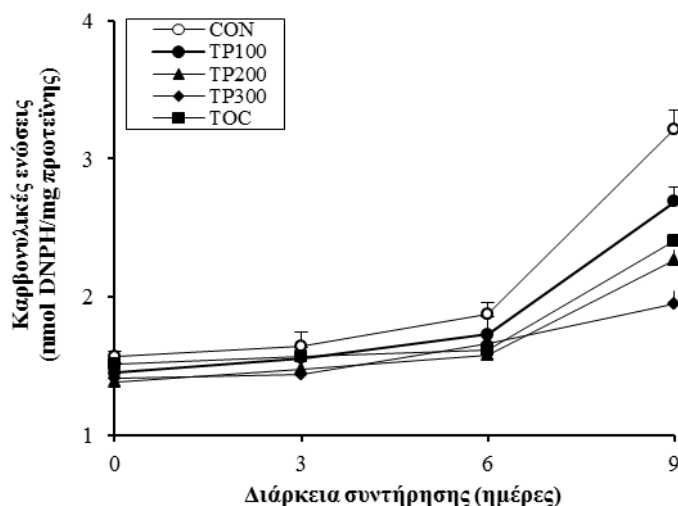
ιστιδίνης (Stadtman & Levine 2003). Μεταξύ αυτών των καρβονυλικών ενώσεων, ορισμένες ημιαλδεύδες όπως η α-αμινοαδιπική ημιαλδεύδη (AAS) και η γ-γλουταμική ημιαλδεύδη (GGS), αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% των συνολικών καρβονυλικών ενώσεων που παράγονται από τις οξειδωμένες πρωτεΐνες (Requena et al. 2001, Estevez et al. 2009).

Στην παρούσα μελέτη, η απομάκρυνση των χρωμοφόρων του κρέατος πριν από τον σχηματισμό παραγώγων με DNPH καθώς και η αύξηση του όγκου των υγρών πλύσης (αιθανόλη/οξικός αιθυλεστέρας) από 1 ml σε 5 ml, όπως περιγράφεται από τους Fagan et al. (1999), κρίθηκαν απαραίτητα για τη μείωση όλων των παρεμβολών κατά τη μέτρηση. Έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία ασκορβικού οξέος ή δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων όπως η μηλονική διαλδεύδη προκαλεί αύξηση των τιμών των καρβονυλίων όπως αυτά προσδιορίζονται με τη μέθοδο DNPH (Srinivasan et al. 1996). Το ασκορβικό μπορεί επίσης να αντιδρά απευθείας με DNPH κατά παρόμοιο τρόπο όπως μια καρβονυλική ομάδα και, ως εκ τούτου, να παρεμβαίνει στην ανάλυση, αλλά οι πρωτεΐνες του δείγματος καταβυθίζονταν και πλένονταν προσεκτικά μετά την αντίδραση του DNPH. Ως εκ τούτου, οι ποσότητες DNPH που δεν αντέδρασαν ή οι ποσότητες DNPH που είχαν συζευχθεί με λιπίδια ή άλλα συστατικά, απομακρύνονταν πριν από τη μέτρηση.

Στην Εικόνα B5 απεικονίζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα φύλλων ελιάς ή α-τοκοφερόλη και συντηρούνταν στους 4 °C επί 9 ημέρες. Κατά τις πρώτες 3 ημέρες της συντήρησης υπό ψύξη, οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε όλες τις ομάδες ήταν μάλλον χαμηλές (1,44-1,64 nmol/mg πρωτεΐνης) και δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ των ομάδων. Κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών συνέχισαν να παραμένουν χαμηλές και να μην διαφέρουν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους σε όλες τις ομάδες, παρά την αυξητική τάση που παρουσίαζαν στην ομάδα CONT (1,88 nmol/mg πρωτεΐνης) έναντι των άλλων ομάδων (1,58-1,67 nmol/mg πρωτεΐνης). Το γεγονός αυτό υποδείκνυε ότι μια πολύ περιορισμένη οξείδωση των πρωτεϊνών είχε αρχίσει να εμφανίζεται σ' αυτή την ομάδα.

Χαμηλές τιμές καρβονυλικών ενώσεων έχουν και προηγουμένως μετρηθεί σε νωπό χοιρινό κρέας που συντηρούνταν υπό ψύξη (Haak et al. 2006, Lund et al. 2007, Haak et al. 2008). Στην παρούσα, όμως, μελέτη, όταν η διάρκεια της συντήρησης παρατάθηκε στις 9 ημέρες, σημειώθηκε μια απότομη και έντονη αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε όλες τις ομάδες φθάνοντας την τιμή των 3,21 nmol/mg

πρωτεΐνης στην ομάδα CONT. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη όπου, επίσης, διαπιστώθηκε αύξηση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε νωπό χοιρινό κρέας την 9η ημέρα της συντήρησής του υπό ψύξη (Haak et al. 2006). Ωστόσο, δεν συμφωνούν με άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών LD μυών χοίρου που συντηρούνταν σε ψύξη επί 14 ημέρες (Lund et al. 2007).



**Εικόνα B5.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων σε νωπά μπιφτέκια.

Την 9η ημέρα της συντήρησης, η ομάδα TP100 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας CONT, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200. Αυτό υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) παρεμπόδιζε την οξειδωτική αβλάκωση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την ομάδα CONT, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από ό,τι στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα). Η ομάδα TP200 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων παρόμοιες ( $P > 0,05$ ) με εκείνες της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από ό,τι εκείνες της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη αναστολή της οξειδωτικής αβλάκωσης των πρωτεϊνών εμφανιζόταν με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στην δόση των 300 mg GAE/kg.

Όπως έχει αναφερθεί, οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στους μυϊκούς ιστούς παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με το είδος των μυών και τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών (Fagan et al. 1999). Σε γενικές γραμμές, η μέση συγκέντρωση

των καρβονυλίων σε μη οξειδωμένο μυϊκό ιστό είναι 1 nmol/mg πρωτεΐνης, ενώ σε οξειδωμένο ιστό κυμαίνεται από 2 έως 14 nmol/mg πρωτεΐνης, ανάλογα με τον μηχανισμό της οξείδωσης, τον βαθμό της οξείδωσης, το είδος των μυών και τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών (Reznick & Packer 1994, Mercier et al. 1998, Fagan et al. 1999, Rowe et al. 2004a).

Στην παρούσα μελέτη, η μέση συγκέντρωση των καρβονυλίων στην ομάδα TP300 ήταν μικρότερη από 2 nmol/mg την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε ψύξη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια ήταν μάλλον περιορισμένη, όταν το εκχύλισμα φύλλων ελιάς είχε προστεθεί στη δόση των 300 mg GAE/kg κρέατος.

Η ανασταλτική δράση των προστιθέμενων εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών θα μπορούσε να αποδοθεί στις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις οι οποίες εμφάνισαν έντονη αντιοξειδωτική δράση *in vitro* τόσο με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> όσο και με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Η συγκέντρωση των προστιθέμενων εκχυλισμάτων επηρέασε την οξειδωτική σταθερότητα των νωπών χοιρινών μπιφτεκίων υποδεικνύοντας ότι η αποτελεσματικότητά τους εξαρτώνταν από την συγκέντρωσή τους. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, οι Viljanen et al. (2004a) και οι Vuorela et al. (2005) επίσης διαπίστωσαν ανασταλτική δράση των πολυφαινολών έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Επίσης, οι Ventanas et al. (2006) ανέφεραν ότι η προσθήκη της βιταμίνης E σε χοιρινά κρεατοσκευάσματα ανέστειλε το σχηματισμό καρβονυλίων των πρωτεϊνών. Σε αντίθεση, η  $\alpha$ -τοκοφερόλη που χορηγούνταν με τις ζωοτροφές βρέθηκε να ασκεί μικρή ή καθόλου επίδραση στον σχηματισμό καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε βόειο κρέας (Rowe et al. 2004a) ή σε μεμβράνες μικροσωματίων που απομονώθηκαν από γαλοπούλες (Batifoulier et al. 2002). Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα ίσως υποδεικνύουν ότι η επίδραση των αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των πρωτεϊνών φαίνεται να εξαρτάται από το είδος των τροφίμων και πιο συγκεκριμένα από το είδος των πρωτεϊνών, την παρουσία μεταλλικών ιόντων και τον μηχανισμό και τις συνθήκες της οξείδωσης (θερμότητα, συσκευασία υψηλής ατμόσφαιρας οξυγόνου, ακτινοβολία). Επομένως, περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται για τη βελτιστοποίηση της προστασίας των πρωτεϊνών από την οξείδωση.

### **2.9. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφωδρυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C**

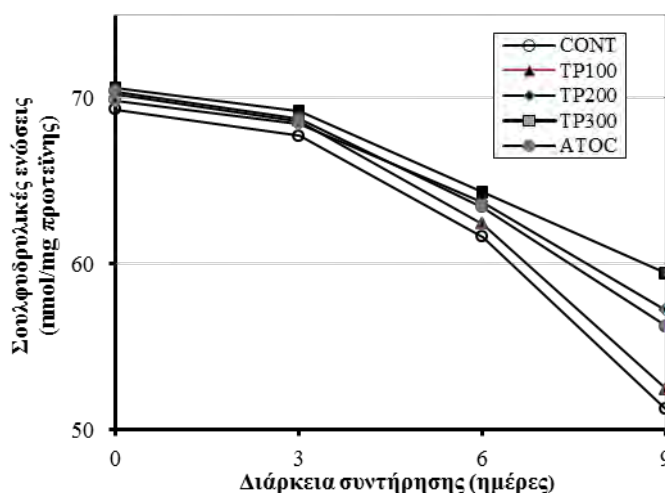
Μολονότι ο προσδιορισμός των καρβονυλίων των πρωτεϊνών με τη δοκιμασία DNPH

θεωρείται μια διαδικασία ρουτίνας για την εκτίμηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών, πολλοί ερευνητές έχουν επισημάνει τα μειονεκτήματα της δοκιμασίας αυτής στην απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Έχει αναφερθεί μεταξύ άλλων, ότι το σύνολο των καρβονυλίων των πρωτεϊνών όπως αυτό προσδιορίζεται με τη δοκιμασία DPNH, δεν αντανακλά με ακρίβεια την έκταση της οξειδωσης των πρωτεϊνών, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι πολλαπλές οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών δεν οδηγούν πάντα σε σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων (Estevez 2011). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες μπορεί να περιέχουν καρβονυλικές ομάδες ως αποτέλεσμα μηχανισμών που δεν σχετίζονται με την οξειδωτική αποικοδόμηση πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνικών υπολειμμάτων των αμινοξέων (Requena et al. 2003). Ως εκ τούτου, η δοκιμασία DPNH ενδέχεται να υπερεκτιμά τη συνολική οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών, υπερεκτιμώντας τη συνολική ποσότητα των καρβονυλίων των πρωτεϊνών εξαιτίας της παρουσίας παρενοχλήσεων, πλεονάζοντος DPNH και καρβονυλικών ενώσεων προερχομένων από λιπίδια (Armenteros et al. 2009). Παρόλα αυτά, η δοκιμασία DPNH εξακολουθεί να είναι χρήσιμη για μελέτες σχετικές με την οξειδωση των πρωτεϊνών στο κρέας, εφόσον συμπληρωματικές τεχνικές, όπως αυτές που βασίζονται στην απώλεια των σουλφυδρυλιομάδων ή στην οξειδωση της θρυπτοφάνης, χρησιμοποιούνται για να δώσουν μια αξιόπιστη συνολική εικόνα του βαθμού της οξειδωσης.

Η μέθοδος που βασίζεται στον προσδιορισμό των σουλφυδρυλιομάδων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα για την οξειδωση της κυστεΐνης. Η οξειδωση της κυστεΐνης μπορεί να επάγει διασταυρούμενους δεσμούς στις πρωτεΐνες με σχηματισμό ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών, γεγονός που συνεπάγεται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ελεύθερων σουλφιδρυλιομάδων τόσο μικρότερη είναι και η οξειδωση της κυστεΐνης. Ο σχηματισμός εξαιτίας της οξειδωσης, διασυνδεδεμένων μορίων πρωτεϊνών στο κρέας, μπορεί να εμφανιστεί ως αποτέλεσμα διαφόρων αντιδράσεων που περιλαμβάνουν οξειδωση των σουλφυδρυλιομάδων της κυστεΐνης προς σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, σχηματισμό διτυροσίνης, και αντίδραση μεταξύ ενός καρβονυλίου μιας πρωτεΐνης με μία ε-αμινομάδα του υπολείμματος λυσίνης μιας άλλης πρωτεΐνης (Xiong 2000). Η μετατροπή των σουλφυδρυλιομάδων σε δισουλφίδια και άλλα οξειδωμένα είδη είναι ένα από τα πρώτα παρατηρήσιμα γεγονότα κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των πρωτεϊνών (Dean et al. 1991). Η απώλεια των σουλφιδρυλιομάδων μπορεί να οφείλεται στο σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών είτε εντός είτε μεταξύ των πολυπεπτιδίων. Η μείωση των

σουλφουρυλιομάδων μπορεί επίσης να οφείλεται και σε αντιδράσεις αποικοδόμησης.

Στην Εικόνα Β6 απεικονίζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των σουλφουρυλιομάδων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα φύλλων ελιάς ή  $\alpha$ -τοκοφερόλη και συντηρούνταν στους 4 °C επί 9 ημέρες. Κατά την έναρξη της συντήρησης, οι αρχικές συγκεντρώσεις των σουλφουρυλιομάδων βρίσκονταν στην περιοχή 69,3-70,6 nmol/mg πρωτεΐνης και δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ των ομάδων. Σε προηγούμενες σχετικές μελέτες, οι αρχικές συγκεντρώσεις των σουλφουρυλιομάδων κατά την έναρξη της συντήρησης χοιρινού κρέατος βρέθηκαν στην περιοχή 45-50 nmol/mg πρωτεϊνών (Lund et al. 2007) ή στην περιοχή 72,8-75,2 nmol/mg πρωτεϊνών (Botsoglou et al. 2012). Οι αρχικές αυτές συγκεντρώσεις δεν άλλαξαν ( $P>0,05$ ) την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης κυμαινόμενες στην περιοχή 67,7-69,2 nmol/mg πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό υποδεικνυε ότι οξείδωση πρωτεϊνών δεν είχε λάβει χώρα αυτό το διάστημα.



**Εικόνα Β6.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των σουλφουρυλίων σε νωπά μπιφτέκια.

Όταν η συντήρηση των δειγμάτων παρατάθηκε στις 6 και, στη συνέχεια, στις 9 ημέρες, σημειώθηκε έντονη μείωση ( $P\leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων των σουλφουρυλίων σε όλες τις ομάδες. Η μείωση αυτή ήταν χαμηλότερη ( $P\leq 0,05$ ) κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα με τη συγκέντρωση των σουλφουρυλίων της CONT ομάδος να μειώνεται από 69,3 σε 61,6 nmol/mg πρωτεΐνης (απώλεια σουλφουρυλίων 11,1%), αλλά μεγαλύτερη ( $P\leq 0,05$ ) κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα με την συγκέντρωση των σουλφουρυλίων της CONT ομάδος να μειώνεται σε 51,2 nmol/mg πρωτεΐνης (απώλεια σουλφουρυλίων 26,1%). Η μεγαλύτερη απώλεια σουλφουρυλίων μετά την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, υποδεικνυε την έντονότερη οξείδωση των πρωτεϊνών καθώς ο χρόνος συντήρησης αυξανόταν. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με

προηγούμενες σχετικές αναφορές (Haak et al. 2008, Botsoglou et al. 2012).

Από την Εικόνα Β6 φαίνεται ότι μολονότι την 6<sup>η</sup> ημέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων μεταξύ των ομάδων, την 9<sup>η</sup> ημέρα το προφίλ των σουλφυδρυλίων άλλαξε. Οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους σε ό,τι αφορά το περιεχόμενό τους σε σουλφυδρύλια, παρουσίαζαν συγκεντρώσεις σουλφυδρυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, οι οποίες επίσης δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους.

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σουλφυδρυλίων μεταξύ όλων των ομάδων παρουσιάστηκαν από την ομάδα TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδείκνυαν ότι το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) δεν προστάτευε τις πρωτεΐνες από την οξείδωση, ενώ στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα) ήταν αποτελεσματικότερο και ισοδύναμο προς την  $\alpha$ -τοκοφερόλη. Η μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών με το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς παρουσιαζόταν στη δόση των 300 mg GAE/kg. Τα αποτελέσματα αυτά έδειχναν, επιπλέον, ότι τόσο το είδος του προστιθέμενου αντιοξειδωτικού όσο και η συγκέντρωσή του επηρέαζαν σημαντικά την οξείδωση των πρωτεϊνών.

## ΤΡΙΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ

### **Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C**

#### **1. Υλικά και μέθοδοι**

Τα υλικά και οι μέθοδοι που ήδη περιγράφηκαν στις ενότητες 1.1- 1.16 της δεύτερης φάσης χρησιμοποιήθηκαν και για τις ανάγκες της τρίτης φάσης, με τη διαφορά ότι όπως αναφέρεται στην ενότητα 1.6 της δεύτερης φάσης, τα μπιφτέκια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσης φάσης ήταν αποκλειστικά εκείνα της δεύτερης υποομάδος.

#### **2. Αποτελέσματα και συζήτηση**

Τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των χοιροτροφών στη βασική χημική σύσταση, το pH, την απώλεια οπού και τη σύσταση σε λιπαρά οξέα του επιμήκους ραχιαίου μυός των χοίρων, περιγράφηκαν στις ενότητες 2.1 και 2.2 της δεύτερης φάσης.

##### ***2.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο pH ψητών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C***

Η επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις τιμές pH των ψητών μπιφτεκιών που συντηρούνταν σε συνθήκες ψύξης, παρουσιάζεται στον Πίνακα Γ1. Καθόλη την περίοδο συντήρησης των 9 ημερών, οι τιμές pH των μπιφτεκιών όλων των ομάδων δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους και ήταν στην περιοχή τιμών 6,06-6,19, που είναι συγκρίσιμη με εκείνη που αναφέρθηκε από άλλους ερευνητές (Choe et al. 2011, Lara et al. 2011). Οι υψηλότερες τιμές pH στα ψητά μπιφτέκια σε σχέση με τα νωπά μπιφτέκια στα οποία, όπως περιγράφεται στη ενότητα 2.3 της Β φάσης, οι τιμές pH ήταν στην περιοχή 5,82-5,75, θα μπορούσαν να αποδοθούν σε έκθεση των βασικών ομάδων των πρωτεϊνών και αμινοξέων που οφειλόταν σε μετουσίωση των πρωτεϊνών εξαιτίας της διαδικασίας μαγειρέματος (Verma & Sahoo 2000).



**Πίνακας Γ1.** Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις τιμές pH ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών κατά την συντήρησή τους στους 4 °C

Τιμές pH κατά τη συντήρηση ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών				
	0 ημέρες	3 ημέρες	6 ημέρες	9 ημέρες
CONT	6,16 ± 0,01	6,11 ± 0,02	6,06 ± 0,02	6,09 ± 0,02
TP100	6,18 ± 0,02	6,20 ± 0,04	6,12 ± 0,03	6,10 ± 0,04
TP200	6,19 ± 0,02	6,17 ± 0,03	6,11 ± 0,05	6,12 ± 0,04
TP300	6,17 ± 0,03	6,15 ± 0,03	6,09 ± 0,04	6,09 ± 0,04
ATOC	6,19 ± 0,04	6,16 ± 0,02	6,12 ± 0,04	6,10 ± 0,03

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια σειρά με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

## 2.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο χοιρινών μπιφτεκιών

Εκτός από το pH, η απώλεια βάρους κατά το μαγείρεμα είναι ένας άλλος σημαντικός δείκτης της ποιότητας του κρέατος (Chiavaro et al. 2008). Η απώλεια βάρους κατά το μαγείρεμα αντανακλά την ικανότητα ενός συστήματος τροφίμων να συγκρατεί το νερό και το λίπος μετά τη μετουσίωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Swatland 1999).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο που κυμαινόταν από 19,3% έως 20,7% μεταξύ των ομάδων δεν επηρεαζόταν ( $P > 0,05$ ) από την προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και της α-τοκοφερόλης στα χοιρινά μπιφτέκια (Πίνακας Γ2).

**Πίνακας Γ2.** Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο των χοιρινών μπιφτεκιών

Ομάδες	Απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο, (%)
CONT	19,6 ± 0,7
TP100	19,3 ± 0,6
TP200	20,4 ± 0,4
TP300	20,7 ± 0,6
ATOC	19,9 ± 0,4

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια σειρά με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτες που ανέφεραν ότι η απώλεια βάρους κατά το μαγείρεμα μπιφτεκιών (21,7-23,6%) δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη εκχυλισμάτων φρούτων (Ganhao et al. 2010). Είναι επίσης συγκρίσιμα με άλλες μελέτες που βρήκαν ότι η προσθήκη λουτεΐνης, σησαμελαίου, ελλαγικού οξέος και εκχυλίσματος

φύλλων ελιάς σε χοιρινά μπιφτέκια δεν είχε σημαντική επίδραση στην απώλεια βάρους κατά το μαγείρεμα (Hayes et al. 2010β). Ωστόσο, έρχονται σε αντίθεση με μελέτες που ανέφεραν ότι η χρήση εκχυλισμάτων δεντρολίβανου και βάλσαμου λεμονιού θα μπορούσε να μειώσει την απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο από 19% σε 15,9% και σε 14,0%, αντίστοιχα, σε μπιφτέκια από χοιρινό κρέας (Lara et al. 2011).

### **2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα ψητών χοιρινών μπιφτεκιών που συντηρούνταν στους 4 °C**

Στον Πίνακα Γ3 παρουσιάζονται οι παράμετροι του χρώματος όπως αυτές μετρήθηκαν στην επιφάνεια των ψημένων χοιρινών μπιφτεκιών κατά την διάρκεια της συντήρησής τους στους 4 °C. Παρά την προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ή της  $\alpha$ -τοκοφερόλης, οι τιμές  $a^*$  (ερυθρότητα) όλων των ομάδων μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σταδιακά με την επιμήκυνση του χρόνου της συντήρησης. Τα αποτελέσματα αυτά δεν έρχονται σε αντίθεση με αναφορές προηγούμενων σχετικών μελετών (Hayes et al. 2010). Έτσι, στις ομάδες CONT και TP100, οι τιμές  $a^*$  μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σταδιακά με το χρόνο συντήρησης φθάνοντας την 9η ημέρα στις τιμές 1,73 και 2,17, αντίστοιχα, ενώ στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC οι τιμές  $a^*$  παρέμεναν αμετάβλητες ( $P > 0,05$ ) μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα για να μειωθούν ( $P \leq 0,05$ ) σταδιακά, στη συνέχεια, φθάνοντας την 9η ημέρα στις τιμές των 3,98, 4,43 και 4,06, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η προσθήκη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στις δόσεις των 200 ή 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg, δεν επέτρεπαν τη μείωση της παραμέτρου  $a^*$  στις τιμές που καταγράφονταν με τη δόση των 100 mg GAE/kg. Επιπλέον, υποδηλώνουν ότι μεταξύ των αντιοξειδωτικών που εξετάστηκαν, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg/kg ήταν το πιο αποτελεσματικό, αφού με αυτό καταγράφονταν οι υψηλότερες τιμές  $a^*$  τόσο την 6<sup>η</sup> όσο και την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς έναντι της παραμέτρου  $a^*$  θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων που υπάρχουν σε αυτά τα εκχυλίσματα. Αρκετοί συγγραφείς έχουν συσχετίσει την ερυθρότητα των κρεατοσκευασμάτων με την οξείδωση των λιπιδίων, υποστηρίζοντας ότι η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί σε μείωση της ερυθρότητας (Fernandez-Lopez et al. 2004, 2005). Σε ό,τι πάλι αφορά τις παραμέτρους  $L^*$  (φωτεινότητα) και  $b^*$  (ωχρότητα), οι τιμές τους δεν επηρεάστηκαν ( $P > 0,05$ ) ούτε από την διάρκεια του χρόνου συντήρησης ούτε από την προσθήκη των αντιοξειδωτικών (Πίνακας Γ3).

Στην παρούσα μελέτη, τα μπιφτέκια της ομάδας CONT υπέστησαν έντονο αποχρωματισμό κατά την συντήρηση εξαιτίας της απώλειας της ερυθρότητας (παράμετρος  $a^*$ ). Απώλεια ερυθρότητας σε αλλαντικά που συντηρούνταν σε ψύξη η κατάψυξη έχει αναφερθεί σε σχετικές μελέτες (Ramirez et al. 2004, Hassaballa et al. 2009). Πιστεύεται ότι ο κοκκινικάστανος χρωματισμός των μαγειρεμένων κρεάτων καθορίζεται κυρίως από την πρωτεΐνη της αίμης, η οποία μετουσιώνεται και ο σίδηρος οξειδώνεται στην τρισθενή μορφή του, ενώ η χρωστική της αιματίνης παραμένει άθικτη (Lawrie 1998). Ακόμη υποστηρίζεται ότι άλλοι παράγοντες, οι οποίοι επίσης επηρεάζουν, είναι ο σχηματισμός κατά τη θέρμανση έγχρωμων προϊόντων της αντίδρασης Maillard, η φυσικοχημική κατάσταση των πρωτεϊνών και άλλων συστατικών του κρέατος καθώς και η χρώση των χρησιμοποιούμενων προσθετικών (Fox 1994, Lawrie 1998).

**Πίνακας Γ3.** Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) ψημένων χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνταν στους 4 °C

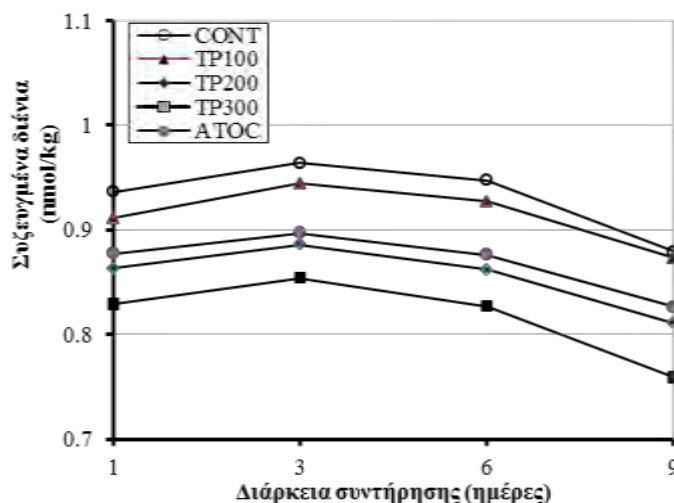
	1 <sup>η</sup> ημέρα	3 <sup>η</sup> ημέρα	6 <sup>η</sup> ημέρα	9 <sup>η</sup> ημέρα
$L^*$				
CONT	61,62 ± 0,11	62,18 ± 0,07	61,80 ± 0,11	61,29 ± 0,06
TP100	61,70 ± 0,06	61,81 ± 0,05	61,28 ± 0,08	61,09 ± 0,06
TP200	61,28 ± 0,09	60,82 ± 0,08	61,19 ± 0,07	60,71 ± 0,09
TP300	60,72 ± 0,04	60,80 ± 0,10	60,44 ± 0,04	60,18 ± 0,11
ATOC	60,91 ± 0,06	61,18 ± 0,08	60,63 ± 0,09	60,47 ± 0,04
$a^*$				
CONT	4,96 ± 0,05	4,12 ± 0,02	3,66 ± 0,06	1,73 ± 0,03
TP100	4,84 ± 0,03	4,08 ± 0,04	3,44 ± 0,03	2,17 ± 0,02
TP200	5,03 ± 0,04	4,77 ± 0,03	4,18 ± 0,06	3,98 ± 0,03
TP300	5,43 ± 0,06	5,22 ± 0,04	4,76 ± 0,02	4,43 ± 0,04
ATOC	5,15 ± 0,03	4,86 ± 0,05	4,29 ± 0,04	4,06 ± 0,03
$b^*$				
CONT	13,02 ± 0,04	13,14 ± 0,05	13,23 ± 0,03	13,32 ± 0,02
TP100	13,07 ± 0,03	13,22 ± 0,06	13,17 ± 0,05	13,26 ± 0,05
TP200	12,94 ± 0,04	13,01 ± 0,05	12,98 ± 0,05	13,08 ± 0,04
TP300	12,86 ± 0,03	12,75 ± 0,04	12,91 ± 0,04	12,82 ± 0,04
ATOC	12,88 ± 0,05	12,99 ± 0,04	13,04 ± 0,06	13,01 ± 0,03

Εντούτοις, οι συγκεκριμένοι λόγοι για τον αποχρωματισμό των μαγειρεμένων κρεάτων δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί (Fox 1994). Οι Ramirez et al. (2004) προσάρμοσαν την κλασική θεωρία για τον αποχρωματισμό των νωπών κρεάτων στα μαγειρεμένα κρέατα, με τον ισχυρισμό ότι η αλλοίωση της χρώσης στα μαγειρεμένα χοιρινά κατά την συντήρησή τους υπό ψύξη προκαλούνταν από προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων. Δυστυχώς, οι

συγγραφείς αυτοί δεν παρέθεσαν λεπτομέρειες σχετικά με αυτόν τον μηχανισμό. Οι Fernandez-Gines et al. (2003) υπέδειξαν ότι η αλλοίωση του χρώματος κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη των μαγειρεμένων κρεάτων, εξηγείται από την οξειδωτική υποβάθμιση ορισμένων νιτροζοχρωστικών. Οι Estevez & Cava (2004) και οι Estevez et al. (2005) ανέφεραν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της οξείδωσης των πρωτεϊνών και του αποχρωματισμού μαγειρεμένων κρεατοσκευασμάτων που διατηρούνταν σε ψύξη. Σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς, η οξειδωτική αποικοδόμηση της μετουσιωμένης σφαιρίνης και η οξειδωτική διάσπαση της χρωστικής της αιματίνης θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απελευθέρωση του σιδήρου από το μόριο της αίμης προκαλώντας τελικά τον αποχρωματισμό του μαγειρεμένου κρέατος. Μολονότι προϊόντα που προέρχονται από λιπίδια θα μπορούσαν να προκαλέσουν οξείδωση της χρωστικής και αποχρωματισμό του κρέατος, οι επιπτώσεις της οξείδωσης των πρωτεϊνών θα μπορούσαν να είναι σημαντικά μεγαλύτερες λαμβάνοντας υπόψη ότι στην παρούσα μελέτη τα μπιφτέκια περιείχαν πρωτεΐνες δέκα φορές περισσότερες από ό,τι λιπίδια. Ελεύθερες ρίζες πρωτεϊνών και άλλα προϊόντα της οξείδωσής τους είναι γνωστό ότι επάγουν την οξείδωση των λιπιδίων (Viljanen et al. 2004) και επομένως, οι χρωστικές της αίμης σε μαγειρεμένα κρέατα θα μπορούσαν, επίσης, να επηρεάζονται από την προ-οξειδωτική δράση τους. Η σημαντική αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε από τους Ganhao et al. (2010) μεταξύ ερυθρότητας και οξείδωσης των πρωτεϊνών, υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση.

