



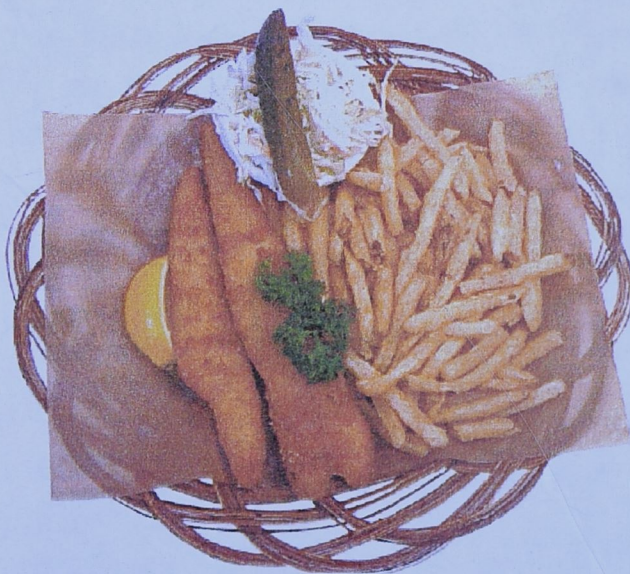
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

MARIA ΤΣΟΛΑΚΕΛΛΗ

Πτυχιακή Εργασία

Επίδραση Παραπροϊόντων Τηγανίσματος στη Δραστικότητα Παγκρεατικής Λιπάσης



Επίβλεψη

Δρ. Νικόλαος Κ. Ανδρικόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής

Δρ. Γεώργιος Δ. Μπόσκου
Π.Δ. 407/80

Δρ. Αντωνία Π. Χίου
Π.Δ. 407/80

ΑΘΗΝΑ 2002

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τίτλος	Σελίδα
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΑΣ	i
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ΑΝΟΙΓΜΑ	iv
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	viii
1. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	1
1.1 Ορισμός του οργανισμού	1
1.2 Οργανισμολογία	2
1.3 Οργανισμολογία και περιβάλλον	3
1.4 Οργανισμολογία και οικονομία	5
1.5 Οργανισμολογία και κοινωνία	7
1.6 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην υποδομή	9
1.7 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην ανάπτυξη	10
1.8 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην κοινωνία	11
1.9 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην οικονομία	12
2. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	15
2.1 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην ανάπτυξη	15
2.2 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην κοινωνία	18
2.3 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην οικονομία	20
2.4 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην κοινωνία	21
2.5 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην οικονομία	23
2.6 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην κοινωνία	24
2.7 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην οικονομία	26
2.8 Οργανισμολογία και περιβάλλον στην κοινωνία	28

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τίτλος	Σελίδα
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT	iv
ΣΚΟΠΟΣ	vi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	viii
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	1
ΤΑ ΕΛΑΙΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΑ	
1.1. Ορισμοί και είδη	1
1.1.1. Σύσταση ελαιολάδου και ηλιελαίου	3
1.2. Υποβάθμιση ελαίων	5
1.3. Μεταβολές κατά τη θερμική επεξεργασία	7
1.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την υποβάθμιση των θερμικά κατεργασμένων ελαίων	9
1.3.2. Φυσικές και χημικές μεταβολές των ελαίων κατά το τηγάνισμα	10
1.3.3. Τεχνικές τηγανίσματος	11
1.4. Δείκτες υποβάθμισης ελαίων	12
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	15
ΤΑ ΕΛΑΙΑ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	
2.1. Ο ρόλος των λιπών και ελαίων στη διατροφή	15
2.2. Πέψη των λιπών και ελαίων	19
2.2.1. Πέψη λιπών και ελαίων στο στόμαχο	20
2.2.2. Πέψη λιπών και ελαίων στο λεπτό έντερο	21
2.3. Απορρόφηση λιπών και ελαίων	23
2.4. Παγκρεατική λιπάση	24
2.5. <i>In vitro</i> μέθοδοι μέτρησης της δραστηριότητας λιπασών	26

Τίτλος	Σελίδα
2.5.1. Μέθοδος σταθερού pH (pH-stat)	27
2.5.2. Μέθοδος της μονοστιβάδας (monolayer)	30
2.5.3. Μέθοδος της σταγόνας ελαίου (oil-drop)	31
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	32
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΗΓΑΝΙΣΜΕΝΑ ΕΛΑΙΑ	
3.1. Γενικά	32
3.2. Έρευνες για την επίδραση ελαίων τηγανίσματος στη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης <i>in vitro</i>	33
3.3. Διατροφικές και μεταβολικές έρευνες σε πειραματόζωα σιτιζόμενα με θερμοοξειδωμένα έλαια	36
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	47
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4.1. Υλικά και αντιδραστήρια	47
4.2. Όργανα-Συσκευές	48
4.3. Γενικές πορείες	48
4.3.1. Εκχύλιση κλάσματος MPM	48
4.3.2. Συλλογή καθαρού MPM κλάσματος με HPLC	49
4.3.3. Μελέτες ενζυμικής δραστικότητας	50
4.3.3.1. Μέθοδος pH-stat	50
4.3.3.2. Μέθοδος HPLC	54
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	57
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
5.1. Παραλαβή του MPM από τα τηγανισμένα έλαια	57
5.2. Απομόνωση του MPM με χρωματογραφία HPLC	58
5.3. Πειράματα με παγκρεατική λιπάση	60
5.3.1. Μέθοδος pH-stat	60
5.3.2. Μέθοδος HPLC	72
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο	78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από την φοιτήτρια Τσολακέλλη Μαρία του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2001-2002 υπό την επίβλεψη του καθηγητή του τμήματος Νικολάου Κ. Ανδρικόπουλου.

Στον κύριο Ανδρικόπουλο οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ τον κύριο Γεώργιο Μπόσκου για την αξιόλογη βοήθεια και συνεργασία του στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Δρ Αντωνία Χίου, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση της τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και για τη συγγραφή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα για την πρόθυμη συνεργασία της σε κάθε αίτημά μου.

Ευχαριστώ επίσης το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και των υλικών και την παραχώρηση των οργάνων για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμο να με βοηθήσει σε ότι πρόβλημα προέκυπτε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Θέμα της παρούσης πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των παραπροϊόντων τηγανίσματος στην πέψη των ελαίων. Σκοπός της ήταν η διερεύνηση της πιθανής ανασταλτικής επίδρασης των συστατικών μετρίας πολικότητας (MPM) προερχόμενα από εμπορικά τηγανισμένα έλαια στην υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών των ελαίων από την παγκρεατική λιπάση (PL), δεδομένου ότι αυτή αποτελεί το ένζυμο κλειδί για την πέψη των λιπών.

Για τη μελέτη της επίδρασης των MPM επιλέχθηκαν δείγματα τηγανισμένων ηλιελαίων γνωστού βαθμού υποβάθμισης από εστιατόρια του νομού Αττικής. Η απομόνωση των MPM έγινε με εκχύλιση των δειγμάτων ελαίων, ενώ για την παραλαβή περισσότερο καθαρού κλάσματος MPM εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αναστροφής φάσεως (RP-HPLC) με ανιχνευτή UV-VIS.

Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε σε υποστρώματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου και ραφινέ αποκηρωμένου ηλιελαίου (SNO).

Για τη μελέτη της επίδρασης του κλάσματος των MPM εφαρμόστηκαν πειραματικές δοκιμές με PL με τη μέθοδο της «δηλητηριασμένης» μεσεπιφάνειας (μέθοδος Γ), τη μέθοδο της αναστολής κατά τη λιπόλυση (μέθοδος Β) της τεχνικής pH-stat και τη χρωματογραφική μέθοδο RP-HPLC.

Τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών των μεθόδων Β και Γ της pH-stat έδειξαν ότι το εκχυλισμένο κλάσμα των MPM προερχόμενο από τηγανισμένα ηλιέλαια προκαλεί αναστολή στη δραστηριότητα της PL τόσο για την υδρόλυση φρέσκου ηλιελαίου όσο και ελαιολάδου. Η ανασταλτική αυτή επίδραση δε φαίνεται να είναι σημαντική μετά την αύξηση της συγκέντρωσης των MPM πάνω από την τιμή 4-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ελαίου. Επιπλέον, το MPM έχει σημαντικότερη επίδραση στην υδρόλυση του SNO όταν αυτό ήταν προγαλακτωματοποιημένο με SNO (μέθοδος Γ). Επίσης διαπιστώθηκε η

υπεροχή του ελαιολάδου έναντι του ηλιελαίου ως προς την επιδεκτικότητα υδρόλυσής του από την PL παρουσία εκχυλίσματος MPM. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου έγινε με ποτενσιομετρική ογκομέτρηση των απελευθερούμενων λιπαρών οξέων (μετρήθηκε η κατανάλωση βάσης).

Η μελέτη της επίδρασης απομονωμένου με HPLC MPM με τη μέθοδο Γ της pH-stat έδειξε ότι το απομονωμένο κλάσμα δεν έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου για την υδρόλυση SNO. Δεδομένου ότι διαπιστώθηκε μια τάση οριακής μείωσης ή και οριακής αύξησης της δραστηριότητας της PL, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι τα απομονωμένα από τηγανισμένα έλαια συστατικά μετρίας πολικότητας δεν έχουν επίδραση στην πέψη των ελαίων. Η ανασταλτική επίδραση του εκχυλίσματος των MPM θα πρέπει να αποδοθεί σε άλλα συστατικά των τηγανισμένων ελαίων τα οποία παρευρίσκονταν στο εκχύλισμα των MPM.

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης του απομονωμένου κλάσματος MPM με τη μέθοδο RP-HPLC. Διαπιστώθηκε ότι αυτό δεν έχει κάποια επίδραση στη δραστηριότητα της PL για την υδρόλυση του ηλιελαίου. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PL έγινε με χρωματογραφία HPLC και χρήση ανιχνευτή UV-VIS στα 280 nm και 214 nm για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεταβολής των οξειδωμένων και κανονικών τριακυλογλυκερολών (TG) αντίστοιχα. Ειδικότερα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της υδρόλυσης των κανονικών TG του ηλιελαίου, ενώ η υδρόλυση των οξειδωμένων TG δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία του απομονωμένου κλάσματος των MPM.

Επομένως κάποια άλλα συστατικά των παραπροϊόντων τηγανίσματος και όχι τα MPM προκαλούν την παρατηρούμενη στις πειραματικές δοκιμές ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα της PL.

ABSTRACT

The subject of the present thesis has been the study of the influence of the sub products of frying in the digestion of oils. Its target was the research of the possible suppressive effect of the medium polarity materials (MPM) originated from commercial fried oils on the hydrolysis of the oils triglycerides by the pancreatic lipase (PL), since this is the key enzyme in the digestion of fats.

Samples of fried sunflower oils of known degree of degradation were selected from restaurants of the Attica region, in order to study the effect of the MPM. The isolation of the MPM took place with extraction from the oils samples while, in order to produce a clearer MPM fraction, a reversed phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) was implemented with a UV-VIS detector.

The effect of the enzyme was determined in sub layers of extra virgin olive oil and refined dewaxed sunflower oil (SNO).

In order to study the effect of the MPM fraction experimental tests with PL have been implemented with the method of "poisoned" midsurface (method C), with the method of suppression during lipolysis (method B) of the pH-stat technique and the chromatographic method RP-HPLC.