#### ***2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C***

Ο σχηματισμός των συζευγμένων διενίων, τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, λαμβάνει χώρα κατά τα πρώτα στάδια της οξείδωσης των λιπιδίων (Frankel 1998). Στην Εικόνα Γ1 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συζευγμένων διενίων (CD) σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε ψύξη στους 4 °C επί 9 ημέρες.



**Εικόνα Γ1.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλωνελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια

Την 1<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες TP200, TP300 και ATOC έδειξαν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων σε σύγκριση με τις ομάδες TP100 και CONT στις οποίες οι συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις αυτές αυξήθηκαν ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Την 6<sup>η</sup> ημέρα, παρουσιάστηκε σε όλες τις ομάδες μια τάση μείωσης των συγκεντρώσεων η οποία, όμως, δεν ήταν σημαντική ( $P > 0,05$ ). Αντίθετα, σημαντική μείωση ( $P \leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων συζευγμένων διενίων σημειώθηκε σε όλες τις ομάδες την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Την ημέρα αυτή, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίαζαν τις υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων σε σχέση με τις άλλες ομάδες, με μέσο όρο τις τιμές 0,879 και 0,873, αντίστοιχα. Οι ομάδες TP200 και ATOC εμφάνιζαν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) μέσες συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων με μέσο όρο τις τιμές 0,811 και 0,826, αντίστοιχα, ενώ η ομάδα TP300 παρουσίαζε τις χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες, με μέσο όρο την τιμή 0,759. Υπολογίστηκε ότι η αναστολή του σχηματισμού συζευγμένων διενίων στην ομάδα TP300 ήταν περίπου 13%.

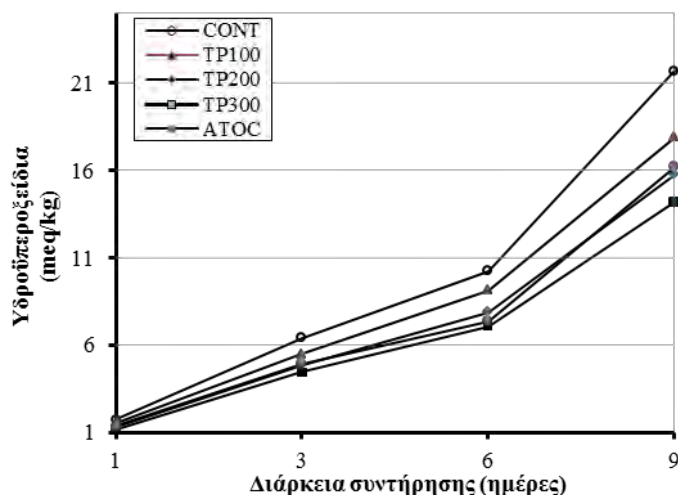
Έχοντας υπόψη ότι ο σχηματισμός των συζευγμένων διενίων σχετίζεται με την παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, οι μειώσεις των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υποδεικνυαν ότι η ταχύτητα αποσύνθεσης των υδροϋπεροξειδίων ήταν υψηλότερη από την ταχύτητα σχηματισμού των συζευγμένων διενίων. Παρόμοιες τάσεις μείωσης των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων έχουν

παρατηρηθεί κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος στο οποίο είχαν προστεθεί βασιλικός και γκάλανγκαλ (Juntachote et al. 2006), αλεσμένα φύλλα λωτού και κριθής (Choe et al. 2011), ή υδρολυμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος και σόγιας (Pena-Ramos & Xiong 2003).

### 2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C

Η τιμή υπεροξειδίων (POV) αφορά πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων και χρησιμοποιείται για να εκφράσει την οξειδωτική κατάσταση τροφίμων που περιέχουν λιπίδια. Στην Εικόνα Γ2 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των υδροϋπεροξειδίων σε ψημένα χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα φύλλων ελιάς ή  $\alpha$ -τοκοφερόλη και συντηρούνταν στους 4 °C επί 9 ημέρες. Διαπιστώνεται ότι τα ψητά χοιρινά μπιφτέκια της ομάδος CONT παρουσίαζαν κατά τη διάρκεια των 9 ημερών της συντήρησης υπό ψύξη συγκεντρώσεις υπεροξειδίων που κυμαίνονταν από 1,72 έως 21,68 meq/kg κρέατος. Προηγούμενοι συγγραφείς επίσης διαπίστωσαν ότι ο μαγειρεμένος χοιρινός κιμάς περιείχε συγκεντρώσεις υπεροξειδίων στην περιοχή τιμών 1,64-21,75 meq/kg (Juntachote et al. 2007a) ή 1,51-22,63 meq/kg (Juntachote et al. 2007b) κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη επί 14 ημέρες.

Στην παρούσα μελέτη, τα ψητά χοιρινά μπιφτέκια όλων των ομάδων παρουσίαζαν συγκεντρώσεις υπεροξειδίων που αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) με την επιμήκυνση του χρόνου της συντήρησης.



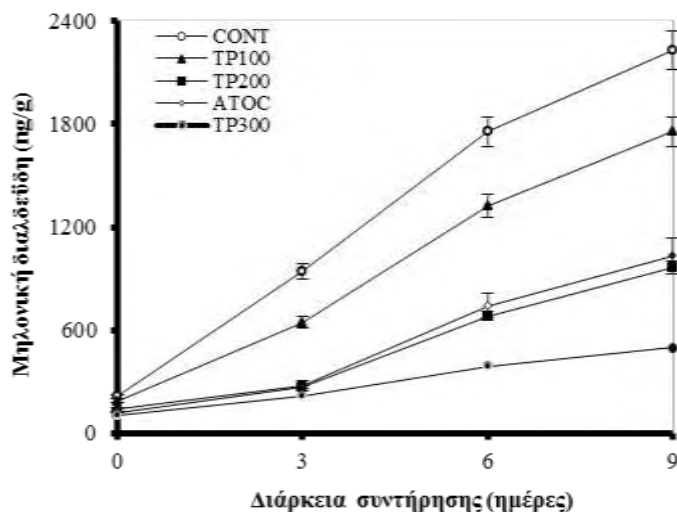
**Εικόνα Γ2.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των υδροϋπεροξειδίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια.

Την 1<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες TP100, TP200, TP300 και ATOC παρουσίασαν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις υπεροξειδίων σε σύγκριση με την ομάδα CONT. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, οι συγκεντρώσεις αυτές παρουσίασαν σταδιακή αύξηση ( $P \leq 0,05$ ), με τις συγκεντρώσεις των ομάδων TP100, TP200, TP300 και ATOC να εξακολουθούν να παραμένουν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδος CONT. Στην παρούσα μελέτη, οι μεγαλύτερες διαφορές στις συγκεντρώσεις των υπεροξειδίων μεταξύ των ομάδων παρατηρήθηκαν την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Την ημέρα εκείνη, οι μέσες συγκεντρώσεις υπεροξειδίων στις ομάδες CONT και TP200 ήταν μεγαλύτερες κατά 1,5-φορές (21,68 meq/kg) και κατά 1,1-φορές (15,75 meq/kg), αντίστοιχα, από εκείνες της ομάδας TP300 (14,21 meq/kg). Συνεπώς, οι μέσες συγκεντρώσεις υδροϋπεροξειδίων στις ομάδες TP200 και TP300 ήταν κάτω από τα 25 meq O<sub>2</sub>/kg, που θεωρούνται ως το όριο της αποδοχής στα λιπαρά τρόφιμα (Narasimhan et al. 1986, Evranuz 1993).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδήλωναν ότι όλα τα αντιοξειδωτικά που εξετάστηκαν θα μπορούσαν να επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια. Επιπλέον, υποδεικνυαν ότι η επιβράδυνση του σχηματισμού των υπεροξειδίων στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια από την προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ήταν σε εξάρτηση από την χρησιμοποιούμενη δόση, δεδομένου ότι καθώς η δόση του εκχυλίσματος αυξανόταν οι συγκεντρώσεις των υπεροξειδίων μειώνονταν. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν ότι εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού ανέστειλαν αποτελεσματικά το σχηματισμό των υπεροξειδίων σε ιχθυέλαιο κατά έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Wanasundara & Shahidi 1998).

## ***2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεϋδης σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C***

Η επιδεκτικότητα των ψημένων χοιρινών μπιφτεκίων στην οξείδωση των λιπιδίων κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, ως συνάρτηση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ή α-τοκοφερόλης, απεικονίζεται στην Εικόνα Γ3. Η συντήρηση των δειγμάτων σε ψύξη προκαλούσε σε όλες τις ομάδες αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA), ενός δευτερογενούς προϊόντος της οξείδωσης των λιπιδίων. Μία ανάλογη κατανομή των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεϋδης παρατηρήθηκε στη Β φάση της παρούσης μελέτης όταν νωπά χοιρινά μπιφτέκια υποβλήθηκαν σε ψύξη επί 9 ημέρες (Εικόνα Β3 της Β φάσης).



**Εικόνα Γ3.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεύδης σε ψητά μπιφτέκια.

Ωστόσο, τα ψητά μπιφτέκια έδειξαν υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεύδης και, συνεπώς, μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξείδωση από τα νωπά μπιφτέκια. Το ψήσιμο προκαλεί διάρρηξη των μεμβρανών που απελευθερώνει προ-οξειδωτικές ουσίες, όπως ο σίδηρος που δεν προέρχεται από την αίμη, οι οποίες επιταχύνουν τις οξειδωτικές διεργασίες (Tichivangana & Morrissey 1985).

Κατά την έναρξη της συντήρησης (ημέρα 0), οι αρχικές συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης σε όλες τις ομάδες ήταν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδος. Αυτό υποδεικνύει ότι τα δοκιμαζόμενα αντιοξειδωτικά επιβράδυναν την οξείδωση των λιπιδίων κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά το ψήσιμο, όπως έχει επίσης αναφερθεί από τους Ahn et al. (2002) και Fernandez-Lopez et al. (2003). Οι Gray & Pearson (1987) κατέδειξαν ότι τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, τα οποία είναι πρωτογενή υποστρώματα της οξείδωσης των λιπιδίων δεδομένου ότι είναι συστατικά πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και είναι, επίσης, σε στενή επαφή με καταλύτες της οξείδωσης των λιπιδίων που βρίσκονται στην υδατική φάση των μυϊκών κυττάρων (Gandemer 1998), είναι υπεύθυνα για την αρχική ανάπτυξη της οξείδωσης σε μαγειρεμένα κρεατοσκευάσματα κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους.

Γενικά, η διάρκεια συντήρησης είχε σημαντική επίδραση στην οξείδωση των λιπιδίων στα ψητά μπιφτέκια με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της



μηλονικής διαλδεΰδης. Οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης σε όλες τις ομάδες ήταν σημαντικά χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδος σε κάθε χρονικό σημείο, υποδεικνύοντας έτσι την υψηλή προστασία των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, πιθανώς εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες, έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων στα ψητά μπιφτέκια.

Η ομάδα TP100 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδος, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αυτό υποδείκνυε ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg κρέατος (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με την ομάδα CONT, αλλά ήταν περισσότερο αποτελεσματικό στη δόση των 200 mg GAE/kg κρέατος (TP200 ομάδα). Επιπλέον, η ομάδα TP200 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης παρόμοιες ( $P > 0,05$ ) με αυτές της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP300, ένα δεδομένο που υποδηλώνει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg προσέφερε την υψηλότερη προστασία έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων.

Την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό ψύξη, η προσθήκη του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg κρέατος (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων σε σχέση με την ομάδα CONT κατά περίπου 21%, στη δόση των 200 mg GAE/kg κρέατος (TP200 ομάδα) κατά περίπου 57% και στη δόση των 300 mg GAE/kg κρέατος (TP300 ομάδα) κατά περίπου 77%.

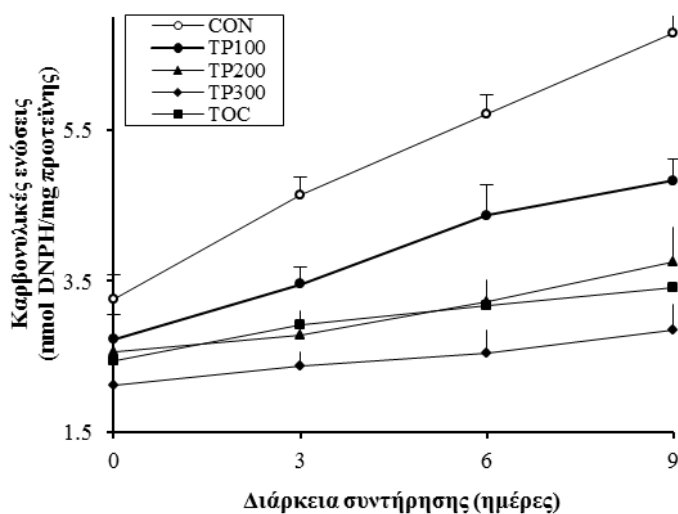
Οι Sheard et al. (2000) πρότειναν να θεωρηθούν ως οριακές τιμές για την αποδοχή από τους καταναλωτές του ταγγίσματος στα τρόφιμα, συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης μεγαλύτερες των 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Με βάση αυτά, στην παρούσα μελέτη τα δείγματα της CONT ομάδος θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ταγγισμένα ήδη κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό ψύξη, ενώ τα δείγματα της ομάδος TP300 κατάλληλα για κατανάλωση μέχρι και την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης αφού οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης δεν υπερέβησαν το όριο των 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  μέχρι το τέλος της περιόδου συντήρησης.

## ***2.7. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C***

Στην Εικόνα Γ4 απεικονίζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα φύλλων ελιάς ή  $\alpha$ -τοκοφερόλη και συντηρούνταν στους 4 °C επί 9 ημέρες.

Στην ομάδα CONT, η αρχική συγκέντρωση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών ήταν περίπου 3,3 nmol/mg πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση αυτή είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται σε ένα βασικό επίπεδο καρβονυλίων της τάξης περίπου των 3,7 nmol/mg πρωτεΐνης σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια (Ganhao et al. 2010). Διαφέρει, όμως, από άλλες μελέτες που ομιλούν για επίπεδα καρβονυλίων των πρωτεϊνών της περιοχής 1,87-2,32 (Haak et al. 2006, Rodríguez-Carpena et al. 2012) ή της περιοχής 0,4-0,9 nmol/mg πρωτεΐνης (Vuorela et al. 2005, Salminen et al. 2006) σε μαγειρεμένο χοιρινό.

Το περιεχόμενο των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στην CONT ομάδα αυξανόταν ( $P \leq 0,05$ ) κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη, υποδεικνύοντας ότι οι πρωτεΐνες του κιμά στα ψητά μπιφτέκια ήταν επιδεκτικές στις οξειδωτικές αντιδράσεις που οδηγούσαν σε αύξηση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών. Η αύξηση αυτή έφθασε στη μέγιστή της τιμή (6,78 nmol/mg), η οποία ήταν πάνω από το διπλάσιο της αρχικής συγκέντρωσης των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στην CONT την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε ψύξη.



**Εικόνα Γ4.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων των σε ψητά μπιφτέκια.

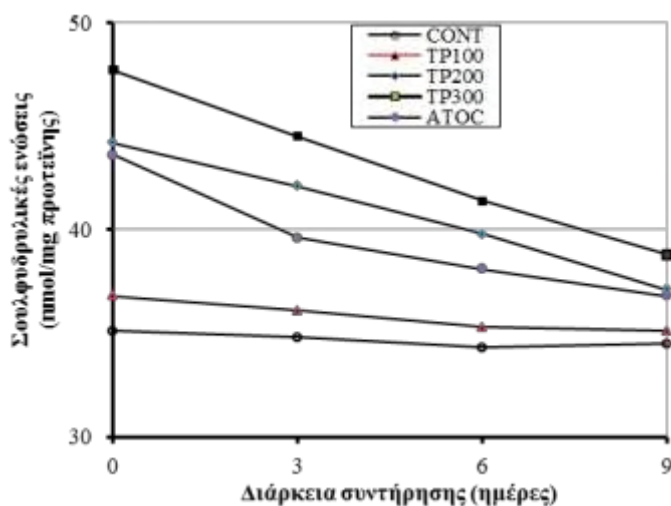
Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αρκετές μελέτες (Vuorela et al. 2005, Ganhao et al. 2010), αλλά έρχονται σε αντίθεση με κάποιες άλλες (Batifoulier et al. 2002, Mercier et al. 2004, Salminen et al. 2006) που αναφέρουν μια αρχική αύξηση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ημερών της συντήρησης και τη μείωσή τους τις επόμενες ημέρες.

Οι μάλλον υψηλές συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών που προσδιορίστηκαν στην CONT ομάδα της παρούσης μελέτης, υποδεικνυαν πιο έντονες οξειδωτικές αντιδράσεις από εκείνες που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες με μαγειρεμένο χοιρινό κρέας που συντηρούνταν υπό ψύξη (Vuorela et al. 2005, Salminen et al. 2006, Rodriguez-Carpena et al. 2012). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αίμη και ο ελεύθερος σίδηρος, καθώς και οξειδωτικά λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της οξείδωσης των πρωτεϊνών των μυών (Park et al. 2006, Estevez et al. 2008a, Estevez et al. 2008b, Salminen et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη, ο εμπλουτισμός του κρέατος με *n-3* λιπαρά οξέα, η προσθήκη NaCl, η διαδικασία του τεμαχισμού και οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονταν κατά τη διάρκεια του ψησίματος θα μπορούσαν να ενισχύσουν την οξείδωση των πρωτεϊνών στα μπιφτέκια. Ο τεμαχισμός του κρέατος οδηγεί σε απελευθέρωση φυσικών προ-οξειδωτικών στους μύες, ενώ η θέρμανση μετουσιώνει τη μυοσφαιρίνη προκαλώντας απελευθέρωση του σιδήρου (Schrickler & Miller 1983, Kristensen & Purslow 2001).

Από την Εικόνα Γ4 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων σε όλες τις ομάδες ήταν σημαντικά χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνη της CONT ομάδος, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Το γεγονός αυτό υποδείκνυε προστασία των πρόσθετων αντιοξειδωτικών έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών στα χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν υπό ψύξη. Η ομάδα TP100 παρουσίαζε συγκεντρώσεις καρβονυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδος, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αυτό υποδείκνυε ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg κρέατος (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την CONT ομάδα, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από τη δόση των 200 mg GAE/kg κρέατος (TP200 ομάδα). Η ομάδα TP200 παρουσίαζε συγκεντρώσεις καρβονυλίων παρόμοιες ( $P > 0,05$ ) με εκείνες της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP300, γεγονός που υποδηλώνει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg προσέφερε την υψηλότερη προστασία έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Επιπλέον, υποδεικνυαν ότι η επιβράδυνση των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια από την προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ήταν σε συνάρτηση από την χρησιμοποιούμενη δόση, δεδομένου ότι καθώς η δόση του εκχυλίσματος αυξανόταν οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων μειώνονταν.

## 2.8. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων των πρωτεϊνών σε ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στους 4 °C

Οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων που προσδιορίστηκαν στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια κατά την διάρκεια της συντήρησής τους στους 4 °C επί 9 ημέρες, απεικονίζονται στην Εικόνα Γ5. Κατά την έναρξη της συντήρησης (ημέρα 0), οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων στα ψητά μπιφτέκια κυμαίνονταν στην περιοχή τιμών 35,1-47,7 nmol/mg πρωτεΐνης και διέφεραν μεταξύ των ομάδων, μολονότι πριν από το ψήσιμο οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων κυμαίνονταν στην περιοχή τιμών 69,3-70,6 nmol/mg πρωτεΐνης και δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ των ομάδων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το ψήσιμο προκαλούσε μείωση ( $P\leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων των σουλφουδρυλίων στα νωπά μπιφτέκια προάγοντας, επομένως, την οξείδωση των πρωτεϊνών. Σε άλλες μελέτες, οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων μετά το ψήσιμο κυμαίνονταν στην περιοχή 45-50 nmol/mg πρωτεΐνης για χοιρινό κρέας (Lund et al. 2007), ή στην περιοχή 19-30 nmol/mg πρωτεΐνης για μυσσίνη χοίρου (Frederiksen et al. 2008).



**Εικόνα Γ5.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC) ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης στους 4 °C, επί των συγκεντρώσεων των σουλφουδρυλίων σε νωπά μπιφτέκια.

Στην παρούσα μελέτη, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) αρχικά μεταξύ τους (35,1 έναντι 36,8 nmol/mg πρωτεΐνης), παρουσίαζαν μετά το ψήσιμο συγκεντρώσεις σουλφουδρυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, οι οποίες επίσης δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους (44,2 έναντι 43,6 nmol/mg πρωτεΐνης). Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίαζαν, με τη σειρά τους, συγκεντρώσεις

σουλφουδρυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνη της ομάδος TP300 (47,7 nmol/mg πρωτεΐνης) μετά το ψήσιμο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνυαν ότι η παρουσία στα μπιφτέκια των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ή της  $\alpha$ -τοκοφερόλης, επιβράδυναν την οξειδωση των πρωτεϊνών σε ποικίλο βαθμό.

Μείωση των συγκεντρώσεων των σουλφουδρυλίων μετά το ψήσιμο έχει επίσης παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες με χοιρινό κρέας (Promeyrat et al. 2010) και χοιρινά μπιφτέκια (Lara et al. 2011). Ωστόσο, έχει επίσης αναφερθεί και αύξηση των συγκεντρώσεων των σουλφουδρυλίων μετά το ψήσιμο, σε μελέτες με μαγειρεμένα χοιρινά μπιφτέκια στα οποία είχαν προστεθεί εκχυλίσματα δεντρολίβανου και βάλσαμου λεμονιού (Lara et al. 2011).

Ως αποτέλεσμα της οξειδωσης των πρωτεϊνών που επέφερε το ψήσιμο και η διάρκεια συντήρησης, οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων εμφανίστηκαν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC την 3η ημέρα της συντήρησης (Εικόνα Γ5). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των ομάδων αυτών, παρά τη μείωσή τους, εξακολουθούσαν να είναι πολύ μεγαλύτερες από εκείνες των ομάδων CONT και TP100 στις οποίες δεν είχε παρατηρηθεί καμιά μείωση ( $P > 0,05$ ) την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων συνέχισαν να μειώνονται ( $P \leq 0,05$ ) στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC κατά την 6<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Ο ρυθμός μείωσης, όμως, ήταν χαμηλότερος στην ομάδα ATOC, υποδεικνύοντας μειωμένη οξειδωση των πρωτεϊνών εξαιτίας πιθανώς κάποιας απώλειας της  $\alpha$ -τοκοφερόλης κατά τη διαδικασία του ψησίματος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα μελέτης με μαγειρεμένα χοιρινά μπιφτέκια (Lara et al. 2011), αλλά διαφωνούν με σχετικές αναφορές άλλων μελετών (Haak et al. 2006, Botsoglou et al. 2012) στις οποίες οι συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας μειώνονταν μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη και, στη συνέχεια, αυξάνονταν. Η αύξηση αυτή είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αλλά η υπόθεση της ευκολότερης πρόσβασης του αντιδραστηρίου DTNP σε εσωτερικά σουλφουδρύλια λόγω της θερμικής μετουσίωσης των πρωτεϊνών, δεν μπορεί να αποκλειστεί (Gatellier et al. 2010).

Από την Εικόνα Γ5 γίνεται φανερό, ότι την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, παρουσίαζαν συγκεντρώσεις σουλφουδρυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, οι οποίες επίσης δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίαζαν, με τη σειρά τους, συγκεντρώσεις σουλφουδρυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνη της ομάδος TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς στη

δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) δεν είχε προστατευτική δράση ( $P < 0,05$ ) στην οξείδωση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την ομάδα CONT, ενώ στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα) επιβράδυνε την οξείδωση των πρωτεϊνών σε βαθμό ανάλογο με αυτόν της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Την μεγαλύτερη επιβράδυνση έναντι της οξείδωσης προσέφερε το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg.

### 2.9. Οργανοληπτική ανάλυση χοιρινών μπιφτεκίων όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις χοιροτροφές και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και $\alpha$ -τοκοφερόλης στον κιμά

Στην παρούσα μελέτη, η ελάχιστη βαθμολογία του 5 που σήμαινε "ούτε θέλω ούτε δεν αρέσω", θεωρήθηκε ότι αντιπροσώπευε ένα αποδεκτό προϊόν με βάση το κρέας, ενώ βαθμολογία κάτω του 5 θεωρήθηκε ότι αντιπροσώπευε ένα μη αποδεκτό προϊόν γιατί σηματοδοτούσε μια μεταβολή από την αδιαφορία προς την αντιπάθεια.

Μπιφτέκια της ομάδος CONT-S (ομάδα με ηλιέλαιο) έλαβαν τα αποδεκτά αποτελέσματα οσμής και γεύσης 7,8 και 6,9, αντίστοιχα (Πίνακας Γ4). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με μελέτες, στις οποίες δεν σημειώθηκε αλλαγή στο άρωμα μαγειρεμένων LD μυών χοίρου που περιείχαν αυξημένα επίπεδα λινελαϊκού οξέος λόγω της προσθήκης στις χοιροτροφές ηλιελαίου (Hartman et al. 1985, West & Myer 1987, Larick et al. 1992). Έχει πιθανολογηθεί ότι, λόγω του υψηλού επιπέδου του λινελαϊκού οξέος στο χοιρινό κρέας, τα προϊόντα οξείδωσής του αναγνωρίζονται ως φυσικά συστατικά της οσμής/γεύσης του χοιρινού κρέατος (Melton 1990).

**Πίνακας Γ4.** Οργανοληπτική ανάλυση χοιρινών μπιφτεκίων όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις χοιροτροφές, καθώς και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και  $\alpha$ -τοκοφερόλης στον κιμά

	Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	
	Οσμή	Γεύση
CONT-S	7,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
CONT-L	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	4,2 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
TP100	5,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
TP200	6,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	5,8 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
TP300	7,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
ATOC	6,5 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	5,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια στήλη με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά για  $P > 0,05$ .

Σε αντίθεση με τα μπιφτέκια της ομάδας CONT-S, τα μπιφτέκια της ομάδος CONT-L (ομάδα με λινέλαιο) έλαβαν τις μη αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης 4,9 και 4,2, αντίστοιχα (Πίνακας Γ6). Οι επιπτώσεις των αυξημένων επιπέδων  $\alpha$ -λινολενικού οξέος στο

κρέας λόγω της προσθήκης στις χοιροτροφές λινελαίου, επί του αρώματος του κρέατος είναι αντικρουόμενες. Οι Shackelford et al. (1990) ανέφεραν ότι εκπαιδευμένοι δοκιμαστές γεύσης μπορούσαν να ανιχνεύσουν δυσάρεστα αρώματα σε μαγειρεμένο ζαμπόν που περιείχε 3%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ. Επιπλέον, οι Botsoglou et al. (2012) βρήκαν ότι ο εμπλουτισμός του χοιρινού κρέατος σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ διαμέσου της προσθήκης στη χοιροτροφή λινελαίου προκαλούσε μείωση των χαρακτηριστικών του αρώματος στο μαγειρεμένο κρέας. Ωστόσο, οι Kouba et al. (2003) ανέφεραν ότι εκπαιδευμένοι δοκιμαστές γεύσης βρήκαν μια τάση μείωσης των χαρακτηριστικών οσμής και γεύσης σε χοιρινό κρέας που περιείχε περίπου 3%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ, ενώ η οργανοληπτική ανάλυση έδειξε ότι μαγειρεμένο λίπος που περιείχε πάνω από 5%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ είχε σημαντικά χαμηλότερη οσμή/γεύση χοιρινού και εντονότερο μη φυσιολογικό άρωμα. Αρκετές άλλες μελέτες έχουν καταδείξει, επίσης, την έλλειψη των επιπτώσεων της προσθήκης στις χοιροτροφές λιναρόσπορου, επί της οργανοληπτικής αξιολόγησης του μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος (Ahn et al. 1996, Oeckel et al. 1996, Matthews et al. 2000). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες ανέφεραν ότι η οργανοληπτική βαθμολόγηση παραμέτρων όπως η γεύση και η συνολική αποδοχή σε βρασμένα χοιρινά λουκάνικα δεν επηρεαζόταν από την προσθήκη λινελαίου (Valencia et al. 2008).

Σε αντίθεση με τα μπιφτέκια της ομάδας CONT-L, τα μπιφτέκια της ομάδος TP100 έλαβαν την αποδεκτή βαθμολογία οσμής 5,4 και τη μη αποδεκτή βαθμολογία γεύσης 4,9 (Πίνακας Γ4). Τα οργανοληπτικά αυτά χαρακτηριστικά βελτιώθηκαν σημαντικά στα μπιφτέκια των ομάδων TP200 και ATOC που έλαβαν αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $P>0,05$ ) και ήταν υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP100. Παρόλα αυτά, τις υψηλότερες βαθμολογίες οσμής και γεύσης έλαβαν τα μπιφτέκια της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτες που ανέφεραν ότι η προσθήκη φύλλων ελιάς, οξικής  $\alpha$ -τοκοφερόλης και λινελαίου στις χοιροτροφές ασκούσε ευεργετικό αποτέλεσμα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ψημένων χοιρινών μπριζολών εμπλουτισμένων σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (Botsoglou et al. 2012). Έρχονται, όμως, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που ανακοίνωσαν ότι η προσθήκη εκχυλισμάτων καρπών κουμαριάς, κουκουτσιών σταφυλιών και βιταμίνης E σε χοιρινό κρέας δεν είχε σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ψημένων κρεατοσκευασμάτων (Channon & Trout 2002, Carpenter et al. 2007).

## ΤΕΤΑΡΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ

**Διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν σε κατάψυξη στους  $-18^{\circ}\text{C}$**

### 1. Υλικά και μέθοδοι

Τα υλικά και οι μέθοδοι που ήδη περιγράφηκαν στις ενότητες 1.1- 1.16 της δεύτερης φάσης χρησιμοποιήθηκαν και για τις ανάγκες της τέταρτης φάσης, με τη διαφορά ότι όπως αναφέρεται στην ενότητα 1.6 της δεύτερης φάσης, τα μπιφτέκια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσης φάσης ήταν αποκλειστικά εκείνα της τρίτης υποομάδος.

### 2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του ηλιελαίου και του λινελαίου των χοιροτροφών στην βασική χημική σύσταση, το pH, την απώλεια υγρών και τη σύσταση σε λιπαρά οξέα των LD μυών των χοίρων, περιγράφηκαν στις ενότητες 2.1 και 2.2 της δεύτερης φάσης. Ακόμη, τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο pH και τη χρώση νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους  $4^{\circ}\text{C}$ , περιγράφηκαν στις ενότητες 2.3 και 2.4 της δεύτερης φάσης.

#### **2.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνταν σε κατάψυξη στους $-18^{\circ}\text{C}$**

Στον Πίνακα Δ1 παρουσιάζονται οι παράμετροι χρώματος νωπών χοιρινών μπιφτεκίων κατά τη συντήρησή τους σε κατάψυξη επί 180 ημέρες. Σε όλες τις ομάδες παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης ( $P \leq 0,05$ ) των παραμέτρων  $a^*$  (ερυθρότητα) και  $b^*$  (ωχρότητα) καθώς και μια τάση αύξησης ( $P \leq 0,05$ ) της παραμέτρου  $L^*$  (φωτεινότητα). Στις ομάδες CONT και TP100, οι τιμές της παραμέτρου  $a^*$  μειώνονταν περίπου κατά 40% και πιο συγκεκριμένα από 6,16 και 6,09 σε 3,70 και 3,65, αντίστοιχα, την 60<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε κατάψυξη. Οι μειώσεις αυτές θα μπορούσαν να αποδοθούν στη βαθμιαία οξείδωση της μυοσφαιρίνης και στη συνάθροιση της μεταμυοσφαιρίνης με την πάροδο του χρόνου



συντήρησης (Isdell et al. 2003, Ruiz de Huidobro et al. 2003, Mancini & Hunt 2005). Οι τιμές αυτές της παραμέτρου  $a^*$  παρέμειναν αμετάβλητες ( $P>0,05$ ) την 120<sup>η</sup> και 180<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε κατάψυξη.

**Πίνακας Δ1.** Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο χρώμα ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) νωπών χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνταν σε κατάψυξη στους  $-18^{\circ}\text{C}$

	1 <sup>η</sup> ημέρα	60 <sup>η</sup> ημέρα	120 <sup>η</sup> ημέρα	180 <sup>η</sup> ημέρα
$L^*$				
CONT	54,12 ± 0,07	57,36 ± 0,04	57,42 ± 0,09	57,28 ± 0,07
TP100	54,34 ± 0,04	57,62 ± 0,03	57,48 ± 0,04	57,34 ± 0,04
TP200	53,84 ± 0,09	57,08 ± 0,07	57,26 ± 0,07	57,06 ± 0,10
TP300	53,96 ± 0,05	57,20 ± 0,06	57,02 ± 0,09	56,68 ± 0,12
ATOC	53,79 ± 0,07	57,02 ± 0,11	57,06 ± 0,03	56,99 ± 0,08
$a^*$				
CONT	6,16 ± 0,07	3,70 ± 0,04	3,77 ± 0,04	3,73 ± 0,05
TP100	6,09 ± 0,04	3,65 ± 0,05	3,84 ± 0,06	3,77 ± 0,06
TP200	5,94 ± 0,04	3,98 ± 0,03	4,02 ± 0,03	3,96 ± 0,03
TP300	6,11 ± 0,06	4,58 ± 0,06	4,72 ± 0,05	4,69 ± 0,07
ATOC	5,81 ± 0,04	3,96 ± 0,06	4,04 ± 0,04	3,98 ± 0,04
$b^*$				
CONT	14,21 ± 0,05	12,35 ± 0,04	12,24 ± 0,06	12,16 ± 0,05
TP100	13,96 ± 0,04	12,20 ± 0,03	12,14 ± 0,03	12,11 ± 0,06
TP200	13,84 ± 0,03	12,46 ± 0,06	12,39 ± 0,02	12,33 ± 0,04
TP300	13,78 ± 0,06	12,40 ± 0,03	12,37 ± 0,04	12,29 ± 0,05
ATOC	13,85 ± 0,04	12,42 ± 0,05	12,34 ± 0,04	12,31 ± 0,07

Στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές της παραμέτρου  $a^*$  κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Ωστόσο, στις ομάδες TP200 και ATOC, η μείωση της παραμέτρου  $a^*$  την 60<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε κατάψυξη περιοριζόταν σε περίπου 33%, αφού οι τιμές  $a^*$  μειώνονταν ( $P\leq 0,05$ ) από 5,94 και 5,81 σε 3,98 και 3,96, αντίστοιχα. Η μείωση αυτή περιοριζόταν ( $P\leq 0,05$ ) ακόμη περισσότερο στην ομάδα TP300 και υπολογιζόταν σε περίπου 25%, αφού η τιμή  $a^*$  μειωνόταν ( $P\leq 0,05$ ) από 6,11 σε 4,58. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η προσθήκη του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg δεν βελτιώνει την σταθερότητα του ερυθρού χρώματος. Επιπλέον, υποδήλωναν ότι, η προσθήκη του εκχυλίσματος στη δόση των 200 mg GAE/kg καθώς και η προσθήκη της  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg βελτιώναν σημαντικά τη σταθερότητα του ερυθρού χρώματος κατά την κατάψυξη. Κυρίως, όμως, καταδείκνυαν την υπεροχή του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς στη διατήρηση του ερυθρού χρώματος των μπιφτεκίων κατά την κατάψυξη, όταν η προσθήκη του εκχυλίσματος γινόταν στην δόση των

300 mg GAE/kg.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι δυνατόν να αντιπαραβληθούν με σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα γιατί η επίδραση της προσθήκης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς επί του χρώματος χοιρινών μπιφτεκίων που συντηρούνται σε κατάψυξη δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Ωστόσο, είναι σε συμφωνία με ερευνητές που ανέφεραν ότι η κατάψυξη LD μυών χοίρου επί 30 μήνες προκαλούσε σημαντική μείωση της παραμέτρου  $a^*$  και, επομένως, και της ερυθρότητάς τους (Hansen et al. 2004). Αξίζει ακόμη να αναφερθεί ότι χαμηλότερες τιμές της παραμέτρου  $a^*$  έχουν και προηγουμένως καταγραφεί σε κατεψυγμένα χοιρινά μπιφτεκία κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο μηνών της συντήρησής τους σε κατάψυξη και, μάλιστα, ότι η μείωση της παραμέτρου  $a^*$  τον πρώτο μήνα της κατάψυξης ήταν περίπου 32% (Rojas & Brewer 2007).

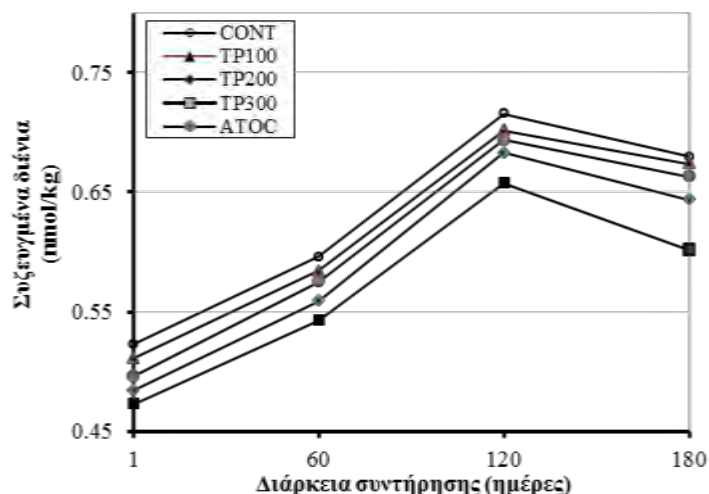
Σε ό,τι αφορά τις τιμές της παραμέτρου  $b^*$ , οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο μηνών της κατάψυξης (Πίνακας Δ1). Έτσι, στις ομάδες CONT και TP100 οι τιμές της παραμέτρου  $b^*$  μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) περίπου κατά 13% και πιο συγκεκριμένα από 14,21 και 13,96 σε 12,35 και 12,20, αντίστοιχα, την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Οι τιμές, όμως, αυτές της παραμέτρου  $b^*$  παρέμειναν αμετάβλητες ( $P > 0,05$ ) την 120<sup>η</sup> και 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές της παραμέτρου  $b^*$  κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Ωστόσο, η μείωση της παραμέτρου  $a^*$  την 60<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε κατάψυξη περιοριζόταν σε περίπου 10%. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με μελέτη που ανέφερε μείωση κατά 12,2% της παραμέτρου  $b^*$  σε χοιρινά μπιφτεκία κατά τον πρώτο μήνα της κατάψυξής τους (Rojas & Brewer 2007).

Σε ό,τι, πάλι, αφορά τις τιμές της παραμέτρου  $L^*$ , οι τιμές αυτές αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες από εκείνες που αρχικά είχαν καταγραφεί (53,79-54,34) σε τιμές της περιοχής 57.02-57.62, κατά την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Μετά την αύξηση αυτή που υπολογίστηκε στο περίπου 6% των αρχικών τιμών, οι τιμές της παραμέτρου  $L^*$  παρέμειναν αμετάβλητες ( $P > 0,05$ ) μέχρι το τέλος της κατάψυξης των 180 ημερών. Υψηλότερες τιμές της παραμέτρου  $L^*$  που συνεπάγονται φωτεινότερο χρώμα, έχουν συσχετιστεί με τη μετουσίωση των πρωτεϊνών (Juncher et al. 2001). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές της παραμέτρου  $L^*$  των ομάδων TP100, TP200, TP300 και ATOC δεν διέφεραν από εκείνες της CONT ομάδας καθόλη τη διάρκεια της κατάψυξης. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα κατεψυγμένα χοιρινά μπιφτεκία αποχρωματίζονταν σταδιακά με την παράταση της διάρκειας κατάψυξης. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με

προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν αύξηση κατά 6,8% των τιμών της παραμέτρου L\* σε χοιρινά μπιφτέκια που διατηρούνταν κατεψυγμένα επί 2 μήνες (Rojas & Brewer 2007).

## 2.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες

Στην Εικόνα Δ1 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες. Την 1<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, οι ομάδες TP200, TP300 και ATOC παρουσίαζαν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων σε σχέση με τις ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δε διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό υποδεικνυε την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς στις δόσεις των 200 και 300 mg GAE/kg καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg.



**Εικόνα Δ1.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC), επί των συγκεντρώσεων των συζευγμένων διενίων σε μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες.

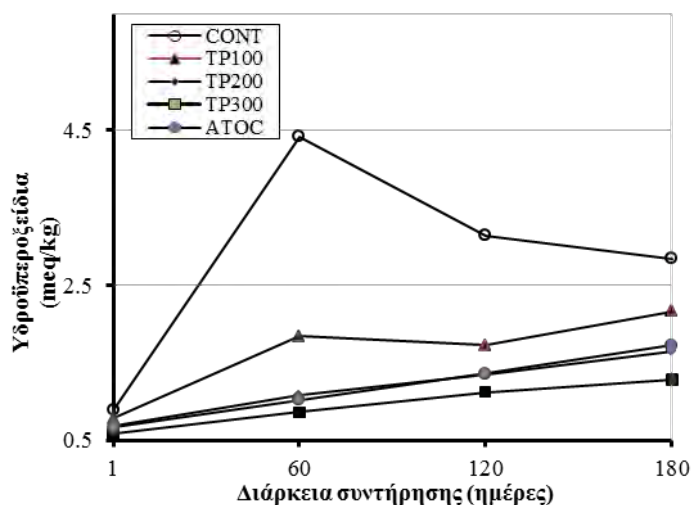
Οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων της 1<sup>η</sup> ημέρας παρουσίασαν σημαντικές αυξήσεις ( $P \leq 0,05$ ) τόσο κατά την 60<sup>η</sup> όσο και κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε κατάψυξη, σε όλες τις ομάδες. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων που καταγράφηκαν την 180<sup>η</sup> ημέρα σε όλες τις ομάδες ήταν μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) σε σχέση με αυτές της 120<sup>ης</sup> ημέρας. Έχοντας υπόψη ότι ο σχηματισμός των συζευγμένων διενίων σχετίζεται με την παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, η μείωση αυτή θα ήταν δυνατόν να ερμηνευθεί με βάση την παραδοχή ότι ο ρυθμός αποσύνθεσης των υδροϋπεροξειδίων κατά

την 180<sup>η</sup> ημέρα ήταν υψηλότερος από το ρυθμό με τον οποίο σχηματίζονταν. Παρόμοιες τάσεις μείωσης έχουν παρατηρηθεί την 150<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης νωπών βοδινών μπιφτεκιών εμπλουτισμένων με εκχύλισμα δενδρολίβανου, χιτοζάνη και α-τοκοφερόλη (Georgantelis et al. 2007).

Την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίασαν τις μεγαλύτερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων με μέσες τιμές 0,680 και 0,674, αντίστοιχα. Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίασαν μικρότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις με μέσες τιμές 0,644 και 0,663, αντίστοιχα, ενώ η ομάδα TP300 εμφάνισε την χαμηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) συγκέντρωση σε σχέση με τις άλλες ομάδες, με μέση τιμή 0.602 και μείωση της συγκέντρωσης των συζευγμένων διενίων κατά περίπου 8%.

### 2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες

Τα υδροϋπεροξειδία είναι πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης τα οποία καθορίζουν την έκταση της οξείδωσης των λιπιδίων στα αρχικά στάδια της οξείδωσης (Teets & Were 2008). Στην Εικόνα Δ2 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των υπεροξειδίων σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν κατεψυγμένα στους -18 °C επί 180 ημέρες.



Εικόνα Δ2. Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της α-τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC), επί των συγκεντρώσεων των υδροϋπεροξειδίων σε κατεψυγμένα μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες.

Στην ομάδα CONT, η μέση συγκέντρωση των υπεροξειδίων αυξήθηκε ( $P \leq 0,05$ ) από 0,89 meq υπεροξειδίων/kg την 1<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης σε 5,46 meq υπεροξειδίων/kg την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Ωστόσο, οι μέσες συγκεντρώσεις των υπεροξειδίων παρουσίασαν, στη συνέχεια, σημαντική πτώση ( $P \leq 0,05$ ) μειούμενες την 120<sup>η</sup> ημέρα σε 3,14 meq υπεροξειδίων/kg και την 180<sup>η</sup> ημέρα σε 2,84 meq υπεροξειδίων/kg.

Η αρχική αύξηση των συγκεντρώσεων των υπεροξειδίων οφειλόταν πιθανότατα στην μεγαλύτερη ταχύτητα σχηματισμού των υπεροξειδίων κατά τη διάρκεια των 60 πρώτων ημερών της κατάψυξης σε σχέση με την ταχύτητα αποδόμησής τους σε δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, η οποία, όμως, ήταν μεγαλύτερη μετά την 60<sup>η</sup> ημέρα και οδήγησε στη μείωση των τιμών των υπεροξειδίων. Παρόμοιες αυξήσεις (2,69-5,45 meq υπεροξειδίων/kg) και στη συνέχεια μειώσεις (5,45-3,2 meq υπεροξειδίων/kg) των συγκεντρώσεων διαπιστώθηκαν από τους Teets & Were (2008) σε αλατισμένο κιμά από στήθος κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της κατάψυξής του. Αυξήσεις των συγκεντρώσεων των υπεροξειδίων από 2,63 σε 5,1 meq υπεροξειδίων/kg μετά από 3 μήνες κατάψυξης νωπού στήθους κοτόπουλου και, στη συνέχεια, μειώσεις σε 2,02 meq υπεροξειδίων/kg μετά από 6 μήνες κατάψυξης αναφέρθηκαν επίσης από τους Soyer et al. (2010). Επιπλέον, αυξήσεις από 0,76 σε 3,17 meq υπεροξειδίων/kg λιπιδίων μετά από 150 ημέρες κατάψυξης και στη συνέχεια μειώσεις σε 2,69 meq υπεροξειδίων/kg μετά από 180 ημέρες κατάψυξης αναφέρθηκαν από τους Georgantelis et al. (2007) σε κατεψυγμένα βοδινά μπιφτέκια. Επίσης, άλλοι ερευνητές (Awad et al. 1968) διαπίστωσαν μείωση των συγκεντρώσεων των υπεροξειδίων σε βοδινό κρέας μετά τη συντήρησή του στους  $-4^{\circ}\text{C}$  επί δύο εβδομάδες. Ο συντομότερος χρόνος εμφάνισης αυτής της μείωσης σε σύγκριση με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης προφανώς σχετίζεται με τις διαφορετικές θερμοκρασίες κατάψυξης και αποθήκευσης. Ωστόσο, αυξήσεις των συγκεντρώσεων των υπεροξειδίων σε λιπαρά ψάρια κατά τη διάρκεια παρατεταμένης κατάψυξης επί 13 μήνες στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-30^{\circ}\text{C}$ , έχουν επίσης αναφερθεί από άλλους συγγραφείς (Baron et al. 2007).

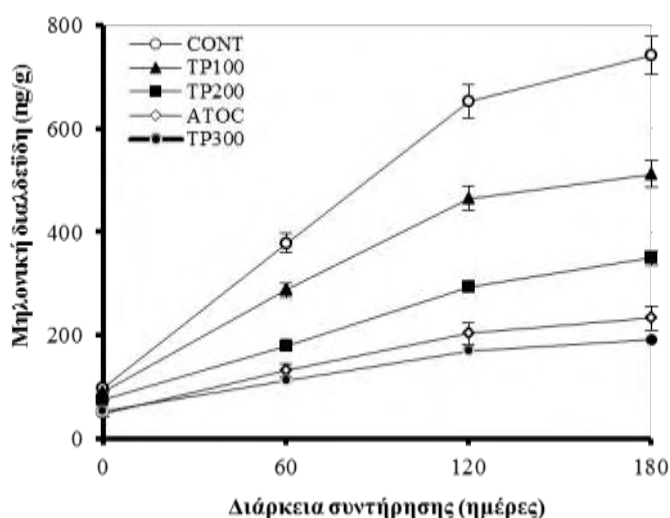
Σε αντίθεση με την ομάδα CONT, οι άλλες ομάδες παρουσίασαν συγκεντρώσεις υπεροξειδίων οι οποίες αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σταθερά κατά την διάρκεια της κατάψυξης, αλλά όλες αυτές οι συγκεντρώσεις ήταν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδος. Παρόμοιες τάσεις έχουν παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια της κατάψυξης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια εμπλουτισμένα με εκχυλίσματα διαφόρων καρυκευμάτων (El-Alim et al. 1999), καθώς και σε βοδινά μπιφτέκια εμπλουτισμένα με διάφορα αντιοξειδωτικά

(Georgantelis et al. 2007). Στην παρούσα μελέτη, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίασαν την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης τις υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις υπεροξειδίων με μέσες τιμές 2,84 και 2,16 meq υπεροξειδίων/kg, αντίστοιχα. Οι ομάδες TP200 και TOC εμφάνισαν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις με μέσους όρους 1,65 και 1,72 meq υπεροξειδίων/kg, αντίστοιχα, ενώ η ομάδα TP300 είχε την μικρότερη ( $P \leq 0,05$ ) συγκέντρωση υπεροξειδίων (1,28 meq υπεροξειδίων/kg) σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες.

#### 2.4. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεϋδης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες

Η κατάψυξη είναι μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους διατήρησης του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, ελαχιστοποιούν αλλά δεν αποκλείουν την οξείδωση των λιπιδίων. Στην παρούσα μελέτη, η εκτίμηση της οξείδωσης των λιπιδίων δεν βασίστηκε στον προσδιορισμό μόνο των συζευγμένων διενίων και των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, τα οποία είναι πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, αλλά και στον προσδιορισμό της μηλονικής διαλδεϋδης, η οποία είναι ένα δευτερογενές προϊόν οξείδωσης των λιπιδίων.

Στην Εικόνα Δ3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων της μηλονικής διαλδεϋδης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες. Η οξείδωση των δειγμάτων επηρεαζόταν σημαντικά από τη διάρκεια της κατάψυξης ( $P < 0,01$ ).



**Εικόνα Δ3.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC), επί των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεϋδης σε κατεψυγμένα μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες.

Σε όλες τις ομάδες, οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) γρήγορα κατά τη διάρκεια της κατάψυξης με την ταχύτερη αύξηση να σημειώνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 120 ημερών της κατάψυξης. Στη συνέχεια, ο ρυθμός αύξησης της μηλονικής διαλδεΰδης επιβραδυνόταν ( $P \leq 0,05$ ) ή σταθεροποιούνταν μέχρι το τέλος της κατάψυξης.

Στην ομάδα CONT, η αύξηση της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεΰδης μετά από 120 ημέρες κατάψυξης ήταν περίπου έξι φορές μεγαλύτερη από εκείνη της 1<sup>ης</sup> ημέρας. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης σημείωσαν τη μεγαλύτερη αύξηση μέχρι τον 3ο μήνα της κατάψυξης νωπών κοτόπουλων (Brannan & Mah 2007) και χοιρινού κρέατος (El-Alim et al. 1999). Είναι, όμως, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που ανέφεραν ότι η μεγαλύτερη αύξηση των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεΰδης σε κρέας κοτόπουλου συνέβη κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα της κατάψυξης (Soyer et al. 2010), ενώ σε χοιρινά μπιφτέκια κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο μηνών της κατάψυξης (Sasse et al. 2009).

Όλες οι άλλες ομάδες παρουσίασαν μειωμένες συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης σε σχέση με την CONT ομάδα. Η ομάδα TP100 παρουσίασε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδας, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της κατάψυξης. Αυτό υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100) επιβράδυνε την οξείδωση των λιπιδίων σε σχέση με την CONT ομάδα, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από τη δόση των 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200). Επίσης η ομάδα TP200 παρουσίασε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΰδης παρόμοιες με εκείνες της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες από εκείνες της ομάδας TP300.

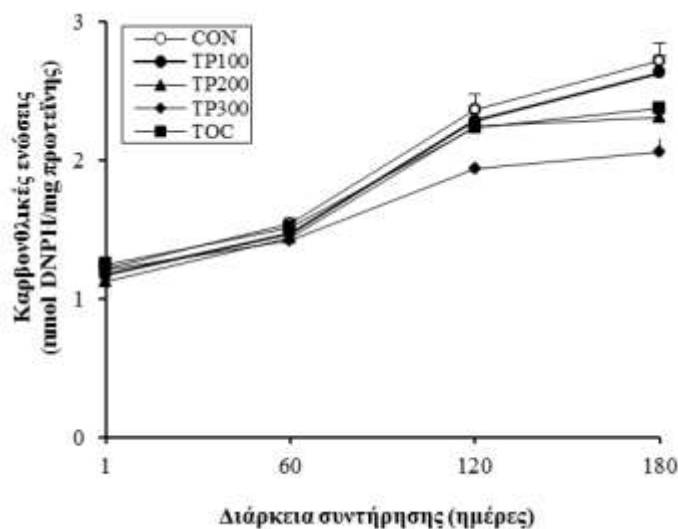
Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων της CONT ομάδος κατά περίπου 31%. Επίσης, στη δόση των 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων κατά περίπου 53 %, ενώ στη δόση των 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300) κατά περίπου 74%. Από αυτά συνάγεται ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg ήταν το πιο αποτελεσματικό μέσο για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και την άμβλυνση των προοξειδωτικών επιπτώσεων των *n-3* λιπαρών οξέων και του NaCl. Τα αποτελέσματα της

παρούσας μελέτης δεν ήταν δυνατόν να συγκριθούν με άλλες ανάλογες μελέτες, αφού εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα δεν αποκάλυψε αναφορές σχετικά με την επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν στην κατάψυξη.

### 2.5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες

Η οξειδωτική αλλοίωση των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτέκια κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε κατάψυξη, απεικονίζεται στην Εικόνα Δ4. Η συγκέντρωση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών αυξανόταν ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες κατά τη διάρκεια της κατάψυξης καταδεικνύοντας ότι οι πρωτεΐνες των μυών στα κατεψυγμένα μπιφτέκια ήταν επιδεκτικές σε οξείδωση.