The results of the experimental tests of the methods B and C of pH-stat showed that the extracted fraction of MPM originated from fried sunflower oils causes suppression of the PL effect on the hydrolysis of fresh sunflower oil as well as of olive oil. This suppressive effect does not appear to be important after the increase of the MPM concentration above the level of 4-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of oil. Furthermore, the MPM has a more important effect in the hydrolysis of SNO when it is pre-emulsified with SNO (method C). In addition, the superiority of olive oil in comparison to sunflower oil was realized as far as it concerned its PL hydrolysis susceptibility in the presence of MPM fraction. The determination of the effect of the enzyme took place with potentiometer volumetric measurement of the released fatty acids (the base consumption was measured).

The study of the effect of HPLC isolated MPM with the C method of pH-stat showed that the isolated fraction does not have any important effect in the enzyme's activity on the SNO hydrolysis. Since a tendency of a marginal reduction and/or a marginal increase of the PL effect was evidenced, we are being led to the conclusion that the medium polarity materials that are isolated from fried oils have no effect on the digestion of oils. The suppressive effect of the MPM fraction must be attributed to other compounds of fried oils present in the MPM fraction.

The results of the study of the effect of the isolated MPM fraction with the method RP-HPLC were similar. It was realized that it has no effect on the activity of PL on the hydrolysis of sunflower oil. The determination of the PL effect took place with a HPLC chromatography and the use a UV-VIS detector in 280 nm and 214 nm for the quantitative determination of the alteration of

the oxidized and normal triglycerides (TG) respectively. More specifically a small increase in the hydrolysis of normal sunflower oil TG was observed, while the hydrolysis of the oxidized TG did not appear to be affected by the presence of the isolated MPM fraction.

Therefore some other compounds of the frying sub products and not the MPM are the cause of the observed in the experimental tests suppressive effect on PL activity.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κατά την επεξεργασία ενός ελαίου σε υψηλές θερμοκρασίες (τηγάνισμα), προκαλούνται δραστικές δομικές μεταβολές σε αυτό με αποτέλεσμα το σχηματισμό σύνθετων παραπροϊόντων τηγανίσματος, πτητικών και μη πτητικών. Από διατροφική και χημική άποψη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα μη πτητικά προϊόντα υποβάθμισης, μια και αυτά παραμένουν στο έλαιο, απορροφώνται από το τρόφιμο και στη συνέχεια καταναλώνονται. Πολλά από τα παραπροϊόντα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου. Η δυνατότητα απομόνωσης διαφόρων κλασμάτων (TPMs, PTGs) (11,12) επέτρεψε την πραγματοποίηση διατροφικών και μεταβολικών ερευνών καθώς και ερευνών μελέτης των κλασμάτων αυτών στη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης.

Πρόσφατα, όπως προαναφέρθηκε, προτάθηκε στη βιβλιογραφία η απομόνωση ενός νέου κλάσματος, του MPM, με χρήση RP-HPLC (16). Το κλάσμα των MPMs πιθανώς να περιλαμβάνει διμερή, κυκλικά και/ή αλδεϋδικά λιπαρά οξέα και κατανέμεται κατά ίσο ποσό κατά προσέγγιση στο κλάσμα των TPMs και NPMs. Δεδομένου ότι σε μακροχρόνιες διατροφικές έρευνες βρέθηκε ότι τα κυκλικά λιπαρά οξέα έχουν αρνητικές μεταβολικές και τοξικές επιδράσεις σε πειραματόζωα και ότι τα TPMs προκαλούν μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους, ενώ η ικανότητα απορρόφησης των μη πολικών θερμικών πολυμερών είναι αμφισβητούμενη (61-63), η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έχοντας ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης των MPMs στη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης.

Η εργασία στηρίχθηκε στα πειράματα που διεξήχθησαν με τη μέθοδο σταθερού pH (pH-stat) και τη μέθοδο HPLC.

Τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας ήταν παρθένο ελαιόλαδο και ηλιέλαιο από το εμπόριο και

τηγανισμένα σε φριτέζα ηλιέλαια, τα οποία είχαν συλλεχθεί από εστιατόρια και εστιατόρια ταχείας εξυπηρέτησης του νομού Αττικής (66).

Η απομόνωση του κλάσματος των MPM έγινε από τα δείγματα τηγανισμένων ηλιελαίων, στα οποία είχαν τηγανιστεί πατάτες σε φριτέζα. Η επιλογή του ηλιελαίου ως πηγή προέλευσης των MPMs έγινε διότι το ηλιέλαιο αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο έλαιο τηγανίσματος από τα καταστήματα μαζικής εστίασης και οι τηγανιτές πατάτες είναι ένα από τα δημοφιλέστερα τρόφιμα. Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα εμπορικά θερμικά κατεργασμένα έλαια συνήθως είναι αρκετά λιγότερο υποβαθμισμένα από τα έλαια που έχουν υποβαθμιστεί κάτω από πειραματικές συνθήκες, ιδιαίτερα όταν το έλαιο θερμαίνεται χωρίς να τηγανίζεται (10,64). Έτσι, η μελέτη αυτή κατευθύνθηκε σε υπολογισμούς των επιπτώσεων που μπορεί να έχει η κατανάλωση τηγανισμένων ελαίων υπό πραγματικές κατά το δυνατόν συνθήκες.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Au*s	Μονάδες απορρόφησης επί χρόνο (second)
CNO	Έλαιο ινδικής καρύδας
DCO	Απεσταγμένο κλάσμα φρέσκου καλαμποκελαίου
DG	Διακυλογλυκερόλη
DHA	Εισοσιδυοεξαενοϊκό οξύ
DOO	Αποστάζον κλάσμα φρέσκου ελαιολάδου
EPA	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
FCO	Φρέσκο καλαμποκέλαιο
FER	Πηλίο επάρκειας τροφής
FID	Ανιχνευτής ιονισμού φλογός
FOO	Φρέσκο ελαιόλαδο
FRO	Τηγανισμένο έλαιο
GSH	Γλουταθειόνη
HDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HDL-C	Χοληστερόλη στην υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HO	Θερμικά κατεργασμένο έλαιο
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
L	Λινολεϊκό οξύ
LDL-C	Χοληστερόλη στην χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LLL	Τριλινολεΐνη
Ln	Λινολενικό οξύ
LnLnLn	Τριλινολενίνη
MCT	Τριακυλογλυκερόλες με μέσο μήκος ανθρακικής αλυσίδας
MG	Μονοακυλογλυκερόλη
MPM	Παραπροϊόντα τηγανίσματος ενδιάμεσης πολικότητας
MSD	Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας
MT	Μεταλλοθειονεΐνη
OCO	Θερμικά οξειδωμένο καλαμποκέλαιο
OOL	Διελαΰλο-λινολεΐνη
OOO	Τριελαΐνη
OOO	Θερμικά οξειδωμένο ελαιόλαδο
P/S	Πολυακόρεστα/Κορεσμένα
PER	Πηλίο επάρκειας τροφής
pH-stat	Μέθοδος σταθερού pH

PLL	Παλμιτυλο-δι-λινολεΐνη
PLO	Παλμιτυλο-λινολεϋλο-Ελαΐνη
PNO	Φυστικέλαιο
POO	Παλμιτυλο-δι-ελαΐνη
PTG	Πολυμερισμένες τριακυλογλυκερόλες
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RO	Έλαιο κράμβης
RP-HPLC	HPLC αναστροφής φάσεως
SE-HPLC	HPLC Μοριακής Διήθησης
SFA	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
SNO	Ηλιέλαιο
SO	Σησαμέλαιο
SOO	Σογιέλαιο
TBARS	Ενώσεις δραστικές στο θειοβαρβιτουρικό οξύ
TG	Τριακυλογλυκερόλες
TGD	Διμερείς τριακυλογλυκερόλες
TGM	Μονομερείς τριακυλογλυκερόλες
TPMs	Ολικά πολικά συστατικά
UV-VIS	Υπεριώδες-Ορατό
VOO	Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
PL	Παγκρεατική λιπάση
HPL	Ανθρώπινη Παγκρεατική λιπάση
PPL	Χοίρεια Παγκρεατική λιπάση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΤΑ ΕΛΑΙΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1. Ορισμοί και είδη

Ως *έλαια* χαρακτηρίζονται οι εστέρες γλυκερόλης (μονο-, δι-, τριακυλογλυκερόλες) με λιπαρά οξέα φυτικής ή ζωικής προέλευσης, τα οποία περιέχουν και μικρές ποσότητες άλλων λιποειδών, όπως φωσφολιποειδή, στερόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα κ.α. και τα οποία φέρονται στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται για τη διατροφή του ανθρώπου, σύμφωνα με τις αγορανομικές διατάξεις. Τα έλαια σε θερμοκρασία δωματίου, δηλαδή στους 20 °C, είναι υγρά (1).

Ανάλογα με την προέλευσή τους διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

A) Φυτικά έλαια: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το ελαιόλαδο (ελαιόλαδο, πυρηνέλαιο) και τα σπορέλαια (αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, ηλιέλαιο, σογιέλαιο, σησαμέλαιο κ.α).

B) Ζωικά έλαια: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ιχθυέλαια, τα κητέλαια, τα ηπατέλαια και τα διάφορα παράγωγα τους (1).

Ελαιόλαδο είναι το έλαιο της ελιάς, δηλαδή του καρπού της ελιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea Europaea*) και το οποίο λαμβάνεται με μηχανικό ή άλλο φυσικό τρόπο (1). Το φυσικό ελαιόλαδο είναι ουσιαστικά το μόνο λάδι που μπορεί να καταναλωθεί όπως ακριβώς λαμβάνεται από τον καρπό (2).

Με βάση κανονισμούς της ΕΟΚ (2-3) που ισχύουν από το 1991 το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται με τους ακόλουθους τρόπους (1):

Παρθένο Ελαιόλαδο είναι το έλαιο που παράγεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικό ή άλλο φυσικό τρόπο σε συνθήκες, ιδίως από πλευράς θερμότητας, που δεν οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητάς του. Οι μόνες επεξεργασίες που έχει υποστεί το παρθένο ελαιόλαδο είναι το πλύσιμο, η σύνθλιψη, η πίεση, η φυγοκέντρωση και η διήθηση. Το παρθένο ελαιόλαδο διακρίνεται σε:

- **Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο:** Έχει αισθητηριακή κατάταξη 6,5 ή ανώτερη και περιεκτικότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων, που εκφράζονται σε ελαϊκό οξύ, κατά το μέγιστο 1%.
- **Παρθένο Ελαιόλαδο:** Έχει περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα όχι μεγαλύτερη από 2% και αισθητηριακή κατάταξη τουλάχιστον 5,5.
- **Απλό Παρθένο Ελαιόλαδο (courante):** Έχει περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα όχι μεγαλύτερη από 3,3% και αισθητηριακή κατάταξη ίση ή ανώτερη από 3,5.
- **Μειονεκτικό Παρθένο Ελαιόλαδο (lampante):** Είναι το ελαιόλαδο που δεν μπορεί να καταναλωθεί ως έχει και θα πρέπει να υποστεί εξευγενισμό. Έχει ελαττωματικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης < 3,5) ή/και οξύτητα μεγαλύτερη του 3,3%.

Εξευγενισμένο ή ραφιναρισμένο ελαιόλαδο (Refined olive oil) είναι το ελαιόλαδο που παράγεται από την επεξεργασία του παρθένου ελαιολάδου, με χημικές και φυσικές μεθόδους, έτσι ώστε να καταστεί βρώσιμο. Η οξύτητα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,3%.

Ελαιόλαδο ή γνήσιο ελαιόλαδο (olive oil) είναι το λάδι που αποτελείται από μείγμα ραφιναρισμένου και παρθένου ελαιολάδου και είναι κατάλληλο προς βρώση.

Πυρηνέλαιο (ακατέργαστο) είναι το λάδι που παράγεται από την κατεργασία των πυρήνων του καρπού της ελιάς με διαλύτες. Δεν είναι κατάλληλο προς βρώση παρά μόνο εάν υποστεί εξευγενισμό. Μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως:

- **Ραφιναρισμένο πυρηνέλαιο:** Παράγεται με ραφινάρισμα από ακατέργαστο πυρηνέλαιο και έχει οξύτητα μικρότερη από 5%.
- **Πυρηνέλαιο:** Μείγμα ραφιναρισμένου πυρηνελαίου και παρθένου ελαιολάδου κατάλληλο προς βρώση, με οξύτητα μικρότερη από 1,5%.

Σπορέλαια: Ονομάζονται με την ευρεία έννοια τα έλαια τα οποία λαμβάνονται με έκθλιψη ή με εκχύλιση των ελαιούχων καρπών και σπερμάτων διαφόρων φυτών και τα οποία διατίθενται στην κατανάλωση μετά από κατάλληλη επεξεργασία, εξευγενισμό .

Τα κυριότερα σπορέλαια που διατίθενται στο εμπόριο ως εδώδιμα είναι τα εξής:

1. **Βαμβακέλαιο:** Λαμβάνεται (15-20%) με πίεση εν θερμώ (105 °C) από τα σπέρματα των διαφόρων ειδών της βαμβακέας *Gossypium sp.*
2. **Αραβοσιτέλαιο:** Λαμβάνεται (40-50%) με πίεση ή εκχύλιση από τα φύτρα του αραβοσίτου, *Zeas mais*.
3. **Σογιέλαιο:** Λαμβάνεται (17 -18%) με έκθλιψη ή εκχύλιση από τα σπέρματα της σόγιας, *Soya Hysp*.
4. **Ηλιέλαιο:** Λαμβάνεται (30-40%) με ψυχρή πίεση από τα σπέρματα του ηλίανθου *Helianthum anuum* (1).

1.1.1. Σύσταση ελαιολάδου και ηλιελαίου

Οι τριακυλογλυκερόλες των ελαίων είναι μικτοί εστέρες της γλυκερόλης με ανώτερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα έχουν αλυσίδα 14-20 ατόμων άνθρακα και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα (1).

Η σύσταση των τριακυλογλυκερολών του κάθε ελαίου καθώς και η αναλογία της ιδιαίτερης τριακυλογλυκερόλης στο μείγμα τριακυλογλυκερολών του κάθε ελαίου είναι διαφορετική. Για παράδειγμα:

- Τα σπορέλαια περιέχουν τις τριακυλογλυκερόλες LLL και LnLnLn με διάφορους συνδυασμούς L και Ln, ενώ στο ελαιολάδο απουσιάζουν σχεδόν τελείως.
- Τα σπορέλαια περιέχουν κυρίως LLL, PLO, PLL και PPL, αλλά σε διαφορετικές αναλογίες το κάθε είδος.
- Το ελαιολάδο περιέχει κυρίως OOO, OOL, PLO, POO τα οποία περιέχονται και στα σπορέλαια αλλά με μικρότερες και διαφορετικές αναλογίες για το κάθε είδος σπορελαίου (1).

Σπορέλαια: Ονομάζονται με την ευρεία έννοια τα έλαια τα οποία λαμβάνονται με έκθλιψη ή με εκχύλιση των ελαιούχων καρπών και σπερμάτων διαφόρων φυτών και τα οποία διατίθενται στην κατανάλωση μετά από κατάλληλη επεξεργασία, εξευγενισμό .

Τα κυριότερα σπορέλαια που διατίθενται στο εμπόριο ως εδώδιμα είναι τα εξής:

1. **Βαμβακέλαιο:** Λαμβάνεται (15-20%) με πίεση εν θερμώ (105 °C) από τα σπέρματα των διαφόρων ειδών της βαμβακέας *Gossypium sp.*
2. **Αραβοσιτέλαιο:** Λαμβάνεται (40-50%) με πίεση ή εκχύλιση από τα φύτρα του αραβοσίτου, *Zeas mais*.
3. **Σογιέλαιο:** Λαμβάνεται (17 -18%) με έκθλιψη ή εκχύλιση από τα σπέρματα της σόγιας, *Soya Hysp*.
4. **Ηλιέλαιο:** Λαμβάνεται (30-40%) με ψυχρή πίεση από τα σπέρματα του ηλίανθου *Helianthum anuum* (1).

1.1.1. Σύσταση ελαιολάδου και ηλιελαίου

Οι τριακυλογλυκερόλες των ελαίων είναι μικτοί εστέρες της γλυκερόλης με ανώτερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα έχουν αλυσίδα 14-20 ατόμων άνθρακα και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα (1).

Η σύσταση των τριακυλογλυκερολών του κάθε ελαίου καθώς και η αναλογία της ιδιαίτερης τριακυλογλυκερόλης στο μείγμα τριακυλογλυκερολών του κάθε ελαίου είναι διαφορετική. Για παράδειγμα:

- Τα σπορέλαια περιέχουν τις τριακυλογλυκερόλες LLL και LnLnLn με διάφορους συνδυασμούς L και Ln, ενώ στο ελαιόλαδο απουσιάζουν σχεδόν τελείως.
- Τα σπορέλαια περιέχουν κυρίως LLL, PLO, PLL και PPL, αλλά σε διαφορετικές αναλογίες το κάθε είδος.
- Το ελαιόλαδο περιέχει κυρίως OOO, OOL, PLO, POO τα οποία περιέχονται και στα σπορέλαια αλλά με μικρότερες και διαφορετικές αναλογίες για το κάθε είδος σπορελαίου (1).

Το κύριο συστατικό του ελαιολάδου είναι οι τριακυλογλυκερόλες και κατά δεύτερο λόγο τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, στα οποία οφείλεται η φυσική οξύτητα του ελαίου, καθώς και κάποια μη γλυκεριδικά μόρια, όπως φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες κ.α. Τα τελευταία είναι σημαντικά για την σταθερότητα του ελαιολάδου κατά την οξείδωση αλλά και για τη γεύση του (4). Το κύριο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C 18:1).

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα και η αναλογία τους στο ελαιόλαδο (σε ποσοστό % κ.β. του συνόλου των λιπαρών οξέων) είναι:

Παλμιτικό οξύ (C 16:0)	7,5-20%
Παλμιτελαϊκό οξύ (C 16:1)	0,3-3,5%
Ελαϊκό οξύ (C 18:1)	0,5-5,0%
Στεαρικό οξύ (C 18:0)	55,0-83,0%
Λινελαϊκό οξύ (C 18:2)	3,5-21,0%
Άλλα	1,5-3,5%

Οι κυριότερες τριακυλογλυκερόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο είναι:

OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), PLO (5,5-7,0%), SOO (3-7%) (1,4).

Το κύριο λιπαρό οξύ του ηλιελαίου είναι το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ (18:3). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα και η αναλογία τους στο ηλιέλαιο (σε ποσοστό % κ.β. του συνόλου των λιπαρών οξέων) είναι:

Παλμιτικό οξύ (C 16:0)	3,0-10%
Στεαρικό οξύ (C 18:0)	1,0-10%
Ελαϊκό οξύ (C 18:1)	14-35%
Λινελαϊκό οξύ (C 18:2)	55-75%
Αραχιδονικό οξύ (C20:0)	<1,5%
Λινολενικό οξύ (C18:3)	<0,3%

1.2. Υποβάθμιση ελαίων

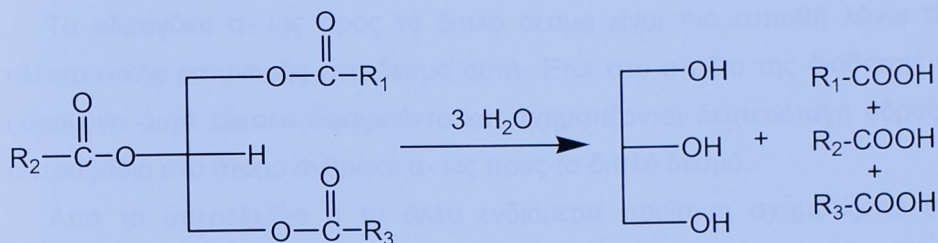
Ο συνήθης όρος που περιγράφει την υποβάθμιση των ελαίων και των λιπών είναι το τάγγισμα. Υπάρχουν δύο μορφές «τάγγισης», η υδρολυτική διάσπαση των τριακυλογλυκερολών και η αυτοοξειδωση. Η υδρολυτική διάσπαση είναι απλή υδρόλυση των ουδέτερων τριακυλογλυκερολών προς γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ η αυτοοξειδωση είναι περαιτέρω οξειδωση και διάσπαση προς προϊόντα πτητικά, δύσσοσμα και κακόγευστα. Τα τελευταία αποδεδειγμένα είναι επικίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό (5).

Οι πλέον συνήθεις χημικές αλλοιώσεις των λιπών και των ελαίων (1) οφείλονται σε παράγοντες όπως:

- i) Επίδραση του φωτός.
- ii) Επίδραση της μακροχρόνιας παραμονής πχ. κατά την αποθήκευση.
- iii) Επίδραση της θερμότητας πχ. κατά το τηγάνισμα ή το μαγείρεμα.
- iv) Επίδραση του εξευγενισμού.
- v) Επίδραση άλλων παραγόντων.

Υδρολυτικό τάγγισμα - Λιπόλυση

Η λιπόλυση γίνεται παρουσία νερού. Εντούτοις ο ρυθμός υδρόλυσης μόνο με την παρουσία υγρασίας είναι βραδύς. Η αντίδραση επιταχύνεται σημαντικά με την επεξεργασία του τροφίμου σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση αλλά και με την επίδραση ενζύμων (λιπάσες). Όταν μια λιπαρή ύλη παραμένει υπό συνθήκες που επιτρέπουν τη δράση λιπολυτικών ενζύμων, τότε λαμβάνει χώρα υδρόλυση υπό παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης μονοακυλογλυκερολών (MG) και διακυλογλυκερολών (DG) (6). Το υδρολυτικό τάγγισμα από μόνο του δεν επηρεάζει σημαντικά τη διατροφική αξία του τροφίμου γιατί η μόνη αλλαγή που επέρχεται είναι η αποδέσμευση των λιπαρών οξέων από τη γλυκερόλη. Η κύρια επίδραση είναι η δυσάρεστη γεύση που προκαλείται από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης του επηρεαζόμενου τροφίμου.



Σχήμα 1.1. Υδρόλυση τριακυλογλυκερολών.