Στην ομάδα CONT, η αρχική συγκέντρωση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών που ήταν 1,22 nmol/mg πρωτεΐνης, αυξανόταν ( $P \leq 0,05$ ) με το χρόνο κατάψυξης για να φθάσει μετά από 180 ημέρες την τιμή 2,71 nmol/mg η οποία ήταν υπερδιπλάσια της αρχικής συγκέντρωσης. Οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με εκείνες που έχουν αναφερθεί για κατεψυγμένο μπούτι (1,75-2,2 nmol/mg πρωτεΐνης) και στήθος (1,4-1,75 nmol/mg πρωτεΐνης) κοτόπουλου (Soyer et al. 2010) και στήθος (1,10-3,41 nmol/mg πρωτεΐνης) γαλοπούλας (Mercier et al. 1998).



**Εικόνα Δ4.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC), επί των συγκεντρώσεων των καρβονυλίων σε νωπά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες.



Παρόμοιες αυξήσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί κατά τη διάρκεια της συντήρησης ψαριών σε πάγο (Srinivasan & Hultin 1997, Eymard et al. 2009). Επιπλέον, κατεψυγμένα ψάρια στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  παρουσίασαν σημαντική αύξηση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών ήδη μετά από 8 μήνες κατάψυξης, φθάνοντας μετά από 13 μήνες σε συγκεντρώσεις καρβονυλίων  $97,7\text{ nmol/mg}$  πρωτεΐνης, που συνεπάγονται οξείδωση των πρωτεϊνών (Baron et al. 2007).

Η Εικόνα Δ4 δείχνει σαφώς ότι η διάρκεια της κατάψυξης ασκούσε ισχυρή επίδραση στην οξείδωση των πρωτεϊνών των χοιρινών μπιφτεκιών. Κατά τη διάρκεια των 60 πρώτων ημερών της κατάψυξης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ( $P>0,05$ ) μεταξύ όλων των ομάδων, ενώ την 120<sup>η</sup> ημέρα οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στην ομάδα TP300 ήταν χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των άλλων ομάδων που δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους. Την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, η ομάδα TP100 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων παρόμοιες ( $P>0,05$ ) με εκείνες της CONT ομάδος, αλλά υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC οι οποίες δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους. Η ομάδα TP300 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, γεγονός που υποδεικνύει ότι η υψηλότερη αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών γινόταν με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των  $300\text{ mg}$  κρέατος GAE/kg.

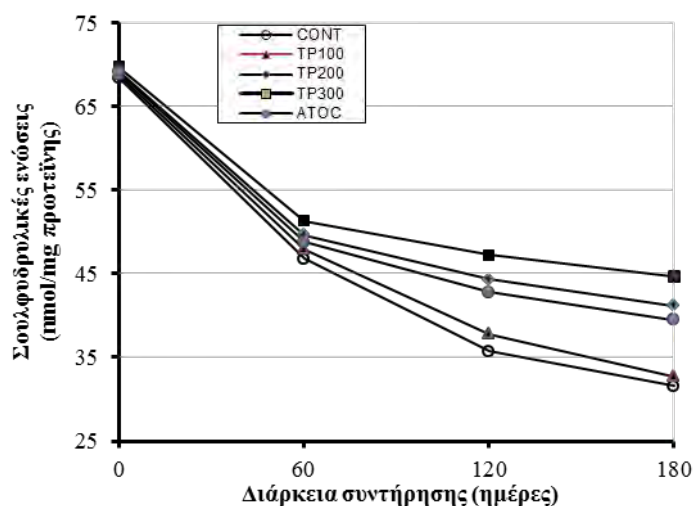
Αν και η επίδραση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών στην ποιότητα των τροφίμων έχει ελάχιστα μελετηθεί, μια πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε τις αρνητικές επιπτώσεις της οξείδωσης των πρωτεϊνών στα τρόφιμα (Lund et al. 2011). Ο σχηματισμός των καρβονυλίων των πρωτεϊνών συνεπάγεται την απώλεια βασικών αμινοξέων, μειώνει την πεπτικότητα των πρωτεϊνών και οδηγεί στην υποβάθμιση ορισμένων χαρακτηριστικών της ποιότητας όπως η υφή (Lund et al. 2011). Ως εκ τούτου, η προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε τρόφιμα με βάση το κρέας θα μπορούσε να ενισχύσει τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητές τους μέσω της αποτελεσματικής αναστολής της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών.

## ***2.6. Επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών σε νωπά χοιρινά μπιφτεκία που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες***

Η επίδραση της κατάψυξης στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών στα νωπά χοιρινά μπιφτεκία ακολούθησε ένα διαφορετικό σχήμα από αυτό που ακολούθησε η

παραγωγή των πρωτεϊνών (Εικόνα Δ5). Η συγκέντρωση των σουλφυδρυλίων σε όλες τις ομάδες μειωνόταν ( $P \leq 0,05$ ) κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, καταδεικνύοντας ότι οι πρωτεΐνες των μυών στα κατεψυγμένα μπιφτέκια ήταν ευαίσθητες στην οξειδωση. Στην αρχή της κατάψυξης, οι συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων σε όλες τις ομάδες ήταν στην περιοχή τιμών 68,4-69,7 nmol/mg πρωτεΐνης και δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, υποδεικνύοντας ότι τα προστιθέμενα αντιοξειδωτικά δεν επηρέαζαν τις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων. Αυτές οι αρχικές συγκεντρώσεις μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) με την διάρκεια της κατάψυξης για να φθάσουν την 60<sup>η</sup> ημέρα τιμές της περιοχής 46,8-51,3 nmol/mg πρωτεΐνης που δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδείκνυαν ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών ήταν ήδη σε εξέλιξη, αλλά η επίδραση των προστιθέμενων αντιοξειδωτικών δεν ήταν σημαντική.

Όταν η κατάψυξη παρατάθηκε από 60 σε 120 ημέρες και, στη συνέχεια, σε 180 ημέρες, οι συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων σε όλες τις ομάδες εξακολούθησαν να μειώνονται ( $P \leq 0,05$ ) με ρυθμούς μείωσης οι οποίοι την 120<sup>η</sup> ημέρα ήταν χαμηλότεροι ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνους της 60<sup>ης</sup> ημέρας, ενώ την 180<sup>η</sup> ημέρα ήταν χαμηλότεροι ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνους της 120<sup>ης</sup> ημέρας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, η μέση συγκέντρωση των σουλφυδρυλίων να μειώνεται ( $P \leq 0,05$ ) από 68,4 σε 46,8 nmol/mg πρωτεΐνης (απώλεια των σουλφυδρυλίων κατά 21,6%) την 60<sup>η</sup> ημέρα, σε 35,7 nmol/mg πρωτεΐνης (απώλεια των σουλφυδρυλίων κατά 47,8%) την 120<sup>η</sup> ημέρα και σε 31,6 nmol/mg πρωτεΐνης (απώλεια των σουλφυδρυλίων κατά 53,8%) την 180<sup>η</sup> ημέρα.



**Εικόνα Δ5.** Επίδραση της προσθήκης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), καθώς και της  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ομάδα ATOC), επί των συγκεντρώσεων των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών σε μπιφτέκια που συντηρούνταν σε κατάψυξη επί 180 ημέρες.

Η αυξανόμενη απώλεια των σουλφουδρυλίων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης υποδεικνύει εντονότερη οξείδωση των πρωτεϊνών με την παράταση της κατάψυξης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες (Soyer et al. 2010) που ανέφεραν απώλειες κατά 65,8% και 33,8% στις συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων σε κρέας κοτόπουλων μετά από 6 μήνες κατάψυξη. Μείωση στις συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων έχει επίσης αναφερθεί σε κρέας κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της κατάψυξής του (Khan 1966), καθώς και σε μεμβράνες μικροσωματίων γαλοπούλας (Batifoulier et al. 2002) και κιμά ψαριών κατά τη διάρκεια της κατάψυξής τους (Eymard et al. 2009).

Την 120<sup>η</sup> και την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους στις συγκεντρώσεις των σουλφουδρυλίων, παρουσίαζαν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις σουλφουδρυλίων από ό,τι οι ομάδες TP200 και ATOC, που επίσης δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, και πολύ χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από ό,τι η ομάδα TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) δεν είχε αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την ομάδα CONT. Αντίθετα, στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα) το εκχύλισμα ήταν πιο αποτελεσματικό επιβραδύνοντας ( $P \leq 0,05$ ) την οξείδωση των πρωτεϊνών, ενώ στη δόση των 300 mg GAE/kg (TP300 ομάδα) προσέφερε την μεγαλύτερη επιβράδυνση.

### ***2.7. Οργανοληπτική ανάλυση κατεψυγμένων χοιρινών μπιφτεκιών όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις χοιροτροφές και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και α-τοκοφερόλης στον κιμά***

Στην παρούσα μελέτη, η ελάχιστη βαθμολογία του 5 που σήμαινε "ούτε θέλω ούτε δεν αρέσω", θεωρήθηκε ότι αντιπροσώπευε ένα αποδεκτό προϊόν με βάση το κρέας, ενώ βαθμολογία κάτω του 5 θεωρήθηκε ότι αντιπροσώπευε ένα μη αποδεκτό προϊόν γιατί σηματοδοτούσε μια μεταβολή από την αδιαφορία προς την αντιπάθεια.

Κατεψυγμένα μπιφτεκία της ομάδος CONT-S (ομάδα με ηλιέλαιο) έλαβαν τα αποδεκτά αποτελέσματα οσμής και γεύσης 7,3 και 6,5, αντίστοιχα (Πίνακας Δ2). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με μελέτες, στις οποίες δεν σημειώθηκε αλλαγή στο άρωμα μαγειρεμένων LD μυών χοίρου που περιείχαν αυξημένα επίπεδα λινελαϊκού οξέος λόγω της προσθήκης στις χοιροτροφές ηλιελαίου (Hartman et al. 1985, West & Myer 1987, Larick et al. 1992). Έχει πιθανολογηθεί ότι, λόγω του υψηλού επιπέδου του λινελαϊκού οξέος στο χοιρινό κρέας, τα προϊόντα οξείδωσής του αναγνωρίζονται ως φυσικά συστατικά της οσμής/γεύσης του χοιρινού κρέατος (Melton 1990).

**Πίνακας Δ2.** Οργανοληπτική ανάλυση κατεψυγμένων χοιρινών μπιφτεκιών όπως επηρεάζεται από την προσθήκη λινελαίου στις χοιροτροφές, καθώς και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και  $\alpha$ -τοκοφερόλης στον κιμά των LD μυών

	Κατεψυγμένα χοιρινά μπιφτεκία	
	Οσμή	Γεύση
CONT-S	7.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
CONT-L	4.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	4.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
TP100	5.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
TP200	6.0 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	5.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
TP300	6.6 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	6.0 $\pm$ 0.1 <sup>ca</sup>
ATOC	5.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	5.3 $\pm$ 0.2 <sup>cb</sup>

\*τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

<sup>a,b</sup>τιμές στην ίδια στήλη με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά για  $P > 0,05$ .

Σε αντίθεση με τα μπιφτεκία της ομάδας CONT-S, τα κατεψυγμένα μπιφτεκία της ομάδας CONT-L (ομάδα με λινέλαιο) έλαβαν τις μη αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης 4,4 και 4,0, αντίστοιχα (Πίνακας Δ2). Οι επιπτώσεις των αυξημένων επιπέδων  $\alpha$ -λινολενικού οξέος στο κρέας λόγω της προσθήκης στις χοιροτροφές λινελαίου, επί του αρώματος του κρέατος είναι αντικρουόμενες. Οι Shackelford et al. (1990) ανέφεραν ότι εκπαιδευμένοι δοκιμαστές γεύσης μπορούσαν να ανιχνεύσουν δυσάρεστα αρώματα σε μαγειρεμένο ζαμπόν που περιείχε 3%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ. Επιπλέον, οι Botsoglou et al. (2012) βρήκαν ότι ο εμπλουτισμός του χοιρινού κρέατος σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ διαμέσου της προσθήκης στη χοιροτροφή λινελαίου προκαλούσε μείωση των χαρακτηριστικών του αρώματος στο μαγειρεμένο κρέας. Ωστόσο, οι Kouba et al. (2003) ανέφεραν ότι εκπαιδευμένοι δοκιμαστές γεύσης μόλις βρήκαν μια τάση μείωσης των χαρακτηριστικών οσμής και γεύσης σε χοιρινό κρέας που περιείχε περίπου 3%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ, ενώ η οργανοληπτική ανάλυση έδειξε ότι μαγειρεμένο λίπος που περιείχε πάνω από 5%  $\alpha$ -λινολενικό οξύ είχε σημαντικά χαμηλότερη οσμή/γεύση χοιρινού και εντονότερο μη φυσιολογικό άρωμα. Αρκετές άλλες μελέτες έχουν καταδείξει, επίσης, την έλλειψη των επιπτώσεων της προσθήκης στις χοιροτροφές λιναρόσπορου, επί της οργανοληπτικής αξιολόγησης του μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος (Ahn et al. 1996, Matthews et al. 2000, Oeckel et al. 1996). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες ανέφεραν ότι η οργανοληπτική βαθμολόγηση παραμέτρων όπως η γεύση και η συνολική αποδοχή σε βρασμένα χοιρινά λουκάνικα δεν επηρεαζόταν από την προσθήκη λινελαίου (Valencia et al. 2008). Σε συμφωνία με την ομάδα CONT-L, τα κατεψυγμένα μπιφτεκία της ομάδας TP100 έλαβαν την αποδεκτή βαθμολογία οσμής 5,0 και τη μη αποδεκτή βαθμολογία γεύσης 4,6, οι οποίες όμως ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT-L ομάδος (Πίνακας Δ2).

Τα οργανοληπτικά αυτά χαρακτηριστικά βελτιώθηκαν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ) στα μπιφτέκια των ομάδων TP200 και ATOC που έλαβαν αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους και ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP100. Παρόλα αυτά, τις υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) βαθμολογίες οσμής και γεύσης έλαβαν τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτες που ανέφεραν ότι κατεψυγμένα χοιρινά μπιφτέκια με προσθήκη εκχυλισμάτων από κουκούτσια σταφυλιών είχαν χαμηλότερες βαθμολογίες οσμής σε σχέση με τους μάρτυρες (Sasse et al. 2009).

## E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Πρώτη φάση πειραματισμών

Από την πρώτη φάση που αφορούσε τη διερεύνηση της δυνατότητας παρασκευής εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η άλεση των φρέσκων φύλλων και η αποθήκευσή τους για 1 ημέρα στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση ( $P \leq 0,05$ ) της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας έναντι των λεπτοκομένων φρέσκων φύλλων. Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν ήταν σημαντική ( $P > 0,05$ ) όταν τα αλεσμένα φρέσκα φύλλα αποθηκεύονταν για 1 ημέρα στους -20 °C και όχι στους 20 °C. Σε περίπτωση που η αποθήκευση των φύλλων στους -20 °C παρατεινόταν από 1 σε 7 ημέρες, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ακέραιων φρέσκων φύλλων μειωνόταν σημαντικά.
- Όταν τα φρέσκα φύλλα υποβάλλονταν, πριν από την άλεσή τους, σε ξήρανση στους 40 °C για 2 ημέρες και στη συνέχεια τα αλεσμένα φύλλα αποθηκεύονταν για 1 ημέρα στους 20 °C, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα παρουσιαζόταν αυξημένη ( $P \leq 0,05$ ). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των φύλλων δεν μεταβαλλόταν ( $P > 0,05$ ) ακόμη και όταν η διάρκεια αποθήκευσής τους στους 20 °C παρατεινόταν σε 7 ή και 30 ημέρες, ή ακόμη και όταν τα φύλλα αυτά αποθηκεύονταν στους -20 °C για 30 ημέρες.
- Η εκχυλιστική ικανότητα πολικών διαλυτών όπως το ακετονιτρίλιο και η ακετόνη, στην παραλαβή φαινολικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς ήταν πολύ μεγαλύτερη από εκείνη λιγότερο πολικών διαλυτών όπως ο διαιθυλαιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας. Εντούτοις, η τοξικότητα και η μικρή, σχετικά, πτητικότητα τους καθιστούσαν απαγορευτική τη χρήση τέτοιων εκχυλισμάτων σε κρέας ή κρεατοσκευάσματα.
- Τα αποτελέσματα από την εξέταση άλλων πολικών διαλυτών κατέδειξαν την υπεροχή των υδατικών διαλυμάτων της αιθανόλης στην παραλαβή των φαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς. Πέρα από τη μεγάλη εκχυλιστική της ικανότητα εξαιτίας του πολικού της χαρακτήρα, η αιθανόλη υπερείχε, επίσης, έναντι των άλλων πολικών διαλυτών και στον βαθμό τοξικότητάς της, ο οποίος είναι, σχετικά, πολύ μικρός.
- Η εκχυλιστική ικανότητα των υδατοαιθανολικών διαλυμάτων δεν μπορούσε να

συσχετιστεί με την περιεκτικότητά τους σε αιθανόλη. Και αυτό γιατί όταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του εκχυλιστικού μέσου αυξανόταν πάνω από το 50%, η εκχυλιστική του ικανότητα αυξανόταν, ενώ όταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη μειωνόταν κάτω από το 50%, η εκχυλιστική ικανότητα, επίσης, αυξανόταν. Η εκχυλιστική ικανότητα υδατοαιθανολικών διαλυμάτων με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 60% ήταν πολύ καλύτερη από διαλύματα με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 30% ή 40%.

- Η βέλτιστη εκχύλιση των πολυφαινόλων επιτυγχανόταν μετά από ανάδευση επί 6 ώρες των φύλλων της ελιάς με υδατοαιθανολικό διάλυμα 60%. Παράταση της διάρκειας εκχύλισης σε 8 ή και 10 ώρες δεν έδειξε βελτίωση ( $P>0,05$ ) της εκχυλιστικής ικανότητας.
- Υγροχρωματογραφική ανάλυση του υδατοαιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς έδειξε αρκετές κύριες χρωματογραφικές κορυφές, οι οποίες επί τη βάση των χρόνων κατακράτησής τους και των UV-Vis φασμάτων, αναγνωρίστηκαν ως σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπαϊνή και βερμπασκοζίτης), φλαβόνες (λουτεολίνη, 7-*O*-γλυκοζίτης απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης λουτεολίνης και 4-*O*-γλυκοζίτης λουτεολίνης), φλαβονόλες (ρουτίνη), και υποκατεστημένες φαινόλες (υδροξυτυροσόλη). Η ελαιοευρωπαϊνή ήταν η κυριότερη ένωση στα φύλλα της ελιάς ακολουθούμενη από τον γλυκοζίτη της λουτεολίνης, τον βερμπασκοζίτη, την λουτεολίνη και την υδροξυτυροσόλη.

### Δεύτερη φάση πειραματισμών

Από τη δεύτερη φάση που αφορούσε τη διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η χορήγηση με τις χοιροτροφές ηλιελαίου ή λινελαίου δεν επηρέασε ( $P>0,05$ ) την σύσταση του επιμήκη ραχιαίου μυός των χοίρων σε πρωτεΐνες, υγρασία και λίπος, καθώς και παραμέτρους της ποιότητας κρέατος όπως το  $pH_{24}$  και την απώλεια οπού (drip loss).
- Η αντικατάσταση του ηλιελαίου της χοιροτροφής από λινέλαιο, οδήγησε σε μείωση ( $P\leq 0,05$ ) της αναλογίας του συνόλου των  $n-6$  λιπαρών οξέων και μία συνακόλουθη αύξηση ( $P\leq 0,05$ ) της αναλογίας του συνόλου των  $n-3$  λιπαρών

οξέων. Η αύξηση της αναλογίας του συνόλου των  $n-3$  λιπαρών οξέων οφειλόταν στην αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) των αναλογιών του  $\alpha$ -λινολενικού οξέος, του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (EPA) και του εικοσιδυοπεντενοϊκού (DPA), αλλά όχι του εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA) στον μυϊκό ιστό του χοίρου. Ως συνέπεια αυτών των αλλαγών, η αναλογία των κορεσμένων λιπαρών οξέων αυξήθηκε ( $P \leq 0,05$ ) και η αναλογία των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων μειώθηκε ( $P \leq 0,05$ ), ενώ η αναλογία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) παρέμεινε αμετάβλητη.

- Η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε συνθήκες ψύξης δεν επηρέασε ( $P > 0,05$ ) τις τιμές pH που ήταν στην περιοχή τιμών 5,82-5,75 καθόλη την περίοδο συντήρησης των 9 ημερών.
- Η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στις δόσεις των 200 ή 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg βελτίωναν ( $P \leq 0,05$ ) την ερυθρότητα (αύξηση τιμών  $a^*$ ) καθώς και την φωτεινότητα (αύξηση τιμών  $L^*$ ) των νωπών μπιφτεκίων σε σχέση με τη δόση των 100 mg GAE/kg και την ομάδα των μαρτύρων. Ωστόσο, η ωχρότητα (τιμές  $b^*$ ) των νωπών χοιρινών μπιφτεκίων ήταν ανεπηρέαστη από την προσθήκη των αντιοξειδωτικών.
- Οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων, πρωτογενών προϊόντων της οξειδωσης των λιπιδίων, στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις πειραματικές ομάδες την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό ψύξη. Ωστόσο, η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στη δόση των 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χαμηλότερων ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεων συζευγμένων διενίων σε σχέση με τη δόση των 100 mg GAE/kg και την ομάδα των μαρτύρων. Η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg παρεμπόδιζε την παραγωγή των συζευγμένων διενίων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων σε ποσοστό περίπου 9%.
- Οι συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων, πρωτογενών προϊόντων της οξειδωσης των λιπιδίων, στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις πειραματικές ομάδες την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε ψύξη. Ωστόσο, η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στις δόσεις των 100, 200 και,



ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg είχαν ως αποτέλεσμα την καταγραφή χαμηλότερων ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεων υδροϋπεροξειδίων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.

- Οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης, δευτερογενούς προϊόντος της οξείδωσης των λιπιδίων, στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις πειραματικές ομάδες την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε ψύξη. Ωστόσο, η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στις δόσεις των 100, 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg είχαν ως αποτέλεσμα την καταγραφή χαμηλότερων ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεων μηλονικής διαλδεύδης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg προκαλούσε τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην οξείδωση των λιπιδίων.
- Η αντιοξειδωτική δράση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης ήταν μάλλον έντονη αφού προκαλούσε μείωση των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεύδης στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια σε ποσοστό περίπου 78% την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους σε ψύξη. Η έντονη αυτή δράση αποδόθηκε στην επιλογή του καταλληλότερου φορέα διάλυσης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Η χρησιμοποίηση ενός πολικού φορέα όπως είναι η αιθανόλη, φαίνεται ότι διευκόλυνε την ενσωμάτωση σημαντικών ποσοτήτων τοκοφερόλης στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ εμπόδιζε σε μεγάλο βαθμό την ενσωμάτωση στις ουδέτερες τριακυλογλυκερόλες, γεγονός που καταδεικνύει την αντιοξειδωτική δράση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πόσο σημαντικός είναι ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών κατανομής των χρησιμοποιούμενων αντιοξειδωτικών μεταξύ των διαφόρων φάσεων των τροφίμων πριν από την επιλογή του καταλληλότερου φορέα διάλυσης των αντιοξειδωτικών.
- Οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις πειραματικές ομάδες κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη. Την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, η ομάδα TP100 παρουσίασε τιμές καρβονυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας CONT, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200. Αυτό υποδείκνυε ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) παρεμπόδιζε την οξείδωση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την ομάδα CONT, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από ό,τι στη δόση των 200

mg GAE/kg (TP200 ομάδα). Η ομάδα TP200 παρουσίασε τιμές καρβονυλίου παρόμοιες ( $P>0,05$ ) με εκείνες της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από ό,τι εκείνες της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών εμφανιζόταν με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στην δόση των 300 mg GAE/kg.

- Οι συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών στα νωπά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν μείωση ( $P\leq 0,05$ ) σε όλες τις πειραματικές ομάδες κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη. Την 9η ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους σε ό,τι αφορά το περιεχόμενό τους σε σουλφιδρύλια, παρουσίαζαν συγκεντρώσεις σουλφιδρυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, οι οποίες επίσης δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σουλφιδρυλίων μεταξύ όλων των ομάδων παρουσιάστηκαν από την ομάδα TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) δεν προστάτευε τις πρωτεΐνες από την οξείδωση, ενώ στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα) ήταν αποτελεσματικότερο και ισοδύναμο προς την  $\alpha$ -τοκοφερόλη. Η μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών με το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς παρουσιαζόταν στη δόση των 300 mg GAE/kg. Τα αποτελέσματα αυτά έδειχναν, επιπλέον, ότι τόσο το είδος του προστιθέμενου αντιοξειδωτικού όσο και η συγκέντρωσή του επηρέαζαν σημαντικά την οξείδωση των πρωτεϊνών.

### Τρίτη φάση πειραματισμών

Από τη τρίτη φάση που αφορούσε τη διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ψημένων χοιρινών μπιφτεκίων που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν στους 4 °C, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια που συντηρούνταν σε συνθήκες ψύξης δεν επηρέασε ( $P>0,05$ ) το pH (6,06-6,19), καθώς και τις απώλειες βάρους κατά το ψήσιμο που κυμαίνονταν από 19,3% έως 20,7%.
- Παρά την προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ή της  $\alpha$ -τοκοφερόλης, η ερυθρότητα (τιμές  $a^*$ ) όλων των ομάδων μειωνόταν ( $P\leq 0,05$ ) σταδιακά με την επιμήκυνση του χρόνου της συντήρησης. Ωστόσο, η προσθήκη των εκχυλισμάτων

φύλλων ελιάς στις δόσεις των 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg, δεν επέτρεπαν τη μείωση της παραμέτρου  $a^*$  στις τιμές που καταγράφονταν με τη δόση των 100 mg GAE/kg. Σε ό,τι αφορά τις παραμέτρους  $L^*$  (φωτεινότητα) και  $b^*$  (ωχρότητα), οι τιμές τους δεν επηρεάζονταν ( $P>0,05$ ) από την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ούτε από την διάρκεια του χρόνου συντήρησης.

- Οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων παρουσίαζαν αύξηση ( $P\leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες την 3η ημέρα της συντήρησης. Την 6<sup>η</sup> ημέρα, παρουσιάστηκε σε όλες τις ομάδες μια τάση μείωσης των συγκεντρώσεων η οποία, όμως, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, σημαντική μείωση ( $P\leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων συζευγμένων διενίων σημειώθηκε σε όλες τις ομάδες την 9η ημέρα της συντήρησης. Την ημέρα αυτή, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίαζαν τις υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων σε σχέση με τις άλλες ομάδες, οι ομάδες TP200 και ATOC εμφάνιζαν χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις, ενώ η ομάδα TP300 παρουσίαζε τις μικρότερες ( $P\leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη αναστολή της οξειδωσης των πρωτεϊνών εμφανιζόταν με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στην δόση των 300 mg GAE/kg.
- Οι συγκεντρώσεις των υδροϋπεροξειδίων στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια αυξάνονταν ( $P\leq 0,05$ ) με την επιμήκυνση του χρόνου της συντήρησης. Ωστόσο, η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στις δόσεις των 100, 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg, καθώς και η προσθήκη τοκοφερόλης στη δόση των 50 mg/kg είχαν ως αποτέλεσμα την καταγραφή χαμηλότερων ( $P\leq 0,05$ ) συγκεντρώσεων υδροϋπεροξειδίων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.
- Η συντήρηση σε ψύξη προκαλούσε σε όλες τις ομάδες αύξηση ( $P\leq 0,05$ ) των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA). Ωστόσο, τα ψητά μπιφτέκια παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεϋδης από ό,τι τα νωπά μπιφτέκια. Η ομάδα TP100 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεϋδης χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας των μαρτύρων, αλλά υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αυτό υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg κρέατος (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P\leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων, αλλά ήταν περισσότερο αποτελεσματικό στη δόση των 200 mg

GAE/kg κρέατος (TP200 ομάδα). Επιπλέον, η ομάδα TP200 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεύδης παρόμοιες ( $P>0,05$ ) με αυτές της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP300, ένα δεδομένο που υποδηλώνει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg προσέφερε την υψηλότερη προστασία έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων. Την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης υπό ψύξη, η προσθήκη του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg κρέατος (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P\leq 0,05$ ) την οξείδωση των λιπιδίων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων κατά περίπου 21%, στη δόση των 200 mg GAE/kg κρέατος (TP200 ομάδα) κατά περίπου 57%, ενώ στη δόση των 300 mg GAE/kg κρέατος (TP300 ομάδα) κατά περίπου 77%.

- Οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στα ψητά χοιρινά μπιφτέκια παρουσίαζαν σταδιακή αύξηση ( $P\leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη. Η προσθήκη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg παρεμπόδιζε την οξείδωση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματική από ό,τι στη δόση των 200 mg GAE/kg η οποία, με τη σειρά της, παρουσίαζε συγκεντρώσεις καρβονυλίων παρόμοιες ( $P>0,05$ ) με εκείνες της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από ό,τι εκείνες της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης των πρωτεϊνών εμφανιζόταν με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στην δόση των 300 mg GAE/kg.
- Οι συγκεντρώσεις των σουλφωδρυλίων εμφανίστηκαν μειωμένες ( $P\leq 0,05$ ) στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, εξαιτίας, προφανώς, της οξείδωσης των πρωτεϊνών που προκλήθηκε από το ψήσιμο και τη συντήρηση. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των ομάδων αυτών, παρά τη μείωσή τους, εξακολουθούσαν να είναι πολύ μεγαλύτερες από εκείνες των ομάδων CONT και TP100 στις οποίες δεν είχε παρατηρηθεί καμιά μείωση ( $P>0,05$ ) την 3<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Οι συγκεντρώσεις των σουλφωδρυλίων συνέχισαν να μειώνονται ( $P\leq 0,05$ ) στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC κατά την 6<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Ο ρυθμός μείωσης, όμως, ήταν χαμηλότερος στην ομάδα ATOC, υποδεικνύοντας μειωμένη οξείδωση των πρωτεϊνών εξαιτίας πιθανώς κάποιας απώλειας της  $\alpha$ -τοκοφερόλης κατά τη διαδικασία του ψησίματος. Την 9<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους, παρουσίαζαν συγκεντρώσεις σουλφωδρυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από

εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, οι οποίες επίσης δεν διέφεραν ( $P>0,05$ ) μεταξύ τους. Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίαζαν, με τη σειρά τους, συγκεντρώσεις σουλφουδρυλίων χαμηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνη της ομάδας TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) δεν είχε προστατευτική δράση ( $P<0,05$ ) στην οξείδωση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την ομάδα CONT, ενώ στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα) επιβράδυνε την οξείδωση των πρωτεϊνών σε βαθμό ανάλογο με αυτόν της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Την μεγαλύτερη επιβράδυνση έναντι της οξείδωσης προσέφερε το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg.

- Τα μπιφτέκια της ομάδος CONT-S (ομάδα με ηλιέλαιο) έλαβαν αποδεκτά αποτελέσματα οσμής και γεύσης, ενώ αυτά της ομάδος CONT-L (ομάδα με λινέλαιο) έλαβαν μη αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης. Σε αντίθεση με τα μπιφτέκια της ομάδας CONT-L, τα μπιφτέκια της ομάδας TP100 έλαβαν την αποδεκτή βαθμολογία οσμής 5,4 και τη μη αποδεκτή βαθμολογία γεύσης 4,9. Τα οργανοληπτικά αυτά χαρακτηριστικά βελτιώθηκαν σημαντικά στα μπιφτέκια των ομάδων TP200 και ATOC που έλαβαν αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $P>0,05$ ) και ήταν υψηλότερες ( $P\leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP100. Παρόλα αυτά, τις υψηλότερες βαθμολογίες οσμής και γεύσης έλαβαν τα μπιφτέκια της ομάδας TP300.

#### **Τέταρτη φάση πειραματισμών**

Από τη τέταρτη φάση που αφορούσε τη διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνών νωπών χοιρινών μπιφτεκιών που ήταν εμπλουτισμένα σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ και συντηρούνταν σε κατάψυξη, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Σε όλες τις ομάδες παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης ( $P\leq 0,05$ ) των παραμέτρων  $a^*$  (ερυθρότητα) και  $b^*$  (ωχρότητα) καθώς και μια τάση αύξησης ( $P\leq 0,05$ ) της παραμέτρου  $L^*$  (φωτεινότητα). Στις ομάδες CONT και TP100, οι τιμές της παραμέτρου  $a^*$  μειώνονταν ( $P\leq 0,05$ ) κατά περίπου 40% την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Ωστόσο, η μείωση αυτή περιοριζόταν ( $P\leq 0,05$ ) κατά περίπου 33% στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC και κατά περίπου 25% στην ομάδα TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδείκνυαν ότι η προσθήκη των εκχυλισμάτων των φύλλων

ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg δεν βελτιώνει την σταθερότητα του ερυθρού χρώματος, ενώ στις δόσεις των 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/kg βελτιώνουν σημαντικά τη σταθερότητα του ερυθρού χρώματος κατά την κατάψυξη. Σε ό,τι αφορά την παράμετρο  $b^*$ , οι τιμές της στις ομάδες CONT και TP100 μειώνονταν ( $P \leq 0,05$ ) κατά περίπου 13% μετά από 60 ημέρες κατάψυξης αλλά παρέμεναν αμετάβλητες ( $P > 0,05$ ) την 120<sup>η</sup> και 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Στις ομάδες TP200, TP300 και ATOC παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές της παραμέτρου  $b^*$  κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, αλλά η μείωσή της την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης περιοριζόταν σε περίπου 10%. Σε ό,τι, πάλι, αφορά τις τιμές της παραμέτρου  $L^*$ , οι τιμές αυτές παρουσιάζονταν αυξημένες ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Μετά την αύξηση αυτή που υπολογίστηκε στο περίπου 6% των αρχικών τιμών, οι τιμές της παραμέτρου  $L^*$  παρέμειναν αμετάβλητες ( $P > 0,05$ ) μέχρι το τέλος της κατάψυξης των 180 ημερών.

- Οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων παρουσίασαν αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) τόσο κατά την 60<sup>η</sup> όσο και κατά την 120<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης σε όλες τις ομάδες. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων που καταγράφηκαν την 180<sup>η</sup> ημέρα σε όλες τις ομάδες ήταν ελαφρά μειωμένες ( $P \leq 0,05$ ) σε σχέση με αυτές της 120<sup>ης</sup> ημέρας. Την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίασαν τις μεγαλύτερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις συζευγμένων διενίων. Οι ομάδες TP200 και ATOC παρουσίασαν μικρότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις, ενώ η ομάδα TP300 εμφάνισε τη χαμηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) συγκέντρωση σε σχέση με τις άλλες ομάδες.
- Οι συγκεντρώσεις των υπεροξειδίων στην CONT ομάδα παρουσίασαν μεγάλη αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, αλλά σταδιακή πτώση ( $P \leq 0,05$ ) την 120<sup>η</sup> και 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης. Αντίθετα, οι άλλες ομάδες παρουσίασαν συγκεντρώσεις υπεροξειδίων οι οποίες, αν και ήταν πολύ χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT ομάδας, αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σταθερά κατά την διάρκεια της κατάψυξης. Έτσι, οι ομάδες CONT και TP100 παρουσίασαν την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης τις υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις υπεροξειδίων, οι ομάδες TP200 και ATOC εμφάνισαν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις, ενώ η ομάδα TP300 τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες.
- Οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεύδης αυξάνονταν ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες, με την ταχύτερη αύξηση να σημειώνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 120

ημερών της κατάψυξης. Στη συνέχεια, ο ρυθμός αύξησης της μηλονικής διαλδεΐδης γινόταν πιο σταθερός ή και επιβραδυνόταν ( $P \leq 0,05$ ) μέχρι το τέλος της κατάψυξης. Η ομάδα TP100 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΐδης χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας των μαρτύρων, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP200, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αυτό υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 100 mg GAE/kg (TP100 ομάδα) επιβράδυνε ( $P \leq 0,05$ ) την οξειδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων, αλλά ήταν περισσότερο αποτελεσματικό στη δόση των 200 mg GAE/kg (TP200 ομάδα). Επιπλέον, η ομάδα TP200 παρουσίαζε συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεΐδης παρόμοιες ( $P > 0,05$ ) με αυτές της ομάδας ATOC, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP300, γεγονός που υποδεικνύει την υπεροχή του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg έναντι των μικρότερων δόσεων και της τοκοφερόλης.

- Οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών παρουσίαζαν σταδιακή αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) σε όλες τις ομάδες κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Την 60<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ) μεταξύ των ομάδων, ενώ την 120<sup>η</sup> ημέρα οι συγκεντρώσεις των καρβονυλίων των πρωτεϊνών στην ομάδα TP300 ήταν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες των άλλων ομάδων που δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, η ομάδα TP100 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων παρόμοιες ( $P > 0,05$ ) με εκείνες της CONT ομάδας, αλλά υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους. Η ομάδα TP300 παρουσίασε συγκεντρώσεις καρβονυλίων χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες των ομάδων TP200 και ATOC, γεγονός που υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg υπερέχει έναντι των μικρότερων δόσεων και της τοκοφερόλης.
- Η συγκέντρωση των σουλφυδρυλίων σε όλες τις ομάδες μειωνόταν ( $P \leq 0,05$ ) κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Η μείωση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια των σουλφυδρυλίων σε ποσοστό 21,6% την 60<sup>η</sup> ημέρα, σε ποσοστό 47,8% την 120<sup>η</sup> ημέρα και σε ποσοστό 53,8% την 180<sup>η</sup> ημέρα. Την 180<sup>η</sup> ημέρα της κατάψυξης, οι ομάδες CONT και TP100, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους στις συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλίων, παρουσίαζαν χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) συγκεντρώσεις σουλφυδρυλίων από ό,τι οι ομάδες TP200 και ATOC, που επίσης δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, και πολύ χαμηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από ό,τι η

ομάδα TP300. Τα αποτελέσματα αυτά υποδείκνυαν ότι το εκχύλισμα των φύλλων ελιάς στη δόση των 300 mg GAE/kg (TP300 ομάδα) υπερείχε έναντι των μικρότερων δόσεων και της τοκοφερόλης.

- Τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της ομάδος CONT-S (ομάδα με ηλιέλαιο) έλαβαν αποδεκτά αποτελέσματα οσμής και γεύσης ενώ τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της ομάδος CONT-L (ομάδα με λινέλαιο) έλαβαν μη αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης. Σε συμφωνία με την ομάδα CONT-L, τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της ομάδας TP100 έλαβαν μη αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης, οι οποίες όμως ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της CONT-L ομάδος. Τα οργανοληπτικά αυτά χαρακτηριστικά βελτιώθηκαν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ) στα μπιφτέκια των ομάδων TP200 και ATOC που έλαβαν αποδεκτές βαθμολογίες οσμής και γεύσης, οι οποίες δεν διέφεραν ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους και ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) από εκείνες της ομάδας TP100. Παρόλα αυτά, τις υψηλότερες ( $P \leq 0,05$ ) βαθμολογίες οσμής και γεύσης έλαβαν τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της ομάδας TP300.



## Z. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η χρήση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική λύση για την αποτελεσματική προστασία κρεατοσκευασμάτων καθώς και άλλων τροφίμων από την οξειδωτική τάγγιση. Επιπλέον, η δυνατότητα χρήσης των εκχυλισμάτων αυτών αντί των συνθετικών αντιοξειδωτικών σε βιομηχανική κλίμακα, αποτελεί μια πρόκληση εξαιτίας της τάσης για ευρύτερη χρήση προσθετικών φυσικής προέλευσης στα τρόφιμα. Μια τέτοια χρήση μπορεί, επίσης, να αποτελέσει διέξοδο για την αξιοποίηση μιας άφθονης και φθηνής πρώτης ύλης για παρασκευή βιολογικά δραστικών ουσιών. Η βιομηχανία επεξεργασίας των καρπών της ελιάς, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς, δημιουργεί μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων φύλλων ελιάς αφού υπολογίζεται ότι τα φύλλα της ελιάς αποτελούν περίπου το 10% του ολικού βάρους των καρπών της ελιάς που προσκομίζονται στα εργοστάσια για επεξεργασία. Ακόμη εκτιμάται ότι από το κλάδεμα και μόνο των ελαιοδένδρων παράγονται ετησίως περίπου 25 κιλά ανά δένδρο υπολειμμάτων που αποτελούνται από φύλλα και μικρά κλώνάρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περιοχή της Μεσογείου καλλιεργούνται περίπου οκτώ εκατομμύρια εκτάρια ελαιοδένδρων που αποτελούν το 98 % της παγκόσμιας παραγωγής.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ανάλογα βιοδραστικά συστατικά με αυτά που βρέθηκαν στα φύλλα της ελιάς αναμένονται να βρεθούν και σε άλλα μέλη της οικογένειας *Oleaceae*, όπως στα φύλλα και τους καρπούς του πολύ διαδεδομένου καλλωπιστικού φυτού λιγούστρο (*Ligustrum japonicum*), η διερεύνηση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και της δυνατότητας χρησιμοποίησης εκχυλισμάτων των φυτών αυτών θα μπορούσε να αποτελεί μία ακόμη ενδιαφέρουσα προσέγγιση. Ωστόσο, προκειμένου να σχεδιαστεί η παραγωγή και διάθεση προϊόντων με βιοδραστικά φυτικά εκχυλίσματα της *O. europaea L.*, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή επιπρόσθετων πειραματικών δοκιμών σχετικά με την βιοδιαθεσιμότητα και την ασφάλή τους χρήση. Ακόμη, η επιτυχημένη χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα με στόχο την προστασία τους από την οξειδωτική τάγγιση προϋποθέτει την καλή γνώση του υποστρώματος και τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών κατανομής των χρησιμοποιούμενων αντιοξειδωτικών μεταξύ των διαφόρων φάσεων των τροφίμων πριν από την επιλογή του κατάλληλου φορέα διαλύτη.

## Η. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν η διερεύνηση της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπιδίων και των πρωτεϊνών χοιρινών μπιφτεκίων εμπλουτισμένων σε  $n-3$  λιπαρά οξέα, μετά από προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς. Η διερεύνηση αυτή ολοκληρώθηκε σε 4 φάσεις. Κατά την 1η φάση, φύλλα από ελαιόδεντρα (*Olea europaea* L.) της ποικιλίας Κορωνέικη υποβλήθηκαν σε μια σειρά δοκιμασιών με στόχο τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών φαινολικών συστατικών τους. Η αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των εκχυλισμάτων στηρίχθηκε στον προσδιορισμό του περιεχομένου τους σε ολικές πολυφαινόλες, ολικά φλαβονοειδή, ολικές φλαβανόλες και  $\alpha$ -τοκοφερόλη, στην υδροχρωματογραφική ανάλυση της σύστασής τους, και στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους τόσο με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας DPPH• όσο και με τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS•+.

Η 2<sup>η</sup> φάση ξεκίνησε με την παρασκευή των χοιρινών μπιφτεκίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως το κύριο πειραματικό υλικό και στην τρίτη και τέταρτη φάση. Για το σκοπό αυτό, 12 θηλυκοί χοίροι κατανεμήθηκαν εξίσου σε δύο μεταχειρίσεις που διέφεραν μόνο στο είδος του φυτικού ελαίου που είχε ενσωματωθεί στη ζωοτροφή. Στη μεταχείριση (S), η τροφή περιείχε 3% ηλιέλαιο, ενώ στη μεταχείριση (L) λινέλαιο σε ίδιο ποσοστό. Στο τέλος της εκτροφής που διήρκεσε 90 ημέρες, τα ζώα σφάχθηκαν, συλλέχθηκαν τα φιλέτα του επιμήκη ραχιαίου μυός και τεμαχίστηκαν σε μηχανή κιμά. Από τον κιμά της μεταχείρισης (L) παρασκευάστηκαν 5 ομάδες μπιφτεκίων, συγκεκριμένα η ομάδα των μαρτύρων (CONT), μια ομάδα με προσθήκη  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε ποσοστό 50 mg/kg (ATOC) και 3 ομάδες με προσθήκη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις δόσεις των 100 mg GAE/kg (ομάδα TP100), των 200 mg GAE/kg (ομάδα TP200) και των 300 mg GAE/kg (ομάδα TP300), αντίστοιχα. Ένα μέρος από τα μπιφτεκία συντηρήθηκε στους 4 °C επί 9 ημέρες, ένα άλλο μέρος ψήθηκε στους 180 °C και τα ψητά μπιφτεκία συντηρήθηκε στους 4 °C επί 9 ημέρες, ενώ ένα τρίτο μέρος συντηρήθηκε στους -18 °C επί 180 ημέρες.

Στα μπιφτεκία εξετάστηκαν διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά και προσδιορίστηκαν, επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των συζευγμένων διενίων, υπεροξειδίων, μηλονικής διαλδεΰδης, καρβονυλίων των πρωτεϊνών και σουλφυδρυλίων των πρωτεϊνών σε όλα τα δείγματα. Επιπλέον, έγινε και οργανοληπτική αξιολόγηση των νωπών και κατεψυγμένων μπιφτεκίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στις

δόσεις των 200 και, ιδιαίτερα, των 300 mg GAE/g κρέατος βελτιώνει τη χρώση των μπιφτεκιών αυξάνοντας την παράμετρο  $a^*$ , επιβράδυνε την οξείδωση των λιπιδίων προκαλώντας μείωση της παραγωγής των πρωτογενών καθώς και των δευτερογενών προϊόντων και επιβράδυνε την οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλώντας μείωση της παραγωγής των καρβονυλίων και επιβράδυνση της μείωσης των σουλφυδρυλίων. Επιπλέον, βελτιώνει αισθητά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως την οσμή και τη γεύση των νωπών και κατεψυγμένων μπιφτεκιών.

**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**FACULTY OF HEALTH SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF VETERINARY SCIENCE**

**Investigation of the oxidative stability of lipids and proteins  
of pork meat following supplementation with olive leaf extracts**

PhD Dissertation

**Evropi N. Botsoglou**  
Food Technologist

The purpose of this dissertation was to investigate the oxidative stability of lipids and proteins of pork patties following supplementation with olive leaf extracts. The investigation was completed in 4 phases. During the first phase, leaves of olive trees (*Olea europaea* L.) of the *Koroneiki* cultivar were submitted to a series of tests in order to optimize the extraction process for recovering of the antioxidant phenolic constituents. The evaluation of the antioxidant potential of the extracts was based on the determination of their content in total polyphenols, total flavonoids, total flavanols and  $\alpha$ -tocopherol, their liquid chromatographic analysis, and the assessment of their antioxidant capacity on the basis of both the DPPH● and ABTS● + tests.

The 2<sup>nd</sup> phase started with the preparation of the *n*-3 fatty acids enriched pork patties, which served as the main experimental substrate in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> phases as well. For this purpose, 12 sows were equally distributed into two treatments differing only in the kind of the vegetable oil supplemented into the diet. In treatment S, the feed contained 3% sunflower oil, while in treatment L, linseed oil at the same level. At the end of the feeding trial that lasted 90 days, the animals were slaughtered, filets from longissimus dorsi (LD) muscle were collected, and ground in a meat grinder. Using minced meat from treatment L, 5 groups of pork patties were prepared, namely a control group (CONT), a group with  $\alpha$ -tocopherol added at 50 mg/kg (ATOC), and 3 groups with olive leaf extracts added at 100 mg gallic acid equivalents (GAE)/kg (group TP100), at 200 mg GAE/kg (group TP200) and at 300 mg GAE/kg (group TP300), respectively.

One part of the prepared patties was stored at 4 °C for 9 days, another part was roasted

at 180 °C and the cooked patties were stored at 4 °C for 9 days, where as a third part was stored at -18 °C for 180 days. All patties were examined for their quality traits, whereas determinations of the concentrations of conjugated dienes, hydroperoxides, malondialdehyde, and protein carbonyls and sulfhydryls, were also carried out. In addition, sensory evaluation of fresh and frozen patties was carried out following cooking.

The results showed that the use of olive leaf extracts at the doses of 200 and, especially, of 300 mg GAE/g meat improved the color of patties by increasing the parameter  $a^*$ , delayed lipid oxidation by reducing the production of primary and secondary oxidation products, and retarded proteins oxidation by reducing the production of carbonyls and inhibiting the reduction of sulphhydryls. Moreover, it considerably improved organoleptic characteristics such as the odor and taste of the fresh and frozen patties.

## I. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη βιβλιογραφία

- Abd El-Alim SSL, Lugasi A, Hovari J & Dworschak E (1999) Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *J Sci Food Agric* 79, 279-285.
- Addis PB & Park SW (1989) Role of lipid oxidation products in atherosclerosis, In: Taylor SL and Scan Lan RA, *Food Toxicology: A perspective on the relative risks*, New York, Marcel Dekker, 297-330.
- Adiercreutz H & Mazur W (1997) Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Me.* 29, 95-120.
- Agarwal A & Sohal RS (1994) Aging and proteolysis of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys* 309, 24-28.
- Ahn DU, Jo C & Olson, DG (2000) Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiated raw pork. *Meat Sci* 54, 209-215.
- Ahn DU, Lutz S & Sim JS (1996) Effects of dietary  $\alpha$ -linolenic acid on the fatty acid composition, storage stability and sensory characteristics of pork loin. *Meat Sci* 43, 291-299.
- Ahn DU, Olson DG, Jo C, Chen X, Wu C & Lee JI (1998) Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production and color in raw pork patties. *Meat Sci* 49, 37-39.
- Ahn J, Grun IU & Fernando LN (2002) Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *J Food Sci* 67, 1364-1369.
- Akagawa K, Sasaki D, Kurota Y & Suyama K (2005) Formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard reaction. *Ann New York Acad Sci* 1043, 129-134.
- Akagawa M, Sasaki D, Ishii Y, Kurota Y, Yotsu-Yamashita M, Uchida K, et al. (2006) New methods for the quantitative determination of major protein carbonyls,  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chem Res Toxicol* 19, 1059-1065.
- Aldini G, Piccoli A, Beretta, G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C & Facino RM (2006)

- Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of Coratina. *Filoterapia* 77, 121-128.
- Al-Jalay B, Blank G, McConnell B & Al-Khayat M (1987) Antioxidant activity of selected spices used in fermented meat sausage. *J Food Prot* 50, 25-2.
- Allothman M, Bhat R & Karim AA (2009) Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem* 115, 785-788.
- Altioek E, Baycin D, Bayracter O & Semra U (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europea* L) by adsorption on silk fibroin. *Sep Purif Technol* 62, 342-348.
- Andrade PB, Pereira DM, Ferreres F & Valentao P (2008) Recent trends in high throughput analysis and antioxidant potential screening for phenolics. *Curr Pharm Anal* 4, 137-150.
- Ansorena D & Astiasaran I (2004) Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat Sci* 67, 237-244.
- Antequera T, Lopez-Bote CJ, Cordoba JJ, Garcia C, Asensio MA, Ventanas J, et al. (1992) Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chem* 45, 105-110.
- Antolovich M, Prenzler P, Robards K & Ryan D (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125, 989-1009.
- AOAC (1984) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International*, 14th ed. AOAC, Virginia, USA.
- Armenteros M, Heinonen M, Ollilainen V, Toldrá F & Estévez M (2009) Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Sci* 83, 104-112.
- Arnao MB, Cano A & Acosta M (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Res.* 31, S89-S96.
- Arts C, Hollman PC & Kromhout D (1999) Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 354, 488.
- Asghar A, Gray JI, Booren AM, Goma EA, Abouzied MM & Miller ER (1991) Effects of supranutritional dietary Vitamin E levels on subcellular deposition of alpha-

- tocopherol in the muscle and on pork quality. *J Sci Food Agric* 57, 31-41.
- Astruc T, Gatellier P, Sante-Lhoutellier V, Marinova P & Labas R (2007) Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *J Agric Food Chem* 14, 9554-9558.
- Aviram M (1996) Interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34, 599-608.
- Awad A, Powrie WD & Fennema O (1968) Chemical deterioration of bovine muscle at -4 °C. *J Food Sci* 33, 227-231.
- Axelsson M, Sjovalld J, Gustafsson BE & Setchell KDR (1982) Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 298, 659-60.
- Balasundram N, Sundram K & Samman S (2006), Phenolic compounds in plants and agricultural by-products, antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chem* 99, 191-203.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G & Montedoro GF (1996) Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds in virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 73, 1589-1593.
- Barbut S (2000) Other poultry preservation techniques, In: Mead GC, *Poultry meat processing and quality*, Cambridge, England, Woodhead Publishing.
- Barbut S, Josephson DB & Maurer AJ (1985) Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *J Food Sci* 50, 1356-1359.
- Barminas JT., James MK & Abubakar UM (1999) Chemical composition of seeds & oil of *Xylopiya aethiopica* grown in Nigeria. *Plant Foods Hum Nutr* 53, 193-198.
- Baron CP & Andersen HJ (2002) Myoglobin-induced lipid oxidation. A review,. *J Agric Food Chem* 50, 3887-3897.
- Baron CP, Berner L, Skibsted LH & Refsgaard HHF (2005) Evaluation of activity of selected antioxidants on proteins in solution and in emulsions. *Free Rad Res* 39, 777-785.
- Baron CP, Hyldig G & Jacobsen C (2009) Does feed composition affect oxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during frozen storage? *J Agric Food Chem* 57, 4185-4194.
- Baron CP, Kjersgaard, IVH, Jessen F & Jacobsen C (2007) Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agric Food Chem* 55,



8118-8125.