Οξειδωτικό τάγγισμα - Αυτοοξείδωση

Αυτοοξείδωση των λιπών και ελαίων ονομάζεται η αντίδρασή τους με το οξυγόνο. Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι η οξειδωτική τάγγιση του ελαίου. Κυρίως υπεύθυνα για την οξείδωση είναι τα πολυακόρεστα οξέα του ελαίου. Αποτέλεσμα αυτής, είναι η υποβάθμιση της λιπαρής ύλης με τη μεταβολή των οργανοληπτικών ιδιοτήτων π.χ. επίδραση στην οσμή, στο χρώμα στη γεύση κ.λπ, την καταστροφή των λιπαρών οξέων και τη διεξαγωγή πολλών δευτερευουσών αντιδράσεων, με προϊόντα ανεπιθύμητα, όπως μικρού μοριακού βάρους οξέα, αλδεΐδες, κετόνες κλπ.

Ο μηχανισμός της αυτοοξείδωσης είναι αρκετά πολύπλοκος και μελετάται ακόμα. Η αυτοοξείδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που λαμβάνει χώρα με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Στο στάδιο της διάδοσης κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο και δίνει μία νέα ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα αντιδρά με άλλο μόριο κ.ο.κ. Έτσι η αντίδραση συνεχίζεται από μόνη της και θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες.

Η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στον σχηματισμό των πρώτων ελευθέρων ριζών δηλ. ομάδων με μονήρες ηλεκτρόνιο. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξείδωσης είναι τα υδροξυυπεροξειδία. Αυτά στη συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδροξυ-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με τη σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτερο ρυθμό.

Τα υδρογόνα α- ως προς το διπλό δεσμό είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονικής κατανομής στο δεσμό αυτό. Έτσι στο στάδιο της διάδοσης τα υδρογόνα αυτά εύκολα αφαιρούνται και σχηματίζονται δευτεροταγή ύδροξυ-υπεροξείδια στο άτομο άνθρακα α- ως προς το διπλό δεσμό.

Από τα υπεροξείδια ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων. Από τις ενώσεις αυτές οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και αλδεΐδες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής.

Μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προκαλούν σχηματισμό νέων ριζών και έτσι δρουν προοξειδωτικά. Επίσης η θερμοκρασία ευνοεί την αυτοοξείδωση (7).

1.3. Μεταβολές των ελαίων κατά τη θερμική επεξεργασία

Κατά τη θερμική επεξεργασία των ελαίων λαμβάνουν χώρα διάφορες, διεργασίες, όπως υδρόλυση, οξείδωση και πολυμερισμός και τα έλαια αποσυντίθενται, σχηματίζοντας πτητικά προϊόντα και μη πτητικά συστατικά.

Υδρόλυση

Καθώς το τρόφιμο τηγανίζεται στο έλαιο, το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και το νερό ξεκινούν μια σειρά αλυσωτών αντιδράσεων (8). Το νερό και ο ατμός υδρολύουν τις τριακυλογλυκερόλες παράγοντας μονοακυλογλυκερόλες και διακυλογλυκερόλες και τελικά ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η έκταση της υδρόλυσης είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας του ελαίου, της μεσεπιφάνειας μεταξύ της ελαιώδους και υδατικής φάσης και της ποσότητας του νερού και του ατμού δεδομένου ότι το νερό υδρολύει το έλαιο πιο γρήγορα από τον ατμό. Τα προϊόντα της υδρόλυσης μειώνουν τη σταθερότητα των τηγανισμένων ελαίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο/δείκτης της ζωής του τηγανισμένου ελαίου.

Οξείδωση

Κατά τη θερμική επεξεργασία, τα έλαια έρχονται σε εκτενή επαφή με το οξυγόνο καθώς προστίθεται το τρόφιμο και με αυτή τη διαδικασία εντείνεται η οξείδωση (8). Ο μηχανισμός της οξείδωσης στα θερμαθέντα έλαια είναι παρόμοιος με την αυτοοξείδωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παρόλα

αυτά κάποια ασταθή αρχικά προϊόντα οξειδωσης, όπως υδροϋπεροξειδία, αποσυντίθενται ταχέως στους 190 °C προς δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης, όπως αλδεΐδες. Αυτά τα πτητικά δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην οσμή του ελαίου.

Πολυμερισμός

Η έκθεση μιας λιπαρής ύλης σε υψηλές θερμοκρασίες όπως για παράδειγμα κατά το τηγάνισμα ή το μαγείρεμα, προκαλεί πολυμερισμό των ακόρεστων οξέων που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του ιξώδους, του μοριακού βάρους, του χρώματος και του δείκτη διάθλασης του τροφίμου (7). Πολυμερή σχηματίζονται από ελεύθερες ρίζες ή τριακυλογλυκερόλες κατά την αντίδραση Diels-Adler (8). Οι μεταβολές αυτές, που οφείλονται στο σχηματισμό εκτός των πολυμερών και άλλων ενώσεων όπως κυκλικών μονομερών, ενδομοριακών μονομερών κλπ, ελαττώνουν τη διατροφική αξία του ελαίου και επηρεάζουν την ποιότητα των τροφίμων που παρασκευάζονται μέσα σε αυτό (τηγανιτά πατατάκια, ψάρια κ.λ.π.) (7). Κυκλικά λιπαρά οξέα μπορεί να σχηματιστούν από ένα λιπαρό οξύ, διμερή σχηματίζονται μεταξύ δύο λιπαρών οξέων είτε εντός είτε μεταξύ των τριακυλογλυκερολών. Τα πολυμερή προκύπτουν καθώς αυτά τα μόρια σχηματίζουν σταυροειδείς δεσμούς.

Τα πολυμερή συστατικά του ελαίου συνίστανται από πολυμερισμένες τριακυλογλυκερόλες, τα δε πολικά παρα-προϊόντα συνίστανται από τριακυλογλυκερόλες με υδροξύλια ή υπεροξειδία ή πλευρικές αλυσίδες ή κετονομάδες κ.ά. στις αλυσίδες ατόμων C των λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών. Τα παραπροϊόντα αυτά ονομάζονται **ολικά πολικά συστατικά** (Total Polar Materials, TPM) λόγω των πολικών ομάδων που φέρουν, σε αντιδιαστολή με τις τριακυλογλυκερόλες που δεν είναι πολικές. Από πειράματα σε πειραματόζωα έχει δείχτει ότι διατροφή με μεγάλη περιεκτικότητα σε TPM προκαλεί βλάβες στην καρδιά και στο ήπαρ. Τα TPM βρίσκονται και στα μη θερμικά κατεργασμένα έλαια λόγω διαφόρων επιδράσεων επ'αυτών (φως, εξευγενισμός κ.ά.) σε ποσοστά 2-5% για το ελαιόλαδο και 5-10% για τα διάφορα είδη σπορέλαιων (1).

1.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την υποβάθμιση των θερμικά κατεργασμένων ελαίων

Η έκταση της θερμικής υποβάθμισης των ελαίων τηγανίσματος επηρεάζεται από το βαθμό ακορεστότητας των λιπαρών οξέων, τη θερμοκρασία τηγανίσματος, την επαφή με οξυγόνο, την παρουσία μετάλλων και το είδος του τροφίμου. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση, την οξείδωση, τον πολυμερισμό και γενικότερα την υποβάθμιση του τηγανισμένου ελαίου παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1. Το είδος του τροφίμου που τηγανίζεται μπορεί να επηρεάσει την τελική σύσταση του τηγανισμένου ελαίου, καθώς τρόφιμα που περιέχουν λίπη απελευθερώνουν λιπαρά οξέα. Χυλομένα τρόφιμα μπορούν να υποβαθμίσουν το τηγανισμένο έλαιο πιο γρήγορα και να μειώσουν τη σταθερότητα του συγκρινόμενα με μη χυλομένα τρόφιμα.

Συνδυασμοί τέτοιων παραγόντων υποβάθμισης καθορίζουν το ρυθμό των αντιδράσεων. Για παράδειγμα, σε μια διαδικασία τηγανίσματος ο ρυθμός της υδρόλυσης μπορεί να είναι διπλάσιος του ρυθμού της οξείδωσης, ενώ σε άλλη διαδικασία υπό διαφορετικές συνθήκες μπορεί να συμβεί το αντίθετο (8).

Πίνακας 1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την υποβάθμιση ενός ελαίου.

Έλαιο/Τρόφιμο	Διαδικασία
Ακορεστότητα λιπαρών οξέων	Θερμοκρασία ελαίου
Είδος ελαίου	Χρόνος τηγανίσματος
Είδος τροφίμου	Αερισμός/απορρόφηση O ₂
Μέταλλα σε έλαια/τρόφιμα	Εξοπλισμός τηγανίσματος
Αρχική ποιότητα του ελαίου	Συνεχές ή διακεκομμένο
Προϊόντα υποβάθμισης του ελαίου	τηγάνισμα/θέρμανση
Αντιοξειδωτικά	Ρυθμός τηγανίσματος
Αντιαφριστικά πρόσθετα	Μεταφορά θερμότητας
	Ρυθμός ανανέωσης ελαίου
	/φιλτράρισμα ελαίου/καθαρισμός
	εξοπλισμού.

1.3.2. Φυσικές και χημικές μεταβολές των ελαίων κατά το τηγάνισμα

Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος συμβαίνουν διάφορες φυσικές και χημικές μεταβολές (Πίνακας 1.2.). Για να προσδιοριστούν ποσοτικά τα προϊόντα που παράγονται κατά τις διαδικασίες υποβάθμισης, όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, καρβονυλικά συστατικά και προϊόντα υψηλού μοριακού βάρους υπάρχουν ειδικές μέθοδοι. Επίσης, μπορεί να προσδιοριστεί η ελάττωση στην ακορεστότητα, στην ποιότητα του αρώματος και στα απαραίτητα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, υποκειμενικά και με μακροσκοπική παρατήρηση προσδιορίζονται κάποιες φυσικές ποσοτικές μεταβολές στο έλαιο, όπως η αύξηση του ιξώδους, η μεταβολή του χρώματος, η αύξηση του αφρισμού, η μείωση του σημείου καπνού (8).

Στον κύκλο ζωής ενός ελαίου τηγανίσματος υπάρχουν πέντε στάδια, τα οποία αντιστοιχούν γενικά στις πέντε φάσεις της υποβάθμισης του τηγανισμένου ελαίου -σύντηξη, σχηματισμός υπεροξειδίων, αποσύνθεση υπεροξειδίων, πολυμερισμός και υποβάθμιση- οι οποίες βασίζονται σε

χημικές αντιδράσεις οι οποίες συμβαίνουν κατά το τηγάνισμα. Το πρώτο στάδιο του κύκλου ξεκινά όταν το έλαιο είναι φρέσκο και είναι γνωστό ως φάση σύντηξης. Τα έλαια σε αυτή τη φάση παρουσιάζουν ελαφρύ μαύρισμα. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης του κύκλου, η οποία είναι το στάδιο σχηματισμού υπεροξειδίων το έλαιο είναι στην πραγματικότητα στην κορυφή της παρουσίας του. Κατά τη διάρκεια της τρίτης φάσης, τα υπεροξείδια αποσυντίθενται και το έλαιο είναι χαμηλότερης ποιότητας σε σχέση με τη δεύτερη φάση. Στο τέταρτο στάδιο το έλαιο έχει ξεκινήσει να πολυμερίζεται, αφρίζει και η ποιότητά του είναι οριακή. Από τη στιγμή που ένα έλαιο φθάσει στην πέμπτη φάση, είναι σημαντικά υποβαθμισμένο και πρέπει να αντικατασταθεί.

Πίνακας 1.2. Φυσικές και χημικές μεταβολές των ελαίων κατά το τηγάνισμα.