- Batifoulier F, Mercier Y, Gatellier P & Renerre M (2002) Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. *Meat Sci* 61, 389-395.
- Bell NI (1996) Kinetics of non-enzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition. *Food Res Internat* 28, 591-597.
- Benamira M, et al (1995) Induction of mutations by replication of MDA-modified M13 DNA in *E. Coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis and types of mutation induced. *Carcinogenesis* 16, 93-99.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A & Del Rio JA (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea L.* leaves. *Food Chem* 68, 457-462.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A & Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12, 1679-1719.
- Benjakul S, Lertittikul W & Bauer F (2005) Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chem.* 93, 189-196.
- Berlett BS & Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Bertram HC, Kristensen M, Østdal H, Baron CP et al. (2007) Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins? *J Agric Food Chem* 55, 2342-2348.
- Better Health Channel (2005) *Biophys Acta* 1703, 93–109.
- Bisignano G, Lagana M, Trombetta D, Arena S, Nostro A, Ucella N, Mazzanti G & Saija A (2001) In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea L.* *FEMS Microbiol Let* 198, 9-13.
- Biswas AK, Keshri C & Bisht GS (2004) Effect of enrobing and antioxidants on quality characteristics of precooked pork patties under chilled and frozen storage conditions. *Meat Sci* 66, 733-741.
- Blekas G, Psomiadou E, Tsimidou M & Boskou D (2002) On the importance of total polar

- phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 104, 340-346.
- Bors W, Michel C & Schikora S (1995) Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse-radiolysis study. *Free Rad Biol Med* 19, 45-52.
- Boskou D (2006a) Sources of natural antioxidant phenols, I: Antioxidant plant phenols. Sources, structure-activity relationship, current trends in analysis and characterization. (Boskou, D, Gerothanassis I, Kefalas P, Eds), Research Signpost, Kerala, India.
- Boskou D (2006b) Characteristics of the olive tree and olive fruit, In : *Olive oil Chemistry and Technology*, (2<sup>nd</sup> edition), Boskou D (Ed), AOCS Press, Champaign Illinois, USA.
- Boskou D, Blekas G & Tsimidou, M (2005) Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curr Top Nutr Res* 3, 125-136.
- Boskou D, Tsimidou M & Blekas G (2006) Polar phenolic compounds, In: *Olive oil Chemistry and Technology* (2<sup>nd</sup> Ed), Boskou D, (Ed), AOCS Press, Champaign Illinois, USA.
- Botía JM, Ortuño A, Benavente-García O, Báidez AG, Frías J, Marcos D & Del Río JA (2001) Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: Their influence on olive oil quality. *J Agric Food Chem* 49, 355-358.
- Botsoglou E, Govaris A, Ambrosiadis I & Fletouris D (2012) Lipid and protein oxidation of  $\alpha$ -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europea* L.) or  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Meat Sci* 92, 525-532.
- Botsoglou E, Govaris A, Christaki E & Botsoglou N (2008) Effect of dietary olive leaves and/or  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chem* 121, 17-22.
- Botsoglou E, Govaris A, Moulas A & Botsoglou N (2010) Oxidative stability and microbial growth of turkey breast fillets during refrigerated storage as influenced by feed supplementation with olive leaves, oregano and/or  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Brit Poult Sci* 51, 760-768.
- Botsoglou N., Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ & Trakatellis AG (1994) A rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring

- lipid peroxidation in animal tissues, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 42, 1931-1937.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Mantis AJ & Trakatellis AG (1994) Derivative spectrophotometric method for the analysis of tyrosine in unhydrolyzed protein, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 41, 1635-1639.
- Botsoglou NA, Yannakopoulos AL, Fletouris DJ, Tserveni-Goussi AS & Psomas IE (1998) Yolk fatty acid composition and cholesterol content in response to level and form of dietary flaxseed. *J Agric Food Chem* 46, 4652-4656.
- Botsoglou NA, Grigoropoulou SH, Botsoglou E & Govaris A (2003) The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci* 65, 1193-1200.
- Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M & Sayadi S (2008) Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem* 108, 253-262.
- Bouaziz M & Sayadi S (2005) Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur J Lipid Sci Technol* 107, 497-504.
- Boudhriou N, Bahloul N, Ben Slimen I & Kechaou N (2009) Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Ind Crops Prod* 29, 412-419.
- Bourquelot E & Vintilesco J (1938) Oleuropein, a new glucoside from *Olea Europaea* L. *J Pharm Chim* 28, 303-314.
- Bradley DG & Min DB (1992) Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit Reviews Food Sci Nutr* 31, 211-236.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME & Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol* 28, 25-30.
- Brannan RG & Mah E (2007) Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxyxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Sci* 77, 540-546.
- Breen PH, Isserles SA, Westley J, Roizen MF & Taitelman UZ (1995) Effect of oxygen and sodium thiosulfate during combined carbon monoxide and cyanide poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 229-234.
- Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ & Garrido A (1999) Phenolic compounds in Spanish

- olive oils. *J Agric Food Chem* 47, 3535-3540.
- Briante R, Febbraio F, Patumi M & Nucci R (2002a) Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europea* leaf extracts. *J Biotechnol* 93, 109-119.
- Briante R, La Cara F, Tonziello MP, Febbraio F & Nucci R (2001) Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic beta-glycosidase. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3198-3203.
- Briante R, Patumi M, Febbraio F & Nucci R (2004) Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europea* L leaf extract biotransformed by hyperthermophilic bglycosidase. *J Biotechnol* 111, 67-77.
- Briante R, Patumi M, Limongelli S, Febbraio F, Vaccaro C, Di Salle A, La Cara F & Nucci R (2002) Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Sci* 162, 791-798.
- Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F & Nucci R (2002) *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 50, 4934-4940.
- Britt C, Gomma EA, Gray JI & Booren AM (1998) Influence of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in ground beef patties. *J Agric Food Chem* 46, 4891-4897.
- Broadhurst RB & Jones WT (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric* 29, 788-794.
- Burton GW & Ignold KU (1984)  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569-573.
- Butterfield DA & Stadtman ER (1997) Protein oxidation processes in aging brain. *Adv Cell Aging Gerontol* 2, 161-191.
- Buyukbalci A & El SN (2008) Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities, and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Hum Nutr* 63, 27-33.
- Cacace JE & Mazza G (2003) Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J Food Sci* 68, 240-248.
- Cadwallader KR (2007) "Wood smoke flavor" in Nollet LML, *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, Iowa, USA, Blackwell Publishing.
- Calvo MM & Garcia ML, Selgas MD (2008) Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Sci* 80, 167-172.
- Camo J, Beltran JA & Roncales P (2008) Extension of the display life of lamb with an

- antioxidant active packaging. *Meat Sci* 80, 1086-1091.
- Cannon JE, Morgan JB, Schmidt G, Tatum JD, Sofos JN, Smith GC, Delmore RJ & Williams SN (1996) Growth and fresh meat quality characteristics of pigs supplemented with vitamin E. *J Anim Sci* 74, 98-105.
- Cao G & Cutler RG (1995) Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4- dinitrophenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys* 320, 106-114.
- Cao G, Sofic En & Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med* 22, 749-760.
- Carbonneau MA, Peuchant E, Sess D, Canioni P & Clerc M (1991) Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem* 1991, 37, 1423-1429.
- Carli, KRM, Huff-Lonergan E, Rowe LJ & Lonergan SM (2006) Effect of oxidation, pH, and ionic strength on calpastatin inhibition of  $\mu$ - and m-calpain. *J Anim Sci* 84, 925-937.
- Carney J & Carney A (1994) Role of protein oxidation in aging and in age-associated neurodegenerative diseases. *Life Sci* 55, 2097-2103.
- Carpenter R, O'Callaghan Y, O'Grady M, Kerry J & O'Brien N (2006) Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant extracts derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *J Med Foods* 9, 187-195.
- Carpenter R, O'Grady MN, O'Callaghan YC, O'Brien NM & Kerry JP (2007) Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Sci* 76, 604-610.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lercker G, Compagnone D & Fernandez-Gutierrez A (2005) Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 53, 8918-8925.
- Caruso D, Colombo R, Patelli R, Giavarini F & Galli G (2000) Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization – mass spectrometry (APCI–MS). *J Agric Food Chem* 48, 1182-1185.
- Cassens RG (1997) Residual nitrite in cured meat. *Food Technol* 51, 53-55.
- Cayuella JA, Rada M, Rios J, Albi T & Guinda A (2006) Changes in phenolic composition

- induced by pseudomonas savastanoi pv savastanoi infection in olive tree: Presence of large amounts of verbascoside in nodules of tuberculosis disease. *J Agric Food Chem* 54, 5363-5368.
- Ceccon L, Saccu D, Procid, G & Cardinali S (2001) Liquid chromatographic determination of simple phenolic compounds in waste waters from olive oil production plants. *J AOAC Int* 84, 1739-1744.
- Chan HWS (1987) *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Academic Press, London.
- Chan JTY, Omana DA & Betti M (2011). Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat. *Food Chem* 127, 109-117.
- Chan WKM, Faustman C, Yin M & Decker EA (1997) Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anion. *Meat Sci* 46, 181-190.
- Channon H & Trout G (2002) Effect of tocopherol concentration on rancidity development during frozen storage of a cured and an uncured processed pork product. *Meat Sci* 62, 9-17.
- Chatterjee S, Niaz Z, Gautam S, Adhikari S, Variyar PS & Sharma A (2007) Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L) and fresh nutmeg pomace (*Myristica fragrans*). *Food Chem* 101, 515-523.
- Cheah P & Ledward D (1995) High-pressure effects on lipid oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 72, 1059-1063.
- Cheah P & Ledward D (1997) Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *J Food Sci* 62, 1135-1138.
- Chen CC, Pearson AM, Gray JI, Fooladi MH & Ku P (1984). Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. *J Food Sci* 49, 581-584.
- Cheng J & Ockerman HW (2003) Effect of phosphate with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef. *Meat Sci* 65, 1353-1359.
- Cheng JH, Wang ST & Ockerman HW (2007) Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Sci* 75, 71-77.
- Chevion M, Berenshtein E & Stadtman ER (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Rad Res* 33, S99-S108.
- Chiavaro E, Rinaldi M, Vittadini E & Barbanti D (2008) Cooking of pork Longissimus dorsi

- at different temperature and relative humidity values: Effects on selected physico-chemical properties. *J Food Eng* 93, 158-165.
- Chiou A, Salta FN, Kalogeropoulos N, Mylona A, Ntalla I & Andrikopoulos NK (2007) Retention and Distribution of Polyphenols after Pan-Frying of French Fries in Oils Enriched with Olive Leaf Extract. *J Food Sci* 72, S574-S584.
- Chipault JR, Mizuno GR & Lundberg W (1956) The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol* 10, 209–211.
- Choe J-H, Jang A, Lee E.-S, Choi J-S, Choi Y-S, Han D-J, Kim, H-Y, Lee M-A, Shim S-Y & Kim C-J (2011) Oxidative and color stability of cooked ground pork containing lotus leaf (*Nelumbonucifera*) and barley leaf (*Hordeum vulgare*) powder during refrigerated storage. *Meat Sci* 87, 12-18.
- Choi Y-S, Choi J-H, Han D-J, Kim H-Y, Lee M-A, Kim H-W, Jeong J-Y & Kim C-J (2009) Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fibre. *Meat Sci* 82, 266-271.
- Chouliara E, Karatapanis A, Savvaidis IN & Kontominas MG (2007) Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiol* 607-617.
- Chu YF, Sun J, Wu X & Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* 50, 6910-6916.
- Clark, RA, Volpp BD, Leidal KG & Nauseef WM (1990) Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 85, 714-721.
- Clifford, MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 79, 362-372.
- Climent I, Tsai L & Levine RL (1989). Derivatization of gamma-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal Biochem* 182, 226-232.
- Comporti M (1993) Lipid peroxidation, an overview. In: Poli G, Albano E, Dianzani U, eds. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Berlin: Birkhauser Verlag, pp 64-79.
- Connor WE (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71(suppl), 171S-175S.
- Coppen PP (1989) The use of antioxidants In : *Rancidity in foods* (Allen J.C. and Hamilton R.J., Eds), Elsevier Applied Science, London, pp 83-104.

- Cordis GA, Nilanjana Maulik N, Bagchi D, Engelman RM & Das DK (1993) Estimation of the extent ischemic and reperfused metabolic products with liquid chromatography of lipid peroxidation in the heart by monitoring lipid the aid of high-performance. *J Chromatogr* 632, 97-103.
- Cort WM (1974) Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J Amer Oil Chem Soc* 51, 321-325.
- Cortinas L, Barroeta A, Villaverde C, Galobart J, Guardiola F & Baucels MD (2005) Influence of the dietary polyunsaturated level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poult Sci* 84, 48-55.
- Criqui MH & Ringel BL (1994) Does diet or alcohol explain the French paradox. *Lancet* 344, 1719-23.
- Dahle L K, Hill EG & Holman RT (1962) The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 98, 253-261.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A & Colombo R (2003) Protein carbonyls groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329, 23-38.
- Daneshvar B, Frandsen H, Autrup H & Dragsted LO (1997).  $\gamma$ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers* 2, 117-123.
- Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C & Remesy C (2001) Binding of flavonoids to plasma proteins, *Methods Enzymol* 335, 319-333.
- Davalos A, Gomez-Cordoves C & Bartolome B (2004) Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem* 52, 48-54.
- Davies KJA (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I: General aspects. *J Biolog Chem* 262, 9895-9901.
- Davies KJA, Delsignore ME & Lin SW (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II: Modification of amino acids. *J Biolog Chem* 262, 9902-9907.
- Davies MJ & Dean RT (2003) *Radical-mediated Protein Oxidation*, Oxford Science Publications, Oxford.
- Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703, 93-109.
- De la Puerta R et al (2000) Effect of minor components of virgin olive oil on topical anti-



- inflammatory assays. *Z Naturforsch* 55, 814-819.
- De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V & Hoult JRS (1999) Inhibition of lruocyte 5-lipoxygenase by phenols from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 57, 445-449.
- De Laurentis N, Stefanizzi L, Milillo M-A & Tantillo G (1998) Flavonoids from leaves of *Olea europaea* L. cultivars. *Annal Pharm Franc* 56, 268-273.
- De Leonardis AA, Alfano G, Macciola V & Ranalli G (2008) Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europea* L) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur Food Res Techno.* 226, 653-659.
- De Lucas A, Martinez de la Ossa E, Rincón J, Blanco MA & Gracia I (2002) Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *J Supercrit Fluids* 22, 221-228.
- De Nino A, Lombardo N, Perri E, Procopio A, Raffaelli A & Sindona G (1997) Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 32, 533-541.
- Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y & Niki E (1991) Free radical damage to proteins: The influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target protein. *Free Rad Biol Med* 11, 161-168.
- Decker E, Faustman C & Lopez-Bote C (2000) Antioxidants in muscle foods. nutritional strategies to improve quality. New York, NY: Wiley and Sons, Inc.
- Decker EA & Hultin HO (1990a) Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *J Food Sci* 55, 951-953.
- Decker EA, Warner K, Richards MP & Shahidi F (2005) Measuring antioxidant effectiveness in food. *J Agric Food Chem* 53, 4303-4310.
- Decker EA, Xiong YL, Clavert JT, Crum AD & Blanchard SP (1993) Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem* 41, 186-189.
- Del Río JA, Báideza AG, Botía JM & Ortuño A (2003) Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem* 83, 75-78.
- Delgado-Pertñez M, Chesson A, Gordon JP, Garrido A & Gómez Cabrera A 1998. Effect of different drying systems for the conservation of olive leaves on their nutritive value for ruminants. *Ann Zootech* 47, 141-150.
- Delgado-Pertinez M, Gomez-Cabrera A & Garrido A (2000) Predicting the nutritive value

- of the olive leaf (*Olea europea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Anim Feed Sci Technol* 87, 187-201
- Ding Z, Kuhr S & Engelhardt UH (1992) Influence of catechins and the aflavins on the astringent taste of black tea brews. *Z Lebensm Unters Forsch* 195, 108-11.
- Dirinck P, Winne AD, Casyteels M & Frigg M (1996) Studies on vitamin E and Meat quality. 1. Effect of feeding high vitamin E levels on time-related pork quality. *J Agric Food Chem* 44, 65-68.
- Djorđejević D, McClements DJ & Decker EA (2004) Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential  $\omega$ -3 fatty acid delivery systems (part B). *J Food Sci* 69, 356-362.
- Dobarganes MC & Velasco J (2002) Analysis of lipid hydroperoxides. *Eur J Lipid Sci Technol* 104, 420-428.
- Dolz R & Heidemann E (1989) Reactivity of the allysine aldehyde group. *Connect Tissue Res* 18, 255-268.
- Donelli JK & Robinson DS (1995). Free radicals in foods. *Free Rad Res* 22, 147-176.
- Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S & Hadley M (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad Biol Med* 15, 353-363.
- Du M, Hur SJ & Ahn DU (2002) Raw-meat packaging and storage affect the color and odor of irradiated broiler breast fillets after cooking. *Meat Sci* 61, 49-54.
- Duong DQ, Crandall PG, Pohlman FW, O'Bryan CA, Balentine CW & Castillo A (2008) Improving ground beef safety and stabilizing color during irradiation using antioxidants, reductants or TSP. *Meat Sci* 78, 359-368.
- El-Alim SSLA, Lugas IA, Hovari J & Dworschka I (1999) Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *J Sci Food Agric* 79, 277-285.
- Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Enser M, Richardson RI, Wood JD, Gill BP & Sheard PR (2000) Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Sci* 55, 201-212.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 11, 81-128.

- Estevez M & Cava R (2004) Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pate. *Meat Sci* 68, 551-558.
- Estevez M & Heinonen M (2010) Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron, and myoglobin. *J Agric Food Chem* 58, 4448–4455.
- Estevez M, Kylli P, Puolanne E, Kivikari R & Heinonen M (2008a) Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 56, 10933-10940.
- Estevez M, Kylli P, Puolanne E, Kivikari R & Heinonen M (2008b). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Sci* 80, 1290-1296.
- Estevez M, Morcuende D & Cava R (2003) Oxidative and colour changes in meat from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight and from industrial pig during refrigerated storage. *Meat Sci* 65, 1139-1146.
- Estévez M, Morcuende D & Ventanas S. (2008b) Determination of oxidation. In L.M. L. Nollet, and F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meat and poultry analysis* (pp. 141–162). Boca Raton FL, USA: CRC Press.
- Estevez M, Ollilainen V & Heinonen M (2009). Analysis of protein oxidation markers- $\alpha$ -Amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes-In food proteins by using LC-ESI-multi-stage tandem MS. *J Agric Food Chem* 57, 3901-3910.
- Estévez M, Ventanas S & Cava R (2005) Protein oxidation in Frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on color and texture deterioration. *J Food Sci* 70, 427–432.
- Estévez M, Ventanas S & Heinonen M (2011) Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls –  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – and leucine and isoleucine. *Food Chem* 128, 1051-1057.
- Estévez M (2011) Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci* 89, 259-279.
- Estevez M & Cava R (2006) Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Sci* 72, 348-355.
- Evenepoel P, Claus D, Geypens B, Maes B, Hiele M, Rutgeerts P, et al. (1998) Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein related to gastric

- acid suppression therapy. *Aliment Pharmacol Therap* 12, 10-11.
- Evranuz OE (1993) The effects of temperature and moisture content on lipid peroxidation during storage of unblanched salted roasted peanuts: shelf life studies of unblanched salted roasted peanuts. *Inter J Food Sci Technol* 28, 193-199.
- Eymard E, Baron CP & Jacobsen C (2009) Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem* 114, 57–65.
- Eyre D (1984) Crosslinking in collagen and elastin. *Ann Reviews Biochem* 53, 717–748.
- Fagan JM, Slecicka BG & Sohar I (1999) Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Inter J Biochem Cell Biol* 31, 751-757.
- Farag RS, Mahmoud EA & Basuny AM (2007) Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *Internat J Food Sci Technol* 42, 107-115.
- Faustman C & Cassens RG (1990) The biochemical basis for discoloration in fresh meat: A review. *J Muscle Foods* 1, 217-243.
- Faustman C, Cassens .G, Schaefer DM, Buege DR, Williams SN & Scheller KK (1989) Improvement of lipid and colour stability in holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E. *J Food Sci* 54, 858-863.
- Feeney RE, Blankenhorn G & Dixon, BF (1975) Carbonyl-amine reactions in protein chemistry. *Adv Protein Chem* 29, 135-203.
- Feggeros K, Zervas G, Apsokardos F, Vastardis J & Apostolaki E (1995) Nutritive evaluation of ammonia treated olive leaves for lactating sheep. *Small Rum Res* 17, 9-15.
- Fenton HJH (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* 65, 899-909.
- Fernandez–Escobar R, Moreno R & Garcia–Creus M (1999) Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate – bearing cycle. *Sient Horticult* 82, 25-45.
- Fernandez-Gines JM, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E & Perez-Alvarez JA (2005) Meat products as functional foods: A review. *J Food Sci* 70, R37-R43.
- Fernandez-Gines JM, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E, Sendra E & Perez-Alvarez JA (2003) Effects of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. *J Food Sci* 68, 710-715.
- Fernandez-Lopez J, Fernandez-Gines JM, Aleson-Carbonell L, Sendra E, Sayas-Barbera E

- & Perez-Alvarez JA (2004) Application of functional citrus by products to meat products. *Trends Food Sci Technol* 15, 176-185.
- Fernandez-Lopez J, Sevilla L, Sayas-Barbera, ME, Navarro C, Marin F & Perez-Alvarez JA (2003) Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in cooked pork meat. *J Food Sci* 68, 660-664.
- Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, Bastos ML & Pereira JA (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europea* L leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem* 103, 188-195.
- Ficarra P, Ficarra R, De Pasquale A, Monforte MT & Calabrò ML (1991) HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Pharmaco* 46, 803– 815.
- Fista GA, Bloukas JG & Siomos AS (2004) Effect of leek and onion on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Sci* 68, 163-172.
- Fleming HP, Walter WM & Etchells JL (1973) Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl Microbiol* 26, 773-776.
- Foote CS, Shook FC & Abakerli RB (1985) Characterisation of singlet oxygen. In: Parker L, Glazer AN, eds. *Methods in Enzymology*, Vol. 105:36-47. New York: Academic Press.
- Formanek Z, Kerry JP, Higgins FM, Buckley DJ, Morrissey PA & Farkas J (2001) Addition of synthetic and natural antioxidants to  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplemented beef patties: Effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Sci* 58, 337-341.
- Fox JB (1994) The pigments of meat. In Price JF & Schweigert BS, Eds, *The Science of Meat and Meat Products*, 2nd ed, Westport, Food and Nutrition Press, pp 175-199.
- Frankel EN & Meyer AS (2000) The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants – review. *J Sci Food Agric* 80, 1925-1941.
- Frankel EN & Neff WE (1983) Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 754, 264-270.
- Frankel EN (1998) Antioxidants, In: *Lipid oxidation*, Frankel EN (Ed), The Oily Press, Dundee, Scotland, pp 129-139.
- Frankel EN (2007) Antioxidants in food and biology, facts and fiction, Frankel EN (Ed),

The Oily Press, England.

- Frankel EN, Waterhouse AL & Teissedre PL (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipo-proteins. *J Agric Food Chem* 43, 890-894.
- Frederiksen AM, Lund MN, Andersen ML & Skibsted LH (2008) Oxidation of porcine myosin by hypervalent myoglobin: The role of thiol groups. *J Agric Food Chem* 56, 3297-3304.
- Freeman BA & Crapo JD (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256, 10986–10992.
- Freise K, Brewer S & Novakofski J (2005) Duplication of the pale, soft, and exudative condition starting with normal postmortem pork. *J Anim Sci* 83, 2843-2852.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 64, 97-112.
- Galey JB (1997) Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv Pharmacol* 38, 167-203.
- Galvin K, Morrissey PA & Buckley DJ (1998) Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *Meat Sci* 48, 1-9.
- Gandemer G (1998) Lipid and meat quality – lipolysis–oxidation and flavour. In *Proceeding of the 45th International Conference of Meat Science and Technology, Barcelona, Spain*, pp 106-119.
- Ganhao R, Morcuende D & Estevez M (2010) Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruitextracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sci* 85, 402-409.
- Garcia OB, Castillo, J, Lorente J, Ortuno A & Del Rio JA (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem* 68, 457-462.
- Gardner HW (1979) Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J Agric Food Chem* 27, 220-229.
- Gardner HW (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad Biol Med* 7, 65-86.
- Garrison WM (1987) Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev* 87, 381–398.
- Gatellier P, Kondjoyan A, Portanguen S & Santi-Lhoutellier V (2010) Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on

- nutritional quality. *Meat Sci* 85, 645-650.
- Gatellier P, Mercier Y, Rock E & Renerre M (2000). Influence of dietary fat and vitamin E supplementation on free radical production and on lipid and protein oxidation in turkey muscle extracts. *J Agric Food Chem* 48, 1427-1433.
- Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, Blekas G & Georgakis SA (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Sci.* 76, 172-181.
- Ghisalberti EL (1998) Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine* 5, 147-163
- Giao MS, Gonzalez-Sanjose ML, Rivero-Perez MD, Pereira CI, Pintado ME & Malcata FX (2007) Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *J Sci Food Agric* 87, 2638-2647.
- Gil M, Delday MI, Gisper M, Furnols MF, Maltin CM, Plastow GS, et al. (2008) Relationships between biochemical characteristics and meat quality of longissimus thoracis and semimembranosus muscle in five porcine lines. *Meat Sci* 80, 927-933.
- Gómez Cabrera A, Garrido A, Guerrero JE & Ortiz V (1992) Nutritive value of the olive leaf: effects of cultivar, season of harvesting and system of drying. *J Agric Sci* 119, 205-210.
- Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcroft R, et al. (2008) Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol* 104, 1372-1382.
- Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ Utrilla MP, Jimenez J & Osuna I (1992) Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med* 58, 513-515.
- Gordon MH (1990) The mechanism of antioxidant action in vitro, In: *Food Antioxidants*, Hudson BJJ, Ed, Elsevier Applied Science, London, pp 1-18.
- Gordon MH, Paiva-Martins F & Almeida M (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem* 49, 2480-2485.
- Goulas V, Exarchou V, Troganis NA, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E & Gerothanassis IP (2009) Phytochemicals in olive leaves extracts and antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol Nutr Food Res* 53, 600-608.
- Goupy P, Hugues M, Boivin P & Amiot MJ (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J*

- Sci Food Agric 79, 1625-1634.
- Govaris A, Botsoglou E, Moulas A & Botsoglou N (2010) Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. S Afr J Anim Sci. 40, 145-155.
- Gray J, MacDonald B, Pearson A & Morton I (1981) Role of nitrite in cured meat flavor, A review. J Food Protect 44, 302-312.
- Gray J.I (1978) Measurement of lipid oxidation: A review. J Am Oil Chem Soc 55, 539-546.
- Gray JI & Pearson AM (1987) Rancidity and warmed over flavour. Adv Meat Res 3, 221-229.
- Gray JI, Goma EA & Buckley DJ (1996) Oxidative quality and shelf life of meats. Meat Sci 43, S111-S123.
- Gray JI & Weiss GM (1988) *Warmed-over flavor in meat*, Chicago, National Live Stock and Meat Board, USA
- Grosch W (1987) Reactions of hydroperoxides-products of low molecular weight, In, Autoxidation of Unsaturated Lipids, Chan HWS, Ed, Academic Press, London, pp 51-93.
- Grune T, Jung T, Merker K & Davies KJA (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregation, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging and disease. Internat J Biochem Cell Biol 36, 2519-2530.
- Guarrera PM (2005) Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). Filoterapia 76, 1-25.
- Guinda Á, Albi T, Pérez-Camino MAC & Lanzón A (2004) Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). Eur J Lipid Sci Technol 106, 22-26.
- Gutteridge JMC (1995) Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clin Chem 41, 1819-1828.
- Gutteridge JMC (1998) Lipid peroxidation some problems and concepts. In: Halliwell B, ed. Oxygen radicals and tissue injury. Bethesda, MD: FASEB, pp 9-19.
- Gutteridge MCJ & Halliwell B (1996) Metals and oxygen respiration, oxidation, and oxygen toxicity, In: Antioxidants in Nutrition, Health and Disease, Gutteridge MCJ and Halliwell B, Eds, Oxford University Press, New York, pp 24-39.
- Haak L, Raes K & De Smet S (2009). Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. J Sci Food Agric 89, 1360-1365.



- Haak L, Raes K, Smet K, Claeys E, Paelinck H & De Smet S (2006) Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Sci* 74, 476-486.
- Haak L, Raes K, Van Dyck S & De Smet S (2008) Effect of dietary rosemary and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Sci* 78, 239-247.
- Haila A, Hopia A & Heinonen M (2000) Effects of beta-carotene and retinol on the formation of methyl linoleate hydroperoxides. *Eur J Lipid Sci Technol* 102, 31-36
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metals ions in human diseases. *Methods Enzymol* 186.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell B (1984) *Chloroplast metabolism: The structure and function of chloroplasts in green leaf cells*. Oxford: Oxford Univ Press.
- Halliwell B (1993) Oxidative DNA damage: meaning and measurement, In: *DNA and free radicals*, Halliwell B, Aruoma OI, Eds, Ellis Horwood, New York, pp 67 –79.
- Halliwell B (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 443, 37-52.
- Hanasaki Y, Ogawa S & Fukui S (1994) The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 16, 845-850.
- Hansen E, Juncher D, Henckel P, Karlsson A, Bertelsen G. & Skibsted LH (2004) Oxidative stability of chilled pork chops following long term freeze storage. *Meat Sci* 68, 479-484.
- Hansen E, Lauridsen L, Skibsted L, Moawad R & Andersen M (2004) Oxidative stability of frozen pork patties: effect of fluctuating temperature on lipid oxidation. *Meat Sci* 68, 185-191.
- Hara S & Totani Y (1988) A highly sensitive method for the micro-determination of lipid hydroperoxides by potentiometry. *J Am Oil Chem Soc* 65, 1948-1950.
- Harbone JB & Baxter H (1993) *Phytochemistry dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor and francis, Washington DC, USA, pp 453-454.
- Harbone JB & Williams CA (2000). *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 55, 481-504.

- Harborne JB & Green PS (1980) A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the Oleaceae. *Bot J Linnean Soc* 81, 155-167.
- Harborne JB (1989) Plant phenolics. In: *Methods in plant biochemistry*. Dey, P. M. Harborne, J. B. (Eds), Academic Press, , London, UK, pp 1-27.
- Harel S & Kanner J (1985) Muscle membranal lipid peroxidation initiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated metmyoglobin. *J Agric Food Chem* 33, 1188-1192.
- Hartman AD, Costello WJ, Libal GW & Walhstrom RC (1985) Effect of sunflower seeds on performance, carcass quality, fatty acids and acceptability of pork. *J Anim Sci* 60, 212-219.
- Hassaballa AZ, Mohamed GF, Ibrahim HM & Abdelmageed MA (2009) Frozen cooked catfish burger: Effect of different cooking methods and storage on its quality. *Global Vet* 3, 216-219.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96, 67-202.
- Hayes JE, Allen P, Brunton N, O'Grady MN & Kerry JP (2011) Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem* 126, 948-955.
- Hayes JE, Stepanyan V, Allen P, O'Grady MN, O'Brien NM & Kerry JP (2009) The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Sci* 83, 201-208.
- Hayes JE, Stepanyan V, Allen P, O'Grady MN & Kerry JP (2010) Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Sci* 84, 613-620.
- Heim KE, Tagliaferro AR & Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572-584.
- Heimler D, Cimato A, Alessandri S, Sani G & Pieroni A (1996) Seasonal trend of flavonoids in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Agricult Mediterr* 126, 205-209.
- Heimler D, Pieroni A, Tattini M & Cimato A (1992) Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europaea* L. leaves. *Chromatographia* 33, 369-373.
- Hernandez-Hernandez E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME & Guerrero Legarreta N

- (2009) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci* 81, 410-417.
- Hertog MGL, Hollman PCH & Van de Putte B (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. *J Agric Food Chem* 41. 1242-1246.
- Hertog MGL, Hollman PCHn & Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and nine fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40, 2379-83.
- Hettiarachchy NS, Glenn KC, Gnanasambandam R & Johnson MG (1996) Natural antioxidants extract from fenugreek for ground beef patties. *J Food Sci* 61, 516-519.
- Higgins FM, Kerry JP, Buckley DJ & Morrissey PA (1998) Dietary supplementation versus direct postmortem addition of atocopherol on lipid and colour stability in cooked turkey breast patties. *Food Res Internat* 31, 205-209.
- Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW & Pardini RS (1986) Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: structure-activity study. *Biochem Pharmacol* 35, 2345-2357.
- Hofius D & Sonnewald U (2003) Vitamin E biosynthesis: Biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci* 8, 6-9.
- Hollman PCH, Van Trijp J, Buysman M, Van der Gaag MS, Mengelers M, De Vries J & Katan MB (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418, 152-156.
- Honikel KO (1998) Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci* 49, 447-457.
- Honikel KO (2004) Curing agents. In W. K. Jensen, C. Devine, and M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sci.* (pp. 195–201), Elsevier Ltd. Oxford, UK.
- Horton AA & Fairhurst S (1987) Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18, 27-79.
- Houben JH, van Dijk A, Eikelenboom G & Hoving-Bolink AH (2000) Effect of vitamin E supplementation, fat level and packaging on color stability and lipid oxidation in minced beef. *Meat Sci* 55, 331–336.
- Hoz L, Lopez-Bote CJ, Cambero MI, D'Arrigo, M, Pin C, Santos C, et al. (2003) Effect of dietary linseed oil and atocopherol on pork tenderloin (Psoas major) muscle. *Meat*

Sci 65, 1039-1044.

- Hrnčiric K & Fritsche S (2004) Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in VOO. *Eur J Lipid Sci Technol* 106, 540-549.
- Huff-Lonergan E & Lonergan SM (2005) Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci* 71, 194-204.
- Huff-Lonergan E, Zhang WG & Lonergan SM (2010). Biochemistry of postmortem muscle—Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci* 86, 184-195.
- Hultin HO (1994) Oxidation of lipids in seafoods, In: *Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality* (Shahidi F, Botta JR, Eds), Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp 49-55.
- Igene JO, King JA, Pearson AM & Gray JI (1979) Influence of heme pigments, nitrite and non-heme iron on development of warmed-over flavor in cooked meat. *J Agric Food Chem* 27, 838-842.
- Igene JO, Yamauchi K, Pearson AM & Gray JI (1985) Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavor in cured meat. *Food Chem* 18, 1-18.
- Isdell E, Allen P, Doherty A & Butler F (2003) Effect of packaging cycle on the colour stability of six beef muscles stored in a modified atmosphere mother pack system with oxygen scavengers. *Int J Food Sci Technol* 38, 623-632.
- Ismail N & Alam M (2001) A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 72, 676-679.
- Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD & Madhavi DL (1996) Lipid oxidation in biological and food systems, In: *Food antioxidants*, Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe D K, Eds, Dekker, New York, pp 5–63.
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 9, 515-540.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-20.
- Japon-Lujan R & Luque de Castro MD (2007) Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. *J Agric Food Chem* 55, 4584-4588.
- Japón-Luján R & Luque de Castro MD (2006b) Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J Chromatogr A* 1136, 185-191.

- Japón-Luján R, Luque-Rodríguez JM & Luque de Castro MD (2006c) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J Chromatogr A* 1108, 76–82.
- Japón-Luján R, Luque-Rodríguez JM & Luque de Castro MD (2006d) Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Anal Bioanal Chem* 385, 753–759.
- Japon-Lujan R, Ruiz-Himenez & Luque de Castro MD (2006a) Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents. *J Agric Food Chem* 54, 9706-9712.
- Jayathilakan K, Sharma GK, Radhakrishna K & Bawa AS (2007a) Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavor in different species of meat. *Food Chem* 105, 908-916.
- Jayathilakan K, Sharma GK, Radhakrishna K & Bawa AS (2007b) Effect of natural antioxidants on the lipid stability of fluidised bed-dried mutton. *Food Chem* 100, 662-668.
- Jensen C, Flensted-Jensen M, Skibsted LH & Bertelsen G (1998) Effects of dietary rape seed oil, copper(II) sulphate and vitamin E on drip loss, colour and lipid oxidation of chilled pork chops packed in atmospheric air or in a high oxygen atmosphere. *Meat Sci* 50, 211-221.
- Jensen C, Guidera J, Skovgaard IM, Staun H, Skibsted LH, Jensen SK, Moller AJ, Buckley J & Bertelsen G (1997) Effects of dietary  $\alpha$ -tocopherol acetate supplementation on  $\alpha$ -tocopherol deposition in porcine m. psoas major and m. longissimus dorsi and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Sci* 45, 491-500.
- Jensen SR, Franzyk H & Wallander E (2002) Chemotaxonomy of the Oleaceae: Iridoids as taxonomic markers. *J Agric Food Chem* 60, 213-231.
- Jentsch AM, Bachmann H, Furst P & Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad Biol Med* 20, 251-256.
- Jo C & Ahn DU (2000) Volatiles and oxidative changes in irradiated pork sausage with different fatty acid composition and tocopherol content. *J Food Sci* 65, 270-275.
- Jo C, Lee JI & Ahn DU (1999) Lipid oxidation, color changes and volatiles production in irradiated pork sausage with different fat content and packaging during storage. *Meat Sci* 51, 355-361.
- Johnson IT (2001) Antioxidants and antitumour properties, In : *Antioxidants in Food*,

- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (Eds), Woodhead Publishing Cambridge, UK.
- Jorgensen K & Skibsted LH (1993) Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch* 196, 423-329.
- Juncher D, Ronn B, Mortensen ET, Henckel P, Karlsson A, Skibsted LH & Bertelsen G. (2001) Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative stability of colour and lipid during chill storage of pork. *Meat Sci* 58, 347-357.
- Juntachote J, Berghofer E, Siebenhandl S & Bauer F (2006) The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Sci* 72, 446-456.
- Juntachote J, Berghofer E, Siebenhandl S & Bauer F (2007a) Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation.. *Food Chem* 100, 129-135.
- Juntachote J, Berghofer E, Siebenhandl S & Bauer F (2007b) The effect of dried galangal powder and its ethanolic extracts on oxidative stability in cooked ground pork. *LWT* 40, 324-330.
- Kamin-Belsky N, Brillon AA, Arav R & Shaklai N (1996) Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: Comparison between native and oxidatively cross-linked protein. *J Agric Food Chem* 44, 1641-1646.
- Kanner J & Doll L (1991) Ferritin in muscle tissue a source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 39, 370-376.
- Kanner J (1992) Mechanism of nonenzymic lipid peroxidation in muscle foods, In: Saint Angelo AJ, *Lipid oxidation in foods*, American Chemical Society Symposium Series vol 500, Washington DC, American Chemical Society books, pp 55-73.
- Kanner J (1994) Oxidative processes in meat and meat product: Quality implications, *Meat Sci* 36, 169-189.
- Kanner J, Harel S & Jaffe R (1991) Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J Agric Food Chem* 39, 1017-1021.
- Kanner J, Harel S, Shagalovich J & Berman S (1984) Antioxidative effect of nitrite in cured meat products: Nitric oxide-iron complexes of low molecular weight. *J Agric Food Chem* 32, 512-515.
- Kanner J, Hazan B & Doll L (1988) Catalytic "free" iron ions in muscle foods. *J Agric Food Chem* 36, 412-415.
- Kanner J, Salan MA, Harel S & Shegalvich I (1991) Lipid peroxidation of muscle food: The

- role of cytosolic fraction. *J Agric Food Chem* 39, 242-246.
- Kathirvel P, Gong Y & Richards MP (2009) Identification of the compound in a potent cranberry juice extract that inhibits lipid oxidation in comminuted muscle. *Food Chem* 115, 924-932.
- Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H & Agarwal R (1997) Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Nat Cancer Inst* 89, 556-566.
- Keller JD & Kinsella JF (1973) Phospholipid changes and lipid oxidation during cooking and frozen storage of raw ground beef. *J Food Sci* 38, 1200-1204.
- Kerry JP, Buckley DJ, Morrissey PA, O'Sullivan K & Lynch PB (1998) Endogenous and exogenous  $\alpha$ -tocopherol supplementation: effects on lipid stability (TBARS) and warmed-over flavor (WOF) in porcine *M. longissimus dorsi* roasts held in aerobic and vacuum packs. *Food Res Internat* 31, 211-216.
- Khan AW (1966) Cryochemistry of animal tissue: Biochemical changes in poultry muscle during freezing and storage. *Cryobiol* 3, 224-229.
- Khan MY, Panchal S, Vyas N, Butani A & Kumar V (2007) *Olea europea*: A phyto-pharmacological review. *Phcog Rev* 1, 114-118.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY & Lee CY (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51, 6509-6515.
- Kim J-S, Suh M-H, Yang C-B & Lee HG (2003) Effect of  $\gamma$ -oryzanol on the flavor and oxidative stability of refrigerated coked beef. *J Food Sci* 68, 2423-2429.
- Kingston E, Monahan F, Buckley D & Lynch P (1998) Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. *J Food Sci* 63, 386-389.
- Kiritsakis K, Kontominas MG, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D, Moustakas A & Kiritsakis A (2010) Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *J Am Oil Chem Soc* 87, 369-376.
- Kiritsakis A (1998) *Olive Oil – From the Tree to the table*. 2<sup>nd</sup> Ed. Food and Nutrition Press, Inc, Trumbull, CT, USA.
- Kochhar RK. (1993) Science in British India. II. Indian response *Current Sci* 64, 55-52.
- Kosar M, Dorman HJD, Baer KHC & Hiltunen R (2004). Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of mentha samples using a postcolumn derivatization method. *J Agric Food Chem* 52, 5004-5010.
- Kouba M, Enser M, Whittington F, Nute GR & Wood JD (2003) Effect of a high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition, and meat quality in

- the growing pig. *J Anim Sci* 81, 1967-1979.
- Kristensen L & Purslow PP (2001) The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the heme- nonheme-iron ratio in meat. *Food Chem* 73, 433-439.
- Kroll J & Rawel H (2001) Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds. *J Food Sci* 66, 48-58.
- Kroon PA, Faulds CB, Ryden P & Williamson G (1996) Solubilisation of ferulic acid from plant cell wall materials in a model human gut system. *Biochem Soc Trans* 24, 384S.
- Kuwajima H, Uemura T, Takaishi K, Inoue K & Inoue H (1988) A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*. *Phytochemistry* 27, 1757-1759
- Labuza TP, Tannenbaum SR & Karel M (1970) Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. *Food Technol* 24, 35-42.
- Ladicos D & Lougovois V (1990) Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food chem* 35, 295-314.
- Lahucky R, Bahelka I, Kuechenmeister U, Vasickova K, Nuernberg K, Ender K, et al. (2007) Effects of dietary supplementation of vitamins D3 and E on quality characteristics of pigs and longissimus muscle antioxidative capacity. *Meat Sci* 77, 264-268.
- Lahucky R, Nuernberg K, Kovac L, Bucko O & Nuernberg G (2010) Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts – In vitro and in vivo experiments on pork. *Meat Sci* 85, 779-784.
- Lametsch R, Lonergan SM & Huff-Lonergan E (2008). Disulfide bond within  $\mu$ -calpain active site inhibits activity and autolysis. *Biochim Biophys Acta* 1784, 1215–1221.
- Lampi A-M & Piironen V (1998)  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherols as efficient antioxidants in butter oil triacylglycerols. *Fett-Lipid*, 100, 292-295.
- Lanari MC, Schaefer DM & Scheller KK (1995) Dietary vitamin E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Sci* 41, 237-250.
- Lara MS, Gutierrez JI, Timón M & Andrés AI (2011) Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. *Meat Sci* 88, 481-488.
- Largilhere C & Melancon SB (1988) Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 170, 123-126.



- Larick DK, Turner BE, Schoenherr WD, Coffey MT & Pilkington DH (1992) Volatile compound contents and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet. *J Anim Sci* 70, 1397-1403.
- Larkeson B, Dutta PC & Hansson I (2000) Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. *J Am Oil Chem Soc* 77, 675-680.
- Launert E (1989) In: *The Hamlyn guide to edible and medicinal plants of Britain and northern Europe*. The Hamlyn Publishing Group Ltd., London.
- Laury A & Sebranek J (2007) Use of carbon monoxide combined with carbon dioxide for modified atmosphere packaging of pre- and postrigor fresh pork sausage to improve shelf life. *J Food Protect* 70, 937-942.
- Lawless HT & Heymann H (1998) *In sensory evaluation of food*. New York, Chapman & Hall.
- Lawrie RA (1998) The eating quality of meat. In Lawrie RA, Ed, *Meat Science*, 6<sup>th</sup> ed., Cambridge, Woodhead Publishing.
- Le Floch F, Tena MT, Rios A & Valcarcel M (1998) Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta* 46, 1123-1130.
- Le Tutour B & Guedon D (1992) Antioxidative activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31, 1173-1178
- Ledward DA, Dickinson RF, Powell VH & Shorthose WR (1986) The colour and colour stability of beef longissimus dorsi and semimembranosus muscles after effective electrical stimulation. *Meat Sci* 16, 245-265.
- Lee CM, Trevino B & Chaiyawat M (1996) A simple and rapid solvent extraction method for determining total lipids in fish tissue. *J AOAC Int* 79, 487-492.
- Lee M-A, Choi J-H, Choi Y-S, Han D-J, Kim H-Y, Shim S-Y, Chung H-K & Cheon-Jei Kim C-J (2010) The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation *Meat Sci* 84, 498-504.
- Lee O-H, Boo-Yong L, Junsoo L, Hee-Bong L, Jong-Youn S, Cheon-Seok P, Kalidas S & Young-Cheul K (2009) Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Biores Technol* 100, 6107-6113.
- Lee S, Decker EA, Faustman C & Mancini R (2005) The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Sci* 70, 683-689.

- Lee S, Faustman C, Djordjevic D, Faraji H & Decker EA (2006) Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids. *Meat Sci* 72, 18-24.
- Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT & Huang PL (2003) Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 1029-1037.
- Lemanska K, Szymusia H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF & Rietjens IMCM. (2001) The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyl flavones. *Free Rad Biol Med* 31, 869-881.
- Lesage-Meessen L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot JC, Lorquin J, Delattre M, Simon JL, Asther M & Labat M (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem* 75, 501-507.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186, 464-478.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER & Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 233, 346-357.
- Liakopoulos G, Stavrianakou S & Karabourniotis G (2001) Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence for the chemical origin of the UV – induced blue fluorescence of stomata. *Annals Bot* 87, 641–648.
- Liakopoulos G, Stavrianakou S & Karabourniotis G (2006) Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europea* leaves: differences in flavonoid distribution, UV-absorbing capacity, and wax yield. *Environ Exp Bot* 55, 294-304.
- Lin J, Reichner C, Wu X & Levine AJ (1996) Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol* 16, 1786-1793.
- Lindberg-Madsen H & Bertelsen G (1995) Spices as antioxidants. *Trends Food Sci Technol* 6, 271-277.
- Litridou M, Linssen J, Schols H, Bergmans M, Posthumus M, Tsimidou M, et al. (1997) Phenolic compounds in virgin olive oils: fraction by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *J Sci Food Agric* 74, 169-174.
- Liu G & Xiong YL (1996) Storage stability of antioxidant-washed myofibrils from chicken white and red muscle. *J Food Sci* 61, 890-894.
- Liu G & Xiong YL (1997) Contribution of lipid and protein oxidation to rheological differences between chicken white and red muscle myofibrillar proteins. *J Agric*

Food Chem 44, 779-784.

Liu G & Xiong YL (2000) Oxidatively induced chemical changes and interactions of mixed myosin, B-lactoglobulin and soy 75 globulin. *J Sci Food Agric* 80, 1601-1607.

Liu Z, Xiong YL & Chen J (2009) Identification of restricting factors that inhibit swelling of oxidized myofibrils during brine irrigation. *J Agric Food Chem* 57, 10999-11007.

Liu Z, Xiong YL & Chen J (2010). Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *J Agric Food Chem* 58, 10697-10704.

Lu XP, Fanjul A, Picard N, Pfahl M, Rungta D, Nared-Hood K, Carter B, Piedrafita J, Tang S, Fabbriozio E & Pfahl M (1997) Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells *in vivo*. *Nat Med* 3, 686-690.

Lund MN, Christensen M, Fregil L, Hviid MS & Skibsted LH (2008) Effect of high-oxygen atmosphere packaging in mechanical properties of single muscle fibres from bovine and porcine Longissimus dorsi. *Eur Food Res Technol* 227, 1323-1328.

Lund MN, Heinone, M, Baron CP & Estevez M (2011) Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res* 55, 83-95.

Lund MN, Hviid MS & Skibsted LH (2007b) The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Sci* 76, 226-233.

Lund MN, Lametsch R, Hviid MS, Jensen ON & Skibsted LH (2007a) High oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Sci* 77, 295-303.

Luque de Castro MD & Japon-Lujan R (2006) State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trends Anal Chem* 25, 501-510.

Luthria DI, Mukhopadhyay S, & Kwansa AL (2006) A systematic approach for extraction of phenolic compounds using pasley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *J Sci Food Agric* 86, 1350-1358.

Lynch RE & Fridovich I (1978) Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem* 253, 4697-4699.

MacDonald B, Gray JI, Stanley DW & Osborne WR (1980) Role of nitrite in cured meat flavour: Sensory analysis. *J Food Sci* 45, 885-888.

Maga JA (1988) *Smoke in Food Processing*, Boca Raton, FL, CRC Press.

- Makris DP, Boskou G & Andrikopoulos NK (2007) Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Comp Anal* 20, 125-132.
- Malešev D & Kuntić V (2007) Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J Serb Chem Soc* 72, 921-939.
- Malik NSA & Bradford JM (2006) Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in Arbequina olives. *Sci Hort* 110, 274-278.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier M, Agullo G, Demigne C, Regeat F & Remesy C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125, 1911-1922.
- Mancini RA & Hunt MC (2005) Current research in meat colour. *Meat Sci* 71, 100-121.
- Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem* 15, 461-466.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A & Zappia V (1997) The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in caco-2 cells. *J Nutr* 127, 286-292.
- Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC & Lerici CR (2001) Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol* 11, 340-346.
- Markin D, Duek L & Berdicevsky I (2003) In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses* 46, 132-136.
- Martin Garcia AI, Moumen A, Yáñez Ruiz DR & Molina Alcaide E (2003) Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim Feed Sci Technol* 107, 61-74.
- Martin Garcia AI, Yanez Ruiz A, Moumen DR & Alcaide EM (2006) Effect of polyethylene-glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europea* var. *europea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Rum Res* 61, 53-61.
- Martin Garcia AI, Yanez Ruiz A, Moumen DR, & Alcaide EM (2004) Effect of polyethylene-glycol on the chemical composition and nutrient availability of olive (*Olea europea* var. *europea*) by-products. *Anim Feed Sci Technol* 114, 159-177.
- Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, Tassy C, Gatellier P & Renerre M (1997) Comparison

- of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *J Agric Food Chem* 45, 2481-2487.
- Martins FM & Gordon MH (2001) Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl-4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *J Agric Food Chem* 49, 4214-4219.
- Mathew S & Abraham TE (2006) In vitro antioxidant activity and scavenging effects of cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol* 44, 198-206.
- Matthews KR, Homer DB, Thies F & Calder PC (2000) Effect of whole linseed (*Linum usitatissimum*) in the diet of finishing pigs on growth performance and on the quality and fatty acid composition of various tissues. *Brit J Nutr* 83, 637-643.
- McBride NTM, Hogan SA & Kerry JP (2007) Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. *Int J Food Sci Technol* 42, 1201-1207.
- McCarthy TL, Kerry JP, Kerry JF, Lynch PB & Buckley DJ (2001) Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci* 57, 177-184.
- McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M & Robards K (2001) Phenolic content and antioxidants activity of olive extracts. *Food Chem* 73, 73-84.
- McDougall DB (1982) Changes in colour and opacity of meat. *Food Chem* 9, 75-88.
- McKenna D, Mies P, Baird B, Pfeiffer K, Ellebracht J & Savell J (2005) Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Sci* 70, 665-682.
- McKibben J & Engeseth NJ (2002) Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *J Agric Food Chem* 50, 592-595.
- McMillin A & Kenneth W (2008) Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci* 80, 43-65.
- Medina E, Brenes M, Romero C, Garcia A & De Castro A (2007) Main Antimicrobial Compounds in Table Olives. *J Agric Food Chem* 55, 9817-9823.
- Meirinhos J, Silva BM, Valentao P, Seabra RM, Pereira JA, Dias A, Andrade PB & Ferreres F (2005) Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea Europea L.*) leaf cultivars. *Nat Prod Res* 19, 189-195.
- Melton SL (1990) Effects of feeds on flavour of red meat: A review. *J Anim Sci* 68, 4421-

4435.

- Mercier Y, Gatellier P & Renerre M (2004) Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Sci* 66, 467-473.
- Mercier Y, Gatellier P, Viau M, Remignon H & Renerre M (1998) Effect of dietary fat and vitamin E on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci* 48, 301-317.
- Mercier Y, Gatellier Ph, Viau M, Remignon H & Renerre M (1998) Effect of fat and vitamin E on colour stability and lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci* 48, 301–318.
- Mielche MM & Bertelsen G (1994) Approaches to the prevention of warmed over-flavor. *Trends Food Sci Technol* 5, 322-327.
- Miller HE, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A & Kanter M (2000) Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Amer College Nutr* 19, 312-319.
- Miller NJ & Rice-Evans CA (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Rad Res* 26, 195-199.
- Minotti G (1993) Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 6, 134-46.
- Mitsumoto M, Arnold RN, Schaefer DM & Cassens RG (1993) Dietary versus postmortem supplementation of vitamin E on pigment and lipid stability in ground beef. *J Anim Sci* 71, 1812-1816.
- Mitsumoto M, O'Grady MN, Kerry JP & Buckley DJ (2005) Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Sci* 69, 773–779.
- Moghadasian MH (2008), Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 402-410.
- Mohamed A, Jamilah B, Abbas KA & Abdul Rahman R (2008) A review on lipid oxidation of meat in active and modified atmosphere packaging and usage of some stabilizers. *J Food Agric Environ* 6, 76-81.
- Mohamed R, Pineda M & Aguilar M (2007) Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. *J Food Sci* 72, S59–S63.
- Molina Alcaide E & Nefzaoui A (1996) Recycling of olive oil by-products: possibilities of

- utilization in animal nutrition. *Int Biodet Biodeg* 38, 225-235.
- Moller JKS & Skibsted LH (2002) Nitric oxide and myoglobins. *Chem Rev* 102, 1167–1178.
- Monahan FJ, Asghar A, Gray JI, Buckley DJ & Morrissey PA. (1994) Effect of oxidized dietary lipid and vitamin E on the colour stability of pork chops. *Meat Sci* 37, 205-215.
- Monahan FJ (2000) Oxidation of lipids in muscle foods: Fundamental and applied concerns' in Decker EA, Faustman C and Lopez-Bote CJ, *Antioxidants in muscle foods*, New York, Wiley-Interscience, pp 3-23.
- Monahan FJ, Crackel RL, Gray JI, Buckley DJ & Morrissey PA (1993) Catalysis of lipid oxidation in muscle model systems by haem and inorganic iron. *Meat Sci* 34, 95-106.
- Morgan JN & Armstrong DJ (1987) Formation of cholesterol-5,6-epoxides during spray drying of egg yolk. *J Food Sci* 52, 1224-1227.
- Mortensen M, Andersen AJ, Engelsen SB & Bertram HC (2006) Effect of freezing temperature, thawing and cooking rate on water distribution in two pork qualities. *Meat Sci* 72, 34-42.
- Morzell M, Gatellier P, Sayd T, Renerre M & Laville E (2006) Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci* 73, 536-543.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Manuel Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ & Carlos Parajó J (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72, 145-171
- Mousa YM & Gerasopoulos D (1996) Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *J Sci Food Agric* 71, 345-350.
- Muguerza E, Ansorena D & Astiasaran I (2004) Functional dry fermented sausages manufactured with high levels of n-3 fatty acids: nutritional benefits and evaluation of oxidation. *J Sci Food Agric* 84, 1061-1068.
- Munasinghe DMS, Ichimaru K, Matsui T, Sugamoto K & Sakai T (2003) Lipid peroxidation-derived cytotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal in smoked pork. *Meat Sci* 63, 377-380.
- Mylonaki S, Kiassos E, Makris DP & Kefalas P (2008) Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and

- response surface methodology. *Anal Bioanal Chem* 392, 977-985.
- Naczka M & Shahidi F (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables, occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41, 1523-1542.
- Nagy M, Spilkova J, Vrchovska V, Kontsekova Z, Sersen F, Mucaji P & Grancai D (2006) Free radical scavenging activity of different extracts and some constituents from the leaves of *Ligustrum vulgare* and *L. delavayanum*. *Filoterapia* 77, 395-397.
- Nakagawa K, Okuda S & Miyazawa T (1997) Dose-dependent incorporation of tea catechins, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1981-1985.
- Nam YJ, Choi YM, Jeong DW & Kim BC (2009) A comparison of postmortem meat quality and consumer sensory characteristic evaluations, according to porcine quality classification. *Food Sci Biotechnol* 18, 307-311.
- Namiki M (1990) Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29, 273-300.
- Narasimhan S, Raghuvver KG, Arumngam C, Bhat KK & Sen DP (1986) Oxidative rancidity of groundnut oil evaluation by sensory and chemical indices and their correlation. *J Food Sci Technol* 23, 273-277.
- Navarro JL, Nadal MI, Nieto P & Flores J (2001) Effect of nitrate and nitrite curing salts on the generation and oxidation of fatty acids in non-fermented sausages. *Eur Food Res Technol* 212, 421-425.
- Navas JA, Tres A, Codony R, Boatella J, Bou R & Guardiola F (2004) Modified ferrous oxidation-xyleneol orange method to determine lipid hydroperoxides in fried snacks. *Eur J Lipid Sci Technol* 106, 688-696.
- Naveena BM, Muthukumar M, Sen AR, Babji Y & Murthy TRK (2006) Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Sci* 74, 409-415.
- Nelson KA & Labuza TP (1992) Relation between water and lipid oxidation rates, In: *Lipid oxidation in Foods*, (St. Angelo, AJ, Ed, ACS Symposium Series 500, Washington, DC, pp 93-103.
- Nenadis N & Tsimidou M (2009) Oleuropein and related secoiridoids. Antioxidant activity and sources other than *Olea europea* L (olive tree). *Recent Prog.Med Plants* 25, 53-74.
- Ness AR & Powles JW (1997) Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol* 6, 1-13.



- Niaounakis M & Halvadakis CP (2004) In: olive-mill waste management. Literature review and patent survey, G.Dardanos publications, Athens, pp 13-44.
- Nielsen SN, Petersen A & Meyer SA (2004) Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Agric Food Chem* 52, 7690-7696.
- Nigel CW & Glories Y (1991) Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am J Enol and Viticul* 42, 364-366.
- Noguchi N & Niki, E (1999) Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. Papas M.A (Ed.). CRC Press, USA, pp 1-19.
- Nourooz-Zadeh J & Appelqvist L-A (1987) Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J Food Sci* 52, 57-66.
- Nunez de Gonzalez MT, Hafley BS, Boleman RM, Miller RK, Rhee HS & Keeton JT (2008) Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. *Meat Sci* 80, 997-1004.
- O'Grady MN, Carpenter R, Lynch PB, O'Brien NM & Kerry JP (2008) Addition of grape seed extract and bearberry to porcine diets, Influence on quality attributes of raw and cooked pork. *Meat Sci* 78, 438-446.
- O'Neill LM, Galvin K, Morrissey PA & Buckley DJ (1998) Inhibition of lipid oxidation in chicken by carnosine and dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation and its determination by derivative spectrophotometry. *Meat Sci* 50, 479-488.
- Obied KH, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K & Stockmann R (2005) Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J Agric Food Chem* 53, 823-837.
- Obied KH, Bedgood Jr, DR, Prenzler PD & Robards K (2007) Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 603, 176-189.
- Oeckel Van MJ, Casteels M, Warnants N, Van Damme L & Bouque CV (1996) Omega-3 fatty acids in pig nutrition: Implications for the intrinsic and sensory quality of the meat. *Meat Sci* 44, 55-63.
- Ohshima, Auriol S & Gilibert I (1998) Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitrosyl anion. *Free Rad Biol Med* 25, 1057-1065.