Φυσικές μεταβολές

Αύξηση : ιξώδες, χρώμα, αφρισμός

Μείωση : σημείο καπνού

Χημικές μεταβολές

Αύξηση : ελεύθερα λιπαρά οξέα, καρβονυλικά συστατικά
προϊόντα υψηλού μοριακού βάρους

Μείωση : ακορεστότητα, ποιότητα αρώματος, απαραίτητα
λιπαρά οξέα

1.3.3. Τεχνικές τηγανίσματος

Τα έλαια θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά το ψήσιμο και το τηγάνισμα. Ωστόσο το τηγάνισμα των τροφίμων αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς διαδικασίες προετοιμασίας του φαγητού. Ο ελληνικός όρος «τηγάνισμα» περιλαμβάνει δύο διαφορετικά είδη μαγειρικής επεξεργασίας:

- Το τηγάνισμα σε τηγάνι που συνεπάγεται τη χρήση μικρής ποσότητας ελαίου που δεν καλύπτει τελείως το τρόφιμο (pan frying)

- Το τηγάνισμα σε σκεύος που επιτρέπει την πλήρη κάλυψη των τροφίμων από το έλαιο (deep frying)

Η μέση θερμοκρασία τηγανίσματος σε επαγγελματικές εγκαταστάσεις κυμαίνεται από 130-190 °C

Το τηγάνισμα σε φριτέζα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: σε αυτούς που εξαρτώνται από τις συνθήκες της ίδιας της διαδικασίας, σε αυτούς που εξαρτώνται από το είδος του ελαίου τηγανίσματος και σε αυτούς που εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των τροφίμων που πρόκειται να τηγανιστούν (9). Παρ'όλα αυτά, θα μπορούσε κανείς να ορίσει το τηγάνισμα σε φριτέζα, ως μια τεχνική, η οποία αντικαθιστά ένα κλάσμα του περιεχομένου σε νερό ενός τροφίμου με έλαιο τηγανίσματος. Προκειμένου να συμβεί αυτή η ανταλλαγή και το ζεστό έλαιο (180 °C) να εισχωρήσει στο τρόφιμο, θα πρέπει μια μετρήσιμη ποσότητα του νερού του τροφίμου να εξατμιστεί. Σε αυτή τη φάση η θερμοκρασία στο εσωτερικό του τροφίμου δεν θα πρέπει να αυξηθεί πάνω από 100 °C. Στη συνέχεια το ζεστό έλαιο σχηματίζει μια επιφανειακή κρούστα στο τρόφιμο, εμποδίζοντας την υπερβολική εισχώρηση του λίπους στο εσωτερικό του τροφίμου.

1.4. Δείκτες υποβάθμισης ελαίων

Η αναγκαιότητα προσδιορισμού και ελέγχου του βαθμού υποβάθμισης των ελαίων τηγανίσματος και κατ' επέκταση της διατροφικής τους αξίας και των επιπτώσεών τους στον ανθρώπινο οργανισμό, οδήγησε στον καθορισμό διαφόρων δεικτών υποβάθμισης ελαίων (10). Οι δείκτες αυτοί καθορίστηκαν με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις χημικές μεθόδους προσδιορισμού της υποβάθμισης ενός ελαίου και τα αγορανομικά πρότυπα. Συχνά

χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι ο δείκτης ολικών πολικών συστατικών (TPM) και ο δείκτης των πολυμερισμένων τριακυλογλυκερολών (PTG).

Ο δείκτης TPM, εκφράζει το % ποσοστό των συνολικών πολικών μη πτητικών συστατικών που παράγονται κατά την επεξεργασία του ελαίου στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος. Τα ολικά πολικά συστατικά περιλαμβάνουν πολυμερισμένα τριγλυκερίδια (PTGs) (διμερή, τριμερή και πολυμερή), ελεύθερα λιπαρά οξέα, διμερή και κυκλικά λιπαρά οξέα, μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες, οξειδωμένα λιπαρά οξέα, οξειδωμένες διακυλογλυκερόλες και οξειδωμένες μονομερείς μονοακυλογλυκερόλες. Ο δείκτης TPM είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος δείκτης για τον έλεγχο της υποβάθμισης των τηγανισμένων ελαίων και της ασφάλειας κατανάλωσής τους από τον άνθρωπο. Τα ποσοστά των TPM προσδιορίζονται με χρωματογραφία στήλης (11). Έχει βρεθεί ότι το ποσοστό των TPM είναι σχεδόν το ίδιο στα τηγανισμένα έλαια και στα τηγανισμένα τρόφιμα (12,13). Αξίζει να σημειωθεί ότι ενδέχεται έλαια με παρόμοια ποσοστά TPM, να έχουν διαφορετική κατανομή των επί μέρους συστατικών τους, λόγω διαφορετικής κατεργασίας. Γενικά οι οξειδωμένες μονομερείς τριακυλογλυκερόλες αποτελούν μέγιστο κλάσμα των μέτρια υποβαθμισμένων ελαίων, ενώ τα έντονα υποβαθμισμένα έλαια περιέχουν κυρίως διμερείς και πολυμερείς τριακυλογλυκερόλες (14).

Επίσημοι νόμοι και κανονισμοί για τον έλεγχο της ποιότητας των ελαίων κατά το τηγάνισμα έχουν υιοθετηθεί από λίγες χώρες. Ωστόσο, διάφορες άλλες χώρες με πρακτικές οδηγίες και διαδικασίες ελέγχου προσπαθούν να ελέγξουν την ποιότητα των ελαίων και των τηγανισμένων τροφίμων σε επιχειρήσεις, όπως τα εστιατόρια γρήγορου φαγητού. Οι περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες έχουν καθιερώσει κανονισμούς για τον έλεγχο των ελαίων και των τροφίμων που τηγανίζονται σε εγκαταστάσεις. Τα αγορανομικά όρια απόρριψης και αναπλήρωσης για τα TPM διαφέρουν από χώρα σε χώρα και κυμαίνονται μεταξύ 23-29% (10). Πιο πρόσφατα καθιερώθηκε το όριο 25% από τη Γαλλία και τη Γερμανία, ενώ η German Society for Fat Science έκανε συστάσεις το 2000 για την καθιέρωση του 24% ως μεγίστου ορίου για τα TPM, το οποίο θεωρήθηκε πιο κατάλληλο όριο (15).

Ο δείκτης PTG εκφράζει το % ποσοστό των πολυμερισμένων τριακυλογλυκερολών (διμερή, τριμερή και πολυμερή) που σχηματίζονται από

την έκθεση των ελαίων στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά το τηγάνισμα. Τα PTG αποτελούν κατά προσέγγιση το 50% των TPM (12).

Τα αγορανομικά όρια για τα PTGs, όπως και για τα TPMs, διαφέρουν από χώρα σε χώρα και κυμαίνονται μεταξύ 13-15% (10). Τα αγορανομικά όρια για τη Γαλλία και τη Γερμανία είναι 13%, ενώ η German Society for Fat Science πρότεινε το 2000 το 12% ως το πιο κατάλληλο όριο (15).

Πρόσφατα προτάθηκε στη βιβλιογραφία η χρήση ενός νέου κλάσματος παραπροϊόντων τηγανίσματος ως δείκτη υποβάθμισης ελαίων τηγανίσματος (16). Το κλάσμα αυτό απομονώθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αναστροφής φάσεως (RP-HPLC) και περιλαμβάνει συστατικά μέτριας πολικότητας (Medium Polarity Materials, MPM). Υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της αύξησης του κλάσματος των MPM και της αύξησης των κλασμάτων των TPM και των PTG. Συνεπώς τα MPMs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένα επιπρόσθετο κριτήριο για τον προσδιορισμό της υποβάθμισης των ελαίων τηγανίσματος.

Η φύση των MPM πιθανώς σχετίζεται με διμερή, κυκλικά και/ή αλδεϋδικά λιπαρά οξέα και βρέθηκε ότι προκύπτουν από τις τριακυλογλυκερόλες των ελαίων και όχι από τα ήσωνα συστατικά αυτών. Ο σχηματισμός των MPM είναι ανεξάρτητος του είδους του χρησιμοποιούμενου ελαίου ή λίπους τηγανίσματος και η συσσώρευσή τους λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος, ενώ η παρουσία τους σε φρέσκα έλαια είναι αμελητέα. Τα συστατικά αυτά κατανέμονται σε περίπου ίδιο ποσοστό στο κλάσμα των ολικών πολικών συστατικών (TPM) και των μη πολικών συστατικών (Non Polar Materials, NPM) (52% στο κλάσμα των TPM, 48% στο κλάσμα των NPM). Τα MPMs σχηματίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε φυτικά έλαια υψηλής ακορεστότητας και σε τηγανισμένα φυτικά τρόφιμα. Για τα MPMs δεν έχουν τεθεί ακόμα αγορανομικά όρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΤΑ ΕΛΑΙΑ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

2.1 .Ο ρόλος των λιπών και ελαίων στη διατροφή

Τα λίπη αποτελούν υποκατηγορία της μιας εκ των τεσσάρων κύριων τάξεων θρεπτικών υλών, των λιπιδίων. Στα λιπίδια εντάσσονται οι τριακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιπίδια, οι στερόλες και άλλες ενώσεις.

Η βιολογική σημασία των λιπιδίων είναι πολύ μεγάλη (17-18).

- ✧ Αποτελούν άριστη πηγή ενέργειας, αφού 1 g λίπους παρέχει χημική ενέργεια αντιστοιχούσα περίπου σε 9 kcal, δηλαδή ενέργεια διπλάσια από την παρεχόμενη από 1 g σακχάρου ή πρωτεΐνης.
- ✧ Αποτελούν το καλύτερο μέσο αποθήκευσης ενέργειας στο ζωικό βασίλειο. Η ικανότητα αποθήκευσης μεγάλης ποσότητας λίπους στο λιπώδη ιστό επιτρέπει στον οργανισμό να επιβιώσει για αρκετές εβδομάδες ή και μήνες σε περιόδους ασιτίας.
- ✧ Βοηθούν τον οργανισμό να χρησιμοποιεί άλλα θρεπτικά συστατικά αποτελεσματικά. Κατά τον καταβολισμό τους παρέχουν ενέργεια, συντελώντας στην εξοικονόμηση των πρωτεϊνών, ώστε αυτές να χρησιμοποιηθούν σε άλλες σημαντικές μεταβολικές πορείες.
- ✧ Τα αποθεματικά λίπη που υπάρχουν στον υποδόριο ιστό, προστατεύουν τον οργανισμό από απώλεια θερμότητας ή εξωτερικές μεταβολές θερμοκρασίας.
- ✧ Συγκρατούν ζωτικά όργανα και νεύρα στη θέση τους, ενώ συγχρόνως απορροφούν διάφορες μηχανικές παραμορφώσεις-πιέσεις.

- ✧ Είναι απαραίτητα για την πέψη, απορρόφηση και μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών.
- ✧ Τα διατροφικά λιποειδή μειώνουν τις γαστρικές εκκρίσεις, επιβραδύνουν τη γαστρική εκκένωση και διεγείρουν τις παγκρεατικές εκκρίσεις και την έκκριση χολής, διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία της πέψης.
- ✧ Τα φωσφολιπίδια και οι στερόλες συμμετέχουν στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών επηρεάζοντας τη σταθερότητα και τη ρευστότητά τους και συνεπώς πολλές κυτταρικές λειτουργίες.
- ✧ Ο στεροειδικός δακτύλιος της χοληστερόλης αποτελεί πρόδρομη ένωση διαφόρων ορμονών, χολικών οξέων και της βιταμίνης D.
- ✧ Συμμετέχουν αποφασιστικά στη γεύση και στο αίσθημα κορεσμού από την τροφή και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στα τρόφιμα όπως, ως γαλακτωματοποιητές, ως μέσο θέρμανσης, ως βελτιωτικά των ιδιοτήτων των τροφίμων.

Κατά συνέπεια ο ρόλος των λιποειδών στη διατροφή είναι πολύ σημαντικός.

Ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να συνθέτει λιπαρές ύλες κυρίως από υδατάνθρακες αλλά και από πρωτεΐνες και συνεπώς δεν υπάρχει κάποιο "ελάχιστο ημερήσιο απαραίτητο ποσό λαμβανόμενου λίπους", όταν η τροφή καλύπτει τις ανάγκες του οργανισμού. Παρόλα αυτά ο οργανισμός δε μπορεί να συνθέσει λιπαρά οξέα που να διαθέτουν διπλό δεσμό μετά τον C-9 στη λιπαρή ανθρακική αλυσίδα. Έτσι το λινελαϊκό (18:2, $\Delta^{9,12}$) και το λινολενικό (18:3, $\Delta^{9,12,15}$) πρέπει να προσλαμβάνονται από την τροφή και γι' αυτόν το λόγο ονομάζονται απαραίτητα λιπαρά οξέα. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα θα πρέπει να αποτελούν τουλάχιστον το 1-2 % της ημερήσιας πρόσληψης λίπους. Ανεπάρκεια αυτών των λιπαρών οξέων προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη, προβλήματα στην αναπαραγωγή, δερματικά προβλήματα, ηπατικές και νεφρικές διαταραχές, νευρολογικά προβλήματα και προβλήματα στην όραση (17).

Η συνήθης διατροφή καλύπτει τις απαιτούμενες ποσότητες σε απαραίτητα λιπαρά οξέα πολύ περισσότερο από ότι απαιτείται. Ανεπάρκειες έχουν αναφερθεί σε νεογνά και νήπια που σιτίζονταν με άπαχο γάλα και με τρόφιμα με μειωμένο λίπος ή σε ενδονοσοκομιακά νεογνά που σιτίζονταν με

φόρμουλες χωρίς πολυακόρεστα λιπαρά οξέα για μεγάλο χρονικό διάστημα (18).

Το λινελαϊκό οξύ είναι το βασικό μέλος της οικογένειας των ω -6 λιπαρών οξέων. Από το λινελαϊκό οξύ ο οργανισμός μπορεί να συνθέσει άλλα μέλη της ίδιας σειράς όπως το αραχιδονικό οξύ. Το λινολενικό οξύ είναι βασικό μέλος της σειράς των ω -3 λιπαρών οξέων, από το οποίο ο οργανισμός μπορεί να συνθέσει άλλα μέλη όπως το εικοσιπενταενοϊκό (C20:5, EPA) και το εικοσιδυσεξαενοϊκό (C22:6, DHA). Τα πολυακόρεστα αυτά ω -3 και ω -6 λιπαρά οξέα συναντώνται στα φωσφολιπιδίδη των κυτταρικών μεμβρανών και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση παρακρινικών ορμονών όπως προσταγλαδινών, θρομβοξανών, προστακυκλινών, λευκοτριενίων. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν πολύ σημαντικούς βιολογικούς ρόλους. Οι προσταγλαδίνες συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις διεργασίες, στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος, αλλά και στην αναστολή της έκκρισης γαστρικού υγρού και ως τοπική νεφρική ορμόνη διεγείροντας την έκκριση ρενίνης. Επίσης, τα πολυακόρεστα EPA και DHA είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου και πιθανώς να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και θεραπεία καρδιακών νοσημάτων, της υπέρτασης, της αρθρίτιδας και του καρκίνου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συνήθης σύγχρονη διατροφή είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα προερχόμενα από ζωικά τρόφιμα και φυτικά έλαια και περιέχει λιγότερα ω -3 λιπαρά οξέα προερχόμενα από ψάρια και λαχανικά. Έτσι το πηλίκο ω -6/ ω -3 εκτιμάται ότι είναι 8-12:1. Ανεπίσημες συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) προτείνουν ότι το πηλίκο αυτό θα πρέπει να είναι χαμηλότερο από 5-10:1 (19).

Ένα θέμα που απασχολεί τα τελευταία χρόνια τη διεθνή επιστημονική κοινότητα, είναι το κατά πόσο τα *trans*-λιπαρά οξέα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι επιβλαβή ή όχι για το οργανισμό (17). Τόσο τα *trans*-λιπαρά οξέα όσο και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκύπτουν και κατά την υδρογόνωση των φυσικών ακόρεστων λιπαρών οξέων, μια διαδικασία που βρίσκει πολλές εφαρμογές στην τεχνολογία τροφίμων. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την LDL χοληστερόλη (LDL-C) αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις. Δεν έχουν όμως όλα τα κορεσμένα λιπαρά οξέα την ίδια επίδραση στην LDL-C. Το λαυρικό, το παλμιτικό και το μυριστικό οξύ,

αυξάνουν τη χοληστερόλη του αίματος, ενώ το στεαρικό δε φαίνεται να έχει καμία επίδραση. Τα *trans*-λιπαρά οξέα, ακόμα και τα μονοακόρεστα, αυξάνουν την LDL-C και μειώνουν την HDL, όχι όμως κατά το ίδιο ποσό. Επιδημιολογικές και κλινικές έρευνες έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των διατροφικά προσλαμβανομένων *trans*-λιπαρών οξέων και του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων.

Μια άλλη πιθανή δυσμενής επίπτωση των *trans* λιπαρών οξέων στον οργανισμό είναι ότι, λόγω της παραπλήσιας στερεοχημικής δομής τους με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, έχουν την τάση να τα υποκαθιστούν στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών (18). Ως ακόρεστα όμως οξέα, είναι επιρρεπή σε οξειδώσεις, με αποτέλεσμα και οι μεμβράνες να καθίστανται πιο ευπρόσβλητες σε οξείδωση. Συγχρόνως, τα *trans* λιπαρά οξέα εμποδίζουν τη μετατροπή του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος σε άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας.

Ένα άλλο θέμα που απασχολεί τα τελευταία χρόνια τη διεθνή επιστημονική κοινότητα, είναι η σημασία των ακόρεστων λιπαρών οξέων και των λιπαρών οξέων με μέσο μήκος αλυσίδας (MCT) στη διατροφή. Τα MCT είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα με αλυσίδα 8-11 ατόμων άνθρακα (19). Τα οξέα αυτά αποδίδονται στο αίμα αμέσως χωρίς να εμπλέκονται στην ανασύσταση λιπών που λαμβάνει χώρα στα τοιχώματα του εντέρου. Στο αίμα δεσμεύονται σε πρωτεΐνες (αλβουμίνες), μεταφέρονται στο ήπαρ και από εκεί στα περιφερειακά όργανα όπου αποικοδομούνται γρήγορα παράγοντας ενέργεια. Τα συνθετικά MCT έχουν κλινική σημασία διότι χορηγούνται σε καταβολικούς ασθενείς (18).

Έχει βρεθεί ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνουν τόσο την LDL-C όσο και την HDL-C, ενώ τα μονοακόρεστα αυξάνουν την HDL-C χωρίς να ασκούν καμία επίδραση στην LDL-C, βελτιώνοντας έτσι το λιπιδαιμικό προφίλ. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ευαίσθητα στην οξείδωση και κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες σχηματίζουν πολλά πολικά προϊόντα εκ των οποίων κάποια πιστεύεται ότι είναι τοξικά για τον άνθρωπο. Αντίθετα, κατά τη θέρμανση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σχηματίζονται λιγότερα πολικά συστατικά (19).

2.2. Πέψη των λιπών και ελαίων

Η πέψη των ελαίων έχει ως σκοπό τη διάσπαση των τριακυλογλυκερολών σε απλούστερα μόρια τα οποία είναι δυνατόν να απορροφηθούν και να χρησιμοποιηθούν από το σώμα, δηλαδή σε μονογλυκερίδια, λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Για την πέψη των λιπών και ελαίων ο οργανισμός διαθέτει υδρολυτικά ένζυμα, τις λιπάσες (υδρολάσες των τριακυλογλυκερολών, EC 3.1.1.3).

Στον οργανισμό των θηλαστικών υπάρχει μια ποικιλία λιπασών με διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Στην κατηγορία των λιπασών που ευθύνονται για την πέψη των τριακυλογλυκερολών της τροφής εντάσσονται η παγκρεατική λιπάση, η γαστρική λιπάση και άλλες προδωδεκαδακτυλικές λιπάσες, η εντερική λιπάση, η ενεργοποιούμενη από χολικά άλατα λιπάση.

Η κύρια λιπάση που ευθύνεται για την πέψη των ελαίων και λιπών είναι η παγκρεατική (HPL). Η παγκρεατική λιπάση υδρολύει εστερικούς δεσμούς δι- και τριγλυκεριδίων για την παραγωγή μονογλυκεριδίων και λιπαρών οξέων, τα οποία απορροφώνται από το έντερο με τη μορφή μικτών μικυλλίων με χολικά άλατα. Σε αντίθεση με τα περισσότερα παγκρεατικά ένζυμα που εκκρίνονται με τη μορφή προενζύμου και ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση στο λεπτό έντερο, η παγκρεατική λιπάση εκκρίνεται ως ενεργό ένζυμο (20).

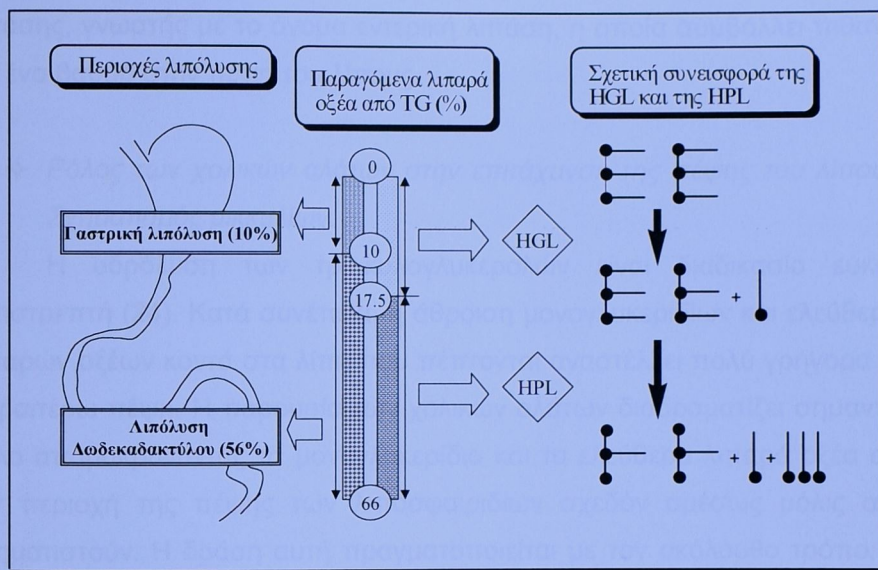
Το 1901 ο Volhard (21) ανακοίνωσε ότι στο γαστρικό υγρό υπάρχει μια «μαγιά», η γαστρική λιπάση, η οποία ευθύνεται για την υδρόλυση του λίπους. Στη συνέχεια, οι Hull και Keaton (22) πρότειναν την παρουσία λιπάσης στο γαστρικό υγρό σκύλου. Στα στοιχεία αυτά δε δόθηκε ιδιαίτερη σημασία και για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι η υδρόλυση των λιπών γίνεται αποκλειστικά στο έντερο και ότι το μοναδικό ένζυμο που ευθύνεται γι' αυτό είναι η παγκρεατική λιπάση. Σύμφωνα με την άποψη αυτή τα λίπη επιπλέουν σαν στρώμα πάνω από τα άλλα συστατικά της τροφής, το στομάχι περιορίζεται στο να ανακατεύει τα λιπίδια με τα άλλα συστατικά, ενώ μια ελάχιστη ποσότητα λίπους διασπάται με την επίδραση του υδροχλωρικού οξέος. Η εδραίωση της θέσης της γαστρικής λιπάσης ήλθε αναγκαστικά, όταν ο φυσιολογικός ρόλος της προδωδεκαδακτυλικής λιπόλυσης αποδείχθηκε έμμεσα σε ορισμένες περιπτώσεις ανεπάρκειας παγκρεατικής λιπάσης. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρήθηκε κάποια απορρόφηση τριακυλογλυκερολών από τον οργανισμό