- Okada Y, Okajima H, Konishi H, Terauchi M, Ishii K, Liu I-M & Watanabe H (1990) Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *J Am Oil Chem Soc* 67, 850-862.
- Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S & Stadtman ER (1987) Aged- related changes in oxidised proteins. *J Biol Chem* 262, 5488-5491.
- Osinchak JE, Hultin HO, Zajicek OT, Kelleher SD & Huang C (1992) Effect of NaCl on catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle. *Free Rad Biol Med* 12, 35-41.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA & Deemer EK (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J Agric Food Chem* 50, 3122-3128.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B & Bartsch H (2000a) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 36, 1235-1247.
- Owen RW, Giacosa A, Haubner R, Wurtele G, Spiegel-Halder B & Bartsch H (2000b) Olive-oil consumption and health : the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 1, 107-112.
- Paiva-Martins F, Barbosa S, Pinheiro V, Moureo JL & Outor-Monteiro D (2009) The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat Sci* 82, 438-443.
- Paiva-Martins F, Correia R, Felix S, Ferreira P & Gordon, MH (2007) Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. *J Agric Food Chem* 55, 4139-4143.
- Paiva-Martins F & Gordon MH (2001) Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem* 49, 4214-4219.
- Paiva-Martins F, Gordon MH & Gameiro P (2003) Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem Phys Lipids* 124, 23-36.
- Papadopoulos G & Boskou D (1991) Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 68, 669-671.
- Papoti VT & Tsimidou MZ (2009) Impact of Sampling Parameters on the Radical Scavenging Potential of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *J Agric Food Chem* 57,

3470-3477.

- Paquette G, Kupranycz D & Vandevoor F (1985) The mechanisms of lipid autoxidation. II. Non volatile secondary products. *Can Inst Food Sci Technol J* 18, 197-206.
- Parcker L (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53, 1050S-5S.
- Park D, Xiong YL, Alderton AL & Ooizumi L (2006) Biochemical changes in myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *J Agric Food Chem* 54, 4445–4451.
- Park SW & Addis PB (1987) Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J Food Sci* 52, 1500-1503
- Park SY & Jin KB (2007) Evaluation of antioxidant activity in pork patties containing Bokbunja (*Rubus coreanus*) extract. *Kor J Food Sci Anim Res* 27, 432-439.
- Parkington JK, Xiong YL, Blanchard SP, Xiong S, Wang B, Srinivasan S & Froning GW (2000) Chemical and functional properties of oxidatively modified beef heart surimi stored at 2°C. *J Food Sci* 65, 428-433.
- Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Bennett J, Witztum JL & Steinberg D (1990) Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3894-8.
- Pegg RB & Shahidi F (2000) *Nitrite curing of meat. The n-nitrosamine problem and nitrite alternatives*, Trumbull, CT, Food and Nutrition Press, Inc., pp 268
- Pena-Ramos EA & Xiong YL (2003) Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci* 64, 259-263.
- Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentao P, Andrade PB, Seabra R, et al. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) leaves. *Molecules* 12, 1153-1162.
- Perez-Bonilla M, Salido S, Van Beek TA, Linares-Palomino, PJ, Altarejos J, Nogueras M & Sanchez A (2006) Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europea* L) wood. *J Chromatogr A*, 1112, 311-318.
- Perez-Jimenez J, Arranz S, Taberero M, Diaz-Rubio ME, Serrano J, Goni I & Saura-Galixto F (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Internat* 41, 274-285.

- Persson E, Sjöholm I, Nyman M & Skog K (2004) Addition of various carbohydrates to beef burgers affects the formation of heterocyclic amines during frying. *J Agric Food Chem* 52, 7561-7566.
- Pieroni A, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A & Galli C (1997) Inhibition of leukocyte leucotriene B<sub>4</sub> production by an olive oil-derived phenol identified by mass spectrometry. *Thromb Res* 87, 315-322.
- Pieroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Mondetoro GF & Galli C (1995) Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 78, 151-160
- Pieroni A, Heimler D, Pieters L, Van Poel B & Vlieinck AJ (1996) In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie* 51, 765-768.
- Pietrasik Z, Dhanda J, Shand P & Pegg R (2006) Influence of injection, packaging, and storage conditions on the quality of beef and bison steaks. *J Food Sci* 71, s110-s118.
- Pietta P-G (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
- Pikul J, Leszcynski DE & Kummerow FA (1989) Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J Agric Food Chem* 37, 1309-1313.
- Plumb GW, Price KR & Williamson G (1999) Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep* 4, 13-16.
- Pokorny J (1987) Major factors affecting the autoxidation of lipids, In: *Autoxidation of unsaturated lipids* (Chan HWS, Ed), Academic Press, London, pp 141-206.
- Pokorny J, Nguyen H & Korczak J (1997) Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil. *Nahrung* 14, 176-177.
- Polzonetti V, Egidio D, Vita A et al (2004) Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem* 88, 11-15.
- Porter WL (1993) Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Industr Health* 9, 93-122.
- Porter WL, Black EB & Drolet AM (1989) Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J Agric Food Chem* 37, 615-624.
- Price KR & Rhodes MJC (1997) Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from

- autolysis. *J Sci Food Agric* 74, 331–339.
- Prior RL & Cao G (1999) Antioxidant capacity and polyphenoli components of teas : Implications for altering in vivo antioxidant status. *Soc Exper Biol Med* 220, 255-261.
- Prior RL, Wu X & Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53, 4290-4302.
- Promeyrat A, Gatellier P, Lebret B, Kajak-Siemaszko K, Aubry L & Santé-Lhoutellier L (2010) Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chem* 121, 412-417.
- Pryor WA, Stanley J & Blair E (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids : II. A suggested mechanism for the formation of TBA reactive materials from prostaglandin like endoperoxides. *Lipids* 11, 370-379.
- Psomiadou E & Tsimidou M (2001) Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *J Sci Food Agric* 2001, 41, 640-647.
- Puolanne E & Halonen M (2010) Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Sci* 86, 151–165.
- Quattara B, Simard RE, Piette G, Begin A & Holley Ra (2000) Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *J Food Sci* 65, 768-773.
- Rababah T, Hettiarachchy N, Horax R, Eswaranandam S, Mauromoustakos A. Dickson J, et al. (2004) Effect of electron beam irradiation and storage at 5 °C on thiobarbituric acid reactive substances and carbonyl content in chicken breast meat infused with antioxidants and selected plant extracts. *J Agric Food Chem* 52, 8236–8241.
- Rada M, Guinda A & Cayuela J (2007) Solid/liwquid extraction and isolation by molecular distillation pf hydroxytyrosol from *Olea europea* L leaves. *Eur J Lipid Sci Teschol* 109, 1071-1076.
- Ragazzi E, Veronese G & Guiotto A (1973) Demetiloleoeuropeina, nuovo glucoside isolato da olive mature. *Annal Chim* 63, 13–15.
- Raha S & Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageig. *Trends Biochem Sci* 25, 502-508.
- Ramanathan L & Nagaratham PD (1993) Effect of natural copper chelating compounds on the prooxidant activity of ascorbic acid in steam-cooked ground fish. *Internat J Food Sci Technol* 28, 279-288.

- Ramirez MR, Morcuende D, Estevez M & Cava R (2004). Effects of the type of frying with culinary fat and refrigerated storage on lipid oxidation and colour of fried pork loin chops. *Food Chem* 88, 85-94.
- Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D & Di Fonzo V (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europea* L). *J Agric Food Chem* 54, 434-440.
- Ranizi LM, Scarpati JM & Oriente EG (1960) Costituzione della oleuropeina, glucoside, glicoside amaro e ad azione ipotensiva dell' olivo. *Org Prep Proc Int* 4, 97-104.
- Rastogi N, Raghavarao K, Balasubramaniam V, Niranjana K & Knorr D (2007), Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47, 69-112.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pankala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 26, 1231-1237.
- Renaud S & De Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526.
- Renner M & Labas R (1987). Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Sci* 19, 151-158.
- Requena JR, Chao C-C, Levine RL & Stadtman ER (2001) Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 69-74.
- Requena JR, Levine RL & Stadtman ER (2003) Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 25, 221-226.
- Reznick AZ & Packer L (1994) Oxidative damage to proteins-spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357-363.
- Rhee K & Ziprin Y (2001) Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth-controlled and uncontrolled beef and chicken. *Meat Sci* 57, 105-112.
- Rhee KS, Ziprin YA & Ordonez G (1987) Catalysis of lipid oxidation in raw and cooked beef by metmyoglobin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nonheme iron and enzyme systems. *J Agric Food Chem* 35, 1013-1017.
- Robards K (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A* 1000, 657-691.
- Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D & Estévez M (2012) Avocado, sunflower and olive

- oils as replacers of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *Meat Sci* 90, 106-115.
- Rojas MC & Brewer MS (2007) Effect of Natural Antioxidants on Oxidative Stability of Cooked, Refrigerated Beef and Pork. *J Food Sci* 72, S282-S288.
- Romero C, Brenes M, Garcia P & Garrido A (2002) Hydroxytyrosol 4- $\alpha$ -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 50, 3835-3839.
- Rousseff RL, Martin SF & Youtsey CO (1987) Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem* 35, 1027-30.
- Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM & Huff-Lonergan E (2004a) Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *J Anim Sci* 82, 785-793.
- Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM & Huff-Lonergan E (2004b) Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of milli-calpain. *J Ani Sci* 82, 3254-3266.
- Ruiz de Huidobro F, Miguel E, Onega E & Blazquez B (2003) Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days postmortem. *Meat Sci* 65, 1439-1446.
- Ryan D, Antolovich M, Hurt T, Prenzler PD, Lavee S & Robards K (2002b) Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem* 50, 6716-6724.
- Ryan D, Antolovich M, Prenzler PD, Robards K & Lavee S (2002) Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europea* L. *Sci Hort* 92, 147-176.
- Ryan D, Lawrence H, Prenzler PD, Antolovich M & Robards K (2001) Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea* L. *Anal Chim Acta* 445, 67-77.
- Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K & Lavee S (2003) Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem* 51, 2532-2538.
- Ryan D, Robards K & Lavee S (1998) Assessment of quality in olive oil, *Olivae* 72, 23-41.
- Ryan D, Robards K, Prenzler P, Jardine D, Herlt T & Antonovich M (1999) Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J Chromatogr A*, 855, 529-537.
- Saint Angelo AJ (1996) Lipid oxidation in foods, *Crit Rev Food Sci Nutr* 36, 175-224.
- Sakai T, Munasinghe DMS, Kashimura M, Sugamoto K & Kawahara S (2004) Effect of

- NaCl on lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal formation in minced pork and beef *Meat Sci* 66, 789-792.
- Sakai T, Shimizu Y & Kawahara S (2006) Effect of NaCl on the lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, formation in boiled pork. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 815-820.
- Salih A.M, Price JF, Smith DM & Dawson LE (1987) Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult Sci* 66, 1483-1488.
- Salminen H, Estevez M, Kivikari R & Heinonen M (2006) Inhibition of protein and lipid oxidation by rapeseed, camelina and soy meal in cooked pork meat patties. *Eur Food Res Technol* 223, 461-468.
- Salminen H, Jaakkola H & Heinonen M (2008) Modifications of tryptophan oxidation by phenolic-rich plant materials. *J Agric Food Chem* 56, 11178-11186.
- Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G & Andrikopoulos NK (2007) Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Sci Tech Int* 13, 413-421.
- Sánchez Ávila N, Capote FP & Luque de Castro MD (2007) Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *J Chromatogr A* 1165, 158-165.
- Sante-Lhoutellier V, Astruc T, Marinova P, Greve E & Gatellier P (2008) Effect of meat cooking on physicochemical state and in vivo digestibility of myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem* 56, 1488-1494.
- Santé-Lhoutellier V, Aubry L & Gatellier P (2007). Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem* 55, 5343–5348.
- Sante-Lhoutellier V, Engel E, Aubry L & Gatellier P (2008a) Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Sci* 79, 777-783.
- Sanz-Cortes F, Martinez-Calvo J, Badenes ML, Bleiholder H, Hack H, Llacer G & Meier U (2002) Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Ann. Appl. Biol.* 140, 151–157.
- Sasse A, Colindres P & Brewer MS (2009) Effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Cooked, Frozen Pork Patties. *J Food Sci* 74, S30-S35.



- Savourmin C, Baghdikian B, Elias R, Dargouth-Kesraoui F, Boukef K & Balansard G (2001) Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europea* leaves. *J Agric Food Chem* 49, 618-621.
- Scalbert A & Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 13, 2073-2085.
- Schaich KM (2012) Lipid oxidation. In N. A. M. Eskin (Ed.), *Biochemistry of Foods* (3rd Ed.), in press: Elsevier, New York.
- Schricker BR, Miller DD & Van Campen J (1982) In vitro estimation of iron availability in meals containing soy products. *J Nutr* 112, 1696-1705.
- Schricker BR & Miller DD (1983) Effects of cooking and chemical treatment on heme and nonheme iron in meat. *J Food Sci* 48, 1340-1349.
- Sell DR, Strauch CM, Shen W & Monnier VM (2008) 2-Aminoadipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: Effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem J* 404, 269-277.
- Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G & Morozzi G (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomical and technological aspects of production that affect their occurrence on the oil. *J Chromatogr A* 1054, 113-127.
- Shackelford SD, Reagan JO, Haydon KD & Miller MF (1990) Effects of feeding elevated levels of monounsaturated fat to growing-finishing swine on acceptability of boneless hams. *J Food Sci* 55, 1485-1517.
- Shahidi F & Wanasundara PKJPD (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32, 67-103.
- Shahidi F (1989) Flavor of cooked meats, In: Teranishi R, Buttery RG and Shahidi F, *Flavor Chemistry: Trends and Developments*, Washington DC, American Chemical Society, pp 188-201.
- Shahidi F (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44, 158-163.
- Shahidi F, Vidana Arachchi KJ & Jeon Y-J (1999) Food application of chitin and chitosan. *Trends Food Sci Technol* 10, 37-51.
- Shahidi F, Yun J, Rubin LJ & Wood DF (1987) The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavor acceptability in cooked ground pork. *Can Inst Food Sci Tech J* 20, 104-106.
- Shantha CN & Decker AE (1994) Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods

- for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Internat* 77, 421-424.
- Sigfusson H & Hultin HO (2002a) Partitioning of d-tocopherol in aqueous mixtures of triacylglycerols and isolated muscle membranes. *J Am Oil Chem Soc* 79, 691-697.
- Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho AV & Vilas Boas L (2006) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Sci Technol Internat* 12, 385-396.
- Singleton VL, Orthofer R & Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Follin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymol* 299, 152-178.
- Sinhuber RO & Yu TC (1958) 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products.II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Tech* 12, 9-12.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M & Knez Z (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chem* 89, 191-198.
- Soler-Rivas C, Espin JC & Wichers HJ (2000) Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric* 80, 1013-1023.
- Somova LI, Shode FO & Mipando M (2004) Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine* 11, 121-129.
- Somova LI, Shode FO, Ramnanan P & Nadar A (2003) Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol* 84, 299-305.
- Sørheim O, Westad F, Larsen H & Alvseike O (2009) Colour of ground beef as influenced by raw materials, addition of sodium chloride and low oxygen packaging. *Meat Sci* 81, 467-473.
- Sotiroudis TG, Kyrtopoulos SA & Sotiroudis GT (2003) Chemopreventive potential of minor components of olive oil against cancer. *Ital J Food Sci* 15, 169-185.
- Soyer A, Ozalp B, Dalmis U & Bilgin V (2010) Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chem* 120, 1025-1030.
- Srinivasan S & Hultin HO (1997) Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system. *J Agric Food Chem* 45, 310-320.

- Srinivasan S & Xiong YL (1997) Sulphydryls in antioxidant-washed beef heart surimi. *J Muscle Foods* 8, 251-263.
- Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1996). Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. *J Agric Food Chem* 44, 119-125.
- Stadtman ER & Levine RL (2000) Protein oxidation. *Annals New York Acad Sci* 899, 191-208.
- Stadtman ER & Berlett BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10, 484-494.
- Stadtman ER & Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.
- Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad Biol Med* 8, 315-325.
- Starmans DAJ & Nijhuis HH (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends Food Sci Technol* 7, 191-197.
- Steinbeck MJ, Khan AU, Appel WH Jr & Karnovsky MJ (1993) The DAB-Mn<sup>++</sup> cytochemical method revisited: validation of specificity for superoxide. *J Histochem Cytochem* 41, 1659-1667.
- Steinmetz KA & Potter JD (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96, 1027-39.
- Stetzer AJ, Tucker E, McKeith FK & Brewer MS (2007) Quality changes in beef gluteus medius, infraspinatus, psoas major, rectus femoris, and teres major enhanced prior to aging. *J Food Sci* 72, S242-S246.
- Sukhija PS & Palmquist DL (1988) Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J Agric Food Chem* 36, 1202-1206.
- Sun W, Zhao M, Yang B, Zhao H & Cui C (2011) Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. *Meat Sci* 88, 462-467.
- Svoboda KP & Deans SG (1992) A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: Their antioxidant properties. *J Flavour Fragr* 7, 81-87.
- Swatland HJ (1999) Feasibility of measuring meat texture and exudate using paired hypodermic needles for rheology, spectrophotometry and electrical impedance. *J*

- Text Stud 30, 217-230.
- Takahashi MA & Asada K (1983) Superoxide anion permeability membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 226, 558-66.
- Tapiero H, Ba GN & Tew KD (2002) Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother* 56, 36-44.
- Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT & Dugan L. (1960) A distillation method for the quantitative determination of malondialdehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 37, 44-48.
- Tarrant PV & Sherington J (1980) An investigation of ultimate pH in the muscles of commercial beef carcasses. *Meat Sci* 4, 287-297.
- Taylor CB, Peng S, Wethessen NT, Tham P & Lee KT (1979) Spontaneous occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am J Clin Nutr* 32, 40-48.
- Teets AS & Were LM (2008) Inhibition of lipid oxidation in refrigerated and frozen salted raw minced chicken breasts with electron beam irradiated almond skin powder. *Meat Sci* 80, 1326-1332.
- Teets AS, Sundararaman M & Were LM (2008) Electron beam irradiated skin powder inhibition of lipid oxidation in cooked salted ground chicken breast. *Food Chem* 111, 934-941.
- Therios I (2009) *Olives, CTOPI Production Science, Horticulture 18*, CABI Head Office, UK.
- Tichivangana JZ & Morrissey PA (1985) Metmyoglobin and inorganic metals as prooxidants in raw and cooked muscle systems. *Meat Sci* 15, 107-116.
- Tijburg LBM, Mattem T, Folts JD, Weisgerber UM & Katan MB (1997) Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37, 771-85.
- Tikk K, Tikk M, Aaslyng MD, Karlsson AH, Lindahl G & Andersen J (2007) Significance of fat supplemented diets on pork quality-Connections between specific fatty acids and sensory attributes of pork. *Meat Sci* 77, 275-286.
- Toldrá F (1998) Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci* 49, S101-S110.
- Trout GR (1990) The rate of metmyoglobin formation in beef, pork and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, and sodium tripolyphosphate. *Meat Sci* 28, 203-210.
- Tsimidou M, Papadopoulos G & Boskou D (1992) Phenolic compounds and stability of

- virgin olive oil. *Food Chem* 45, 141-144.
- Tura D & Robards K (2002) Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J Chromatogr A* 975, 71-93.
- Uchida K, Kato Y & Kawakishi S (1992) Metal-catalyzed oxidative degradation of collagen. *J Agric Food Chem* 40, 9-12.
- Ueda H, Yamazaki C & Yamazaki M (2002) Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 25, 1197-1202.
- Utrera M, Armenteros M, Ventanas S & Solano F (2012) Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. *Meat Sci* 92, 596-603.
- Valencia I, O'Grady MN, Ansorena D, Astiasarán I & Kerry JP (2008) Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Sci* 80, 1046-1054.
- Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H & Bast A (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66, 511-517.
- Van Ruth SM, Cheraghi T & Roozen JP (1998) Lipid-derived off-flavors in meat by-products: effect of antioxidants and Maillard reactants, in Shahidi F, *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. Second Edition*, London, Blackie Academic and Professional, pp 257-266.
- Ventanas S, Estevez M, Andres AI & Ruiz J (2008) Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME-DED. *Meat Sci* 79, 172-180.
- Ventanas S, Estevez M, Tejada JF & Ruiz JJJ (2006) Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Sci* 72, 647-655.
- Ventanas S, Ventanas J, Tovar J, García C & Estévez M (2007) Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Sci* 77, 246-256.
- Verbunt, RJAM, Egas JM & Van der Laarse A (1995) Risk of overestimation of free malondialdehyde in perfused rat hearts due to homogenisation artefacts. *Cardiovasc Res* 31, 603-606.

- Verma SP & Sahoo J (2000) Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage by tocopherol acetate preblending. *Meat Sci* 56, 403-413.
- Viljanen K, Kivikari R & Heinonen M (2004) Protein–lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 52, 1104-1111.
- Viljanen K, Sundberg S, Ohshima T & Heinonen M (2002) Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 104, 353-359.
- Visioli F & Galli C (1998) Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J Agric Food Chem* 46, 4292-4296.
- Visioli F & Galli C (2002) Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42, 209-221.
- Visioli F, Bellosta S & Galli C (1998) Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci* 62, 541-546.
- Visioli F, Bogani P & Galli C (2006). Healthful properties of olive oil minor components, In : *Olive Oil Chemistry and Technology*, (2<sup>nd</sup> Ed), Boskou D, (Ed), AOCS Press, Champaign Illinois USA.
- Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri FF & Galli C (1999) Antioxidant and other biological activities of olive mill wastewaters. *J Agric Food Chem* 47, 3397-3401.
- Visioli F & Galli C (1994) Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci* 55, 1965-1971.
- Vitaglione P, Napolitano A & Fogliano V (2008) Cereal dietary fibre, a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci Technol* 19, 451-463.
- Voet D & Voet, J (1995) *Biochemistry*, John Wiley and Sons, Inc.
- Vogt W (1995) Oxidation of methionine residues in proteins: Tools targets, and reversal. *Free Rad Biol Med* 18, 93-105.
- Voirin B (1983) UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5') - substituted B rings. *Phytochem* 22, 2107-2145.
- Volpi N & Tarugi P (1998) Improvement in high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *J Chromatogr B* 713, 433-437.

- Vuorela S, Salminen H, Makela M, Kivikari R, Karonen M & Heinonen M (2005) Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *J Agric Food Chem* 53, 8492-8497.
- Walter Jr WM, Fleming HP & Etchells JL (1973) Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl Microbiol* 26, 773-776.
- Wanasundara UN & Shahidi F (1998) Antioxidant and prooxidant activity of green extracts in marine oils. *Food Chem* 63, 335-342.
- Wang BW, Xiong YL & Srinivasan S (1997), Chemical stability of antioxidant-washed beef heart surimi during frozen storage. *J Food Sci* 62, 939-945.
- Wang L & Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* 17, 300-312.
- Wang RR, Pan XJ & Peng ZQ (2009). Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of pectoralis majors in broilers. *Poult Sci* 88, 1078-1084.
- West RL & Myer OL (1987) Carcass and meat quality characteristics and backfat fatty acid composition of swine as affected by the consumption of peanuts remaining in the field after harvest. *J Anim Sci* 65, 475-480.
- Wills TM, Mireles DeWitt CA & Sigfusson H (2007) Improved antioxidant activity of Vitamin E through solubilization in ethanol: A model study with ground beef. *Meat Sci* 76, 308-315.
- Wilson RL (1978) Free radicals and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In: *Biochemical Mechanisms of Liver Injury*. New York: Academic Press, pp 123-224.
- Winterbourn CC & Metodiewa D (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 27, 322-328.
- Wiseman SA, Mathot JN, De Fouw NJ & Tijburg LB (1996) Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low-density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 120, 15-23.
- Witte VC, Krause GF & Bailey ME (1970) A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J Food Sci* 35, 582-585.
- Wolff SP (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 233, 182-189.

- Wong WJ, Hashimoto K & Shibamoto T (1995) Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *J Agric Food Chem* 43, 2707-2712.
- Xiong YL & Decker EA (1995) Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. *J Muscle Foods* 6, 139-160.
- Xiong YL (2000) Protein oxidation and implications for muscle food quality. In, *Antioxidants in Muscle Foods* E. Decker, C. Faustman and C.J. Lopez-Bote (eds). Wiley and Sons, Inc. New York. pp 85-111.
- Yang CS & Wang ZY (1993) Tea and cancer. *J Nat Cancer Inst* 85, 1038-1049.
- Yanishlieva-Maslarova NV (2001) Inhibiting oxidation, In: *Antioxidants in food*, Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (Eds), Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
- Yin MC & Chan KC (2007) Nonenzymatic antioxidant and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J Agric Food Chem* 55, 7177-7181.
- Yin MC & Faustman C. (1993) The influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model. *J Agric Food Chem* 41, 853-857.
- Yoo KM, Kim D-O & Lee CY (2007) Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol* 16, 177-182.
- Younathan MT & Watts BM (1960) Oxidation of tissue lipids in cooked pork. *Food Res* 25, 538-543.
- Young JF, Steffensen CL, Nielsen JH, Jensen SK & Stagsted J (2002) Chicken model for studying dietary antioxidants reveals that apple (Cox's orange)/broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) stabilizes erythrocytes and reduces oxidation of insoluble muscle proteins and lipids in cooked liver. *J Agric Food Chem* 50, 5058-5062.
- Yun J, Shahidi F, Rubin LJ & Diosady LL (1987) Oxidative stability and flavor acceptability of nitrite-free meat-curing systems', *Can Inst Food Sci Technol J* 20, 246-251.
- Zakrys PI, Hogan SA, O'Sullivan MG, Allen P & Kerry JP (2008) Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Sci* 79, 648-655.
- Zakrys PI, O'Sullivan MG, Allen P & Kerry JP (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Sci* 81, 720-725.



- Zamora R & Hidalgo FJ (2005) Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 49–59.
- Zapel BJ & Csallany AS (1983) Determination of  $\alpha$ -tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 130, 146-150.
- Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, Gonzales M & Utrilla P (1991) Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med* 57, 417-419.
- Zhu BT, Ezell EL & Liehr JG (1994) Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids: metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem* 269, 292-299.
- Zigler JS & Goosey JD (1981) Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. *Photochem Photobiol* 33, 869-874.
- Zimmerman EF, Potturi RB, Resnick E & Fisher JE (1994) Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice. *Teratology* 49, 192-201.
- Ziyyat A, Leggsyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M & Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J Ethnopharmacol* 58, 45-54.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

- Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδος. 2002. Υπουργείο Οικονομικών.
- Θεριός, Ι. Ελαιοκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη, 2005, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
- Καράταγλης Σ.Σ., 1999: Φυσιολογία Φυτών (Τρίτη έκδοση). - Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη, σελ.470.
- Κυριτσάκης, Α. Κ. Ελαιόλαδο συμβατικό και βιολογικό, βρώσιμη ελιά-πάστα ελιάς, Αφοί Λ. Ακριτίδη, Ο.Ε., 2007, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
- Μπαλατσούρας Γ.Δ., 1999: Η Ελαιουργία. - Αθήνα, σελ. 409
- Μπαλατσούρας Γ.Δ. 1994. Το ελαιόδενδρο. Τόμος Ι, Αθήνα: Εκδόσεις Πελεκάνος
- Μπόσκου Δ. Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 1997
- Παπαγεωργίου Γ.Ε. Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση, Έκδοση πρώτη, Θεσσαλονίκη 2005
- Παπαγεωργίου Γ.Ε. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αντιοξειδωτική άμυνα στα βιολογικά συστήματα. Επιστημονική Επετηρίδα Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 1999α, 26(1):95-117.
- Παπαγεωργίου Γ.Ε. Λιπιδική υπεροξειδωση στα βιολογικά συστήματα. Επιστημονική

Επετηρίδα Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 1999β,26(1):185-98.

Πετρίδης Δ (2000) Εφαρμοσμένη Στατιστική, Όμηρος Εκδοτική, Θεσσαλονίκη.

Ποντίκης Κ., 2000: Ε Ειδική Δενδροκομία-Ελαιοκομία - Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιάς.

Σφακιωτάκης, Ε. Μαθήματα ελαιοκομίας. Τυρο ΜΑΝ, 1996, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.

Τρακατλλης Α. Βιοχημεία. Τόμος Β, Μέρος Α, Θεσ/νίκη 1992.

Χίου ΑΠ, Φυσικοχημεία και Βιοχημεία Τροφίμων. Σημειώσεις Φροντιστηρίου, 2003