και αυτό αποδόθηκε στη δράση των προδωδεκαδακτυλικών λιπασών. Προδωδεκαδακτυλικές λιπάσες έχουν βρεθεί σε διάφορα όργανα θηλαστικών. Ανάλογα με το είδος του θηλαστικού η δράση προδωδεκαδακτυλικής λιπάσης επικεντρώνεται κυρίως σε έναν ιστό.

2.2.1. Πέψη λιπών και ελαίων στο στομάχο

Η γαστρική λιπάση είναι το υπεύθυνο για την προδωδεκαδακτυλική λιπόλυση ένζυμο στον ανθρώπινο οργανισμό και κατά κύριο λόγο υδρολύει μέρος των μικρής αλυσίδας τριακυλογλυκερολών. Η λιπάση αυτή παίζει πρωτεύοντα ρόλο στα πρόωρα νεογνά, καθώς η έκκριση παγκρεατικής λιπάσης και χολικών αλάτων είναι πολύ χαμηλή σε αυτές τις περιπτώσεις. Φυσιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η γαστρική λιπάση (όπως και οι άλλες προδωδεκαδακτυλικές) μπορεί να δράσει όχι μόνο στο στομάχι αλλά και στο δωδεκαδάκτυλο συνεργειακά με την παγκρεατική (20,23).

Αν και οι βιοχημικές ιδιότητες των λιπασών της πέψης έχουν μελετηθεί εκτενώς, εντούτοις μόλις τη δεκαετία του '90 εκτιμήθηκε ποσοτικά ο σχετικός φυσιολογικός ρόλος της γαστρικής και παγκρεατικής λιπόλυσης. Μελέτες σε υγιείς εθελοντές επέτρεψαν τον προσδιορισμό της συνεισφοράς των γαστρικών και παγκρεατικών λιπασών στην ολική λιπόλυση των τριγλυκεριδίων (23). Για την απορρόφηση των τριακυλογλυκερολών από τον οργανισμό αρκεί αυτά να μετατραπούν σε μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα, δηλαδή αρκεί να υδρολυθούν κατά 66%. Κατά την πέψη ενός υγρού προκαθαρισμένου γεύματος, γαστρική και παγκρεατική λιπάση υδρόλυσαν 18% και 48% των τριακυλογλυκερολών του γεύματος αντίστοιχα. Η HGL υδρόλυσε το 10% των τριακυλογλυκερολών στο στομάχι. Το 48,5% της υδρόλυσης στο δωδεκαδάκτυλο οφειλόταν στην HPL και το 7,5% στην HGL. Ένας άλλος ρόλος της γαστρικής λιπάσης είναι να μεταβάλλει τη μεσεπιφάνεια λίπους/νερού αυξάνοντας τη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης στο δωδεκαδάκτυλο.



Σχήμα 2. 1. . Σχηματική αναπαράσταση της συμμετοχής της HGL, HPL στην απορρόφηση των τρυγλυκεριδίων της τροφής (25).

2.2.2. Πέψη λιπών και ελαίων στο λεπτό έντερο

✧ Γαλακτωματοποίηση του λίπους

Το πρώτο βήμα στην πέψη του λίπους στο έντερο είναι η διάσπαση των λιποσφαιριδίων σε μικρότερου μεγέθους σωματίδια ώστε τα πεπτικά ένζυμα, που δεν είναι λιποδιαλυτά, να μπορούν να επιδράσουν σε αυτά (24). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γαλακτωματοποίηση του λίπους και πραγματοποιείται παρουσία χολικών αλάτων που εκκρίνονται στη χολή από το ήπαρ. Τα χολικά άλατα έχουν το ρόλο απορρυπαντικού, ελαττώνοντας πολύ την επιφανειακή τάση του λίπους. Όταν η επιφανειακή τάση είναι μικρή, οι κινήσεις ανάμιξης στο γαστρεντερικό σωλήνα μπορούν να κατακερματίσουν βαθμιαία τα λιποσφαιρίδια, με αποτέλεσμα η ολική επιφάνεια του λίπους να διπλασιάζεται κάθε φορά που υποδιπλασιάζεται η διάμετρος των λιποσφαιριδίων.

✧ Διάσπαση του λίπους

Με την επίδραση της παγκρεατικής λιπάσης το μεγαλύτερο μέρος του λίπους διασπάται σε μονογλυκερίδια, λιπαρά οξέα και γλυκερόλη.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου περιέχουν μικρή ποσότητα λιπάσης, γνωστής με το όνομα εντερική λιπάση, η οποία συμβάλλει πιθανώς ως ένα βαθμό στην πέψη του λίπους.

✧ *Ρόλος των χολικών αλάτων στην επιτάχυνση της πέψης του λίπους - Σχηματισμός μικκυλίων.*

Η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών είναι διαδικασία εύκολα αντιστρεπτή (24). Κατά συνέπεια, η άθροιση μονογλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων κοντά στα λίπη που πέπτονται αναστέλλει πολύ γρήγορα την παραιτέρω πέψη. Η παρουσία των χολικών αλάτων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο απομακρύνοντας τα μονογλυκερίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα από την περιοχή της πέψης των λιποσφαιριδίων σχεδόν αμέσως μόλις αυτά σχηματιστούν. Η δράση αυτή πραγματοποιείται με τον ακόλουθο τρόπο: Τα χολικά άλατα έχουν την τάση να σχηματίζουν μικκύλια, δηλαδή μικρά σφαιρίδια που έχουν διάμετρο περίπου 2,5 nm και αποτελούνται από 20-50 μόρια. Τα μικκύλια σχηματίζονται επειδή το μόριο του χολικού άλατος αποτελείται από ένα στερολικό πυρήνα πολύ λιποδιαλυτό και από μια πολική ομάδα πολύ ευδιάλυτη στο νερό. Οι στερολικοί πυρήνες των 20-50 μορίων χολικών αλάτων του μικκυλίου συγκεντρώνονται σχηματίζοντας ένα μικρό λιποσφαιρίδιο στο κέντρο του μικκυλίου, ενώ οι πολικές τους ομάδες προβάλλουν προς τα έξω καλύπτοντας την επιφάνεια του μικκυλίου. Οι πολικές αυτές ομάδες επιτρέπουν σε ολόκληρο το μικκύλιο να διαλυθεί στο υδατικό περιβάλλον του πεπτικού υγρού και να παραμείνει εν διαλύσει παρά το σημαντικό του μέγεθος. Τα μονογλυκερίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που προέρχονται από τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων, αμέσως μόλις σχηματιστούν διαλύονται στη λιπαρή μοίρα των μικκυλίων, η οποία τα απομακρύνει από την περιοχή της πέψης των λιποσφαιρίων και, κατά συνέπεια, η πέψη μπορεί να συνεχιστεί ανεμπόδιστα.

Τα μικκύλια των χολικών αλάτων αποτελούν επίσης μέσο μεταφοράς των μονογλυκεριδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην ψηκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων όπου, όπως αναφέρεται παρακάτω, τα προϊόντα αυτά απορροφώνται. Όταν απελευθερώσουν τις ενώσεις αυτές στην ψηκτροειδή παρυφή, τα χολικά οξέα επιστρέφουν στον πεπτικό χυμό για να επαναχρησιμοποιηθούν στη «διαμετακομιστική» διαδικασία.

2.3. Απορρόφηση λιπών και ελαίων

Φυσιολογικά απορροφώνται καθημερινά από το λεπτό έντερο 100 ή περισσότερα γραμμάρια λίπους (24). Ωστόσο, η απορροφητική ικανότητα του εντέρου είναι πολύ μεγαλύτερη, 500-1000 g την ημέρα. Τα μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μεταφέρονται, μέσω των μικκυλίων, στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Κατά την επαφή τους με τα επιθηλιακά κύτταρα τα μόρια αυτά διαχέονται αμέσως, διαμέσου της επιθηλιακής μεμβράνης, εγκαταλείποντας τα μικκύλια των χολικών οξέων στο χυμό. Όταν υπάρχει αφθονία χολικών αλάτων, το ποσοστό του λίπους που απορροφάται είναι περίπου 97% ενώ απουσία χολικών αλάτων το ποσοστό αυτό είναι φυσιολογικά της τάξεως του 50-60%.

Ο μηχανισμός απορρόφησης των μονοακυλογλυκερολών και των λιπαρών οξέων από την ψηκτροειδή παρυφή βασίζεται στη λιπαρή τους φύση, η οποία τους επιτρέπει να «διαλυθούν» στη μεμβράνη και έτσι να γίνει διάχυση τους στο εσωτερικό του κυττάρου.

Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο πολλές μονοακυλογλυκερόλες διασπώνται παραπέρα σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα από μια λιπάση του επιθηλιακού κυττάρου. Ακολούθως, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ανασυντίθενται από το ενδοπλασματικό δίκτυο σε τριγλυκερίδια. Ολόκληρη σχεδόν η ποσότητα της γλυκερόλης που χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό συντίθεται από α-γλυκεροφωσφορικό οξύ. Στις νεοσυσταθείσες τριακυλογλυκερόλες παρουσιάζονται επίσης μικρές ποσότητες από την αρχική γλυκερόλη των μονογλυκεριδίων. Όταν σχηματιστούν οι τριακυλογλυκερόλες συναθροίζονται σε σφαιρίδια μαζί με χοληστερόλη και φωσφολιποειδή που έχουν απορροφηθεί, καθώς και με φωσφολιποειδή που έχουν μόλις συντεθεί. Στη συνέχεια κάθε σφαιρίδιο περικλείεται μέσα σε μια "πρωτεϊνική θήκη" χρησιμοποιώντας β-λιποπρωτεΐνη, την οποία επίσης συνθέτει το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η σφαιροειδής αυτή μάζα με την "πρωτεϊνική της θήκη", εξωθείται από τις πλευρές των επιθηλιακών κυττάρων και βγαίνει στους μεσοκυττάριους χώρους, απ' όπου προχωρά στο χυλοφόρο (λεμφικό) αγγείο της λάχνης. Τα σφαιρίδια αυτά ονομάζονται χυλομικρά. Η παρουσία του πρωτεϊνικού τους περιβλήματος καθιστά τα χυλομικρά υδρόφιλα, γεγονός

που εξασφαλίζει αρκετή σταθερότητα στο εναιώρημά τους μέσα στα εξωκυττάρια υγρά. Τα χυλομικρά οδεύουν προς τα κεντρικά χυλοφόρα αγγεία των λαχνών και προωθούνται από τη λεμφική αντλία στις μεγάλες φλέβες του τραχήλου.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το 95-97% του λίπους απορροφάται μέσω των λεμφικών αγγείων. Λιπαρά οξέα με 12 ή λιγότερα άτομα C μπορούν να απορροφηθούν απ'ευθείας από τα επιθηλιακά κύτταρα χωρίς να απαιτείται η παρουσία χολικών αλάτων για τον σχηματισμό μικκυλίων. Μετά την είσοδό τους στα επιθηλιακά κύτταρα, είναι δυνατόν να εισέλθουν απ'ευθείας στην πυλαία φλέβα, και στη συνέχεια να μεταφερθούν στο ήπαρ. Αυξημένη κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα, παγκρεατική ανεπάρκεια, αλλαγές των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου ή απουσία χολικών αλάτων μειώνουν την απορρόφηση των λιπών με αποτέλεσμα την εμφανή περίσσεια λίπους στα κόπρανα, μια κατάσταση που ονομάζεται στεατόρροια.

Η είσοδος λιπών στο λεπτό έντερο διεγείρει την απελευθέρωση εντερικής γαστρίνης, η οποία δρα παρεμποδίζοντας τη γαστρική εκκένωση και τις κινητικές λειτουργίες του στομάχου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή του λίπους στο στομάχο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επίσης η παρουσία λίπους και πρωτεΐνης στο λεπτό έντερο προκαλούν την έκκριση χολοκυστοκινίνης, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την έκκριση ενζύμων και χολικών αλάτων.

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A,D,E,K απορροφώνται επίσης μέσω των μικυλλίων, ενώ οι υδατοδιαλυτές τους μορφές μπορούν να απορροφηθούν απουσία χολικών αλάτων.

2.4. Παγκρεατική λιπάση

Οι παγκρεατική λιπάση συντίθεται σε παγκρεατικά κύτταρα, εκκρίνεται μέσω ρυθμιζόμενων πορειών, εισέρχεται στον παγκρεατικό αγωγό όπου αναμιγνύεται με χολικά άλατα και λιπίδια και μεταφέρεται στο δωδεκαδάκτυλο για την ολοκλήρωση της πέψης των λιπών (25).

Δομή της ανθρώπινης παγκρεατικής λιπάσης: Η ανθρώπινη παγκρεατική λιπάση (HPL) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από μία πεπτιδική αλυσίδα 449 αμινοξέων. Η μοριακή της μάζα είναι περίπου 50 kDa.

Περιλαμβάνει υδατανθρακικό τμήμα το οποίο περιέχει σε μεγάλο ποσοστό μαννόζη, *N*-συνδεδεμένο με ασπαραγίνη (26).

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της HPL (27) επιβεβαίωσε την παρουσία δυο διακριτών περιοχών στο μόριο: μιας μεγαλύτερης *N*-περιοχής που αποτελείται από τα αμινοξέα 1-336 και μιας μικρότερης *C*-περιοχής που αποτελείται από τα αμινοξέα 337-449. Η αμινοτελική περιοχή είναι μια α/β πτυχή (αναδίπλωση) υδρολάσης, η οποία κυριαρχείται από δομή β -φύλλου. Στην αμινοτελική περιοχή υπάρχουν εννέα επιμέρους περιοχές με δομή β -φύλλου, οι περισσότερες από τις οποίες βρίσκονται σε παράλληλη διάταξη. Μεταξύ των περιοχών με δομή β -φύλλου παρεμβάλλονται επτά α -έλικες ποικίλλου μήκους. Στην αμινοτελική περιοχή περιέχεται το ενεργό κέντρο, με την καταλυτική τριάδα να σχηματίζεται από τη Ser-152, Asp-176 και His-263. Αυτή η καταλυτική τριάδα είναι ανάλογη με την καταλυτική τριάδα των σερινοπρωτεασών όπως π.χ. της χυμοθρυψίνης.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται τοποθετημένο σε μια υδρόφοβη οπή και περιβάλλεται σχεδόν αποκλειστικά από μη πολικά αμινοξέα. Καλύπτεται από μία επιφανειακή "θηλιά" (surface loop ή lid, "σκέπασμα") που σχηματίζεται μεταξύ της δισουλφιδικής γέφυρας των Cys-237 και Cys-261 (27). Με αυτή την κλειστή διαμόρφωση, υπό την οποία το ένζυμο βρίσκεται κυρίως σε υδατικά διαλύματα, το "σκέπασμα" εμποδίζει το υπόστρωμα να πλησιάσει το ενεργό κέντρο. Το "σκέπασμα" σταθεροποιείται μέσω Van der Waals αλληλεπιδράσεων με δύο άλλες "θηλιές" (loops) στις οποίες έχουν δοθεί οι ονομασίες " $\beta 5$ " και " $\beta 9$ ". Προκειμένου να επιτραπεί η προσέγγιση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο το "σκέπασμα" και η "θηλιά" $\beta 5$ μετακινούνται, ενώ η "θηλιά" $\beta 9$ δεν επηρεάζεται (25).

Η *C*-τελική περιοχή έχει ως επί το πλείστον δομή β -φύλλου. Η καρβοξυτελική περιοχή είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του ενζύμου με το συμπράγοντα της λιπάσης (colipase). Ο συμπράγοντας της λιπάσης είναι μία μικρή πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπράγοντα και του *C*-τελικού τμήματος της λιπάσης σταθεροποιείται από 8 δεσμούς υδρογόνου και περίπου 80 αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Με το άνοιγμα του "σκεπάσματος" προστίθενται επιπλέον 3 δεσμοί υδρογόνου και περίπου 28 αλληλεπιδράσεις Van der Waals, γεγονός που εξηγεί τη μεγαλύτερη συγγένεια συμπράγοντα λιπάσης/λιπάσης παρουσία μιας μεσεπιφάνειας

νερού/λιπιδίου. Απουσία μεσεπιφάνειας, η σύνδεση του προδρόμου του συμπαράγοντα της λιπάσης (procolipase) δεν προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της λιπάσης. Όταν το σύμπλεγμα ενεργοποιείται σε μια μεσεπιφάνεια, το “σκέπασμα” της λιπάσης συνδέεται με το *N*-τελικό άκρο του συμπαράγοντα (28).

Δομή της παγκρεατικής λιπάσης χοίρου: Η παγκρεατική λιπάση χοίρου (PPL) απομονώθηκε για πρώτη φορά από το Verger και τους συνεργάτες του (29). Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη της οποίας η ολική πρωτοταγής δομή δημοσιεύτηκε το 1981 και παρουσιάζει 85% ομοιότητα με την πρωτοταγή δομή της HPL. Το μόριο αποτελείται από μια πεπτιδική αλυσίδα 449 αμινοξέων. Όπως και στην περίπτωση της HPL, η PPL είναι *N*-γλυκοζυλιωμένη σε ασπαραγίνη και το υδατανθρακικό τμήμα αποτελείται κυρίως από μαννόζη. Σε μικρότερο ποσοστό περιέχει επίσης φουκόζη και γαλακτόζη.

Ο συμπαράγοντας της λιπάσης (colipase) (25): Ο συμπαράγοντας της λιπάσης είναι μια μικρή επίπεδη πρωτεΐνη με μοριακή μάζα περίπου 11 kDa. Πρόκειται για μια μη-ενζυμική πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα παγκρεατικά κύτταρα υπό τη μορφή προδρόμου και ενεργοποιείται στο δωδεκαδάκτυλο με πρωτεόλυση από θρυψίνη.

Οι συμπαράγοντες λιπάσης από διάφορα είδη (ανθρώπου, χοίρου, αλόγου, σκύλου, αρουραίου, κουνελιού) έχουν παρόμοιες πρωτοταγείς δομές. Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν δύο διακριτές τοπολογικά περιοχές: μια περιοχή πλούσια σε τυροσίνη η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στη μεσεπιφάνεια και μια περιοχή υπεύθυνη για τη σύνδεση με τη λιπάση. Στο μόριο περιλαμβάνονται συνολικά πέντε δισουλφιδικές γέφυρες, οι οποίες εξασφαλίζουν σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και ανθεκτικότητα σε μετουσίωση.

Η παγκρεατική λιπάση αναστέλλεται από χολικά άλατα όταν αυτά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC). Η αναστολή οφείλεται στο γεγονός ότι η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των καλυμμένων με χολικά άλατα τριακυλογλυκερολών εμποδίζει την προσρόφηση και ενεργοποίηση της λιπάσης. Αυτή η αναστολή αναστρέφεται παρουσία του συμπαράγοντα της παγκρεατικής λιπάσης. Η παγκρεατική λιπάση συνδέεται ισχυρά με το συμπαράγοντα με

ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις σε αναλογία 1:1 και η σύνδεση επιτρέπει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων παρουσία χολικών αλάτων.

Η ικανότητα του συμπαράγοντα να διευκολύνει τη λιπόλυση οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος με τη λιπάση και στην υψηλή συγγένειά του με μεσεπιφάνειες πλούσιες σε επιφανειακά ενεργές ουσίες. Έτσι, ο πρωταρχικός ρόλος του είναι να συνδέει τη λιπάση στη μεσεπιφάνεια που περιέχει το υπόστρωμα παρουσία χολικών αλάτων και φωσfolιπιδίων. Ο συμπαράγοντας αλληλεπιδρά με το C-τελικό τμήμα της λιπάσης και με το “σκέπασμα” το οποίο βρίσκεται στο N-τελικό τμήμα της. Οι δεσμοί αυτοί του συμπαράγοντα με το “σκέπασμα” βοηθούν στη σταθεροποίηση του ενζύμου στην ανοιχτή δομή.

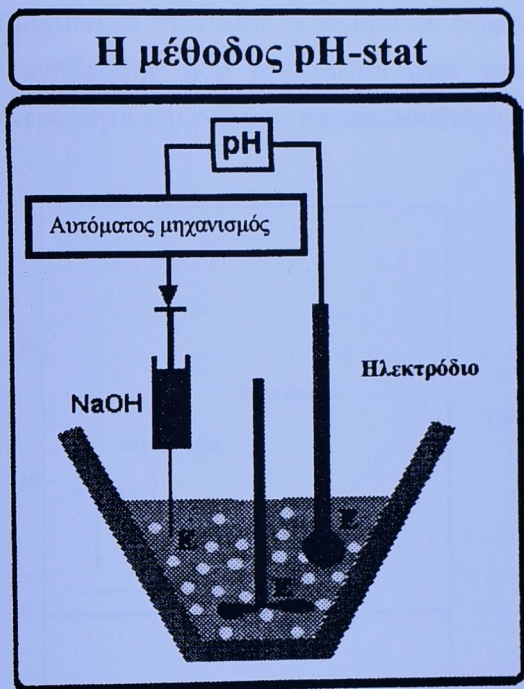
2.5. *In vitro* μέθοδοι μέτρησης της δραστικότητας λιπασών

Λαμβάνοντας υπ’όψιν τα όσα αναφέρθηκαν, είναι προφανές ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την πέψη και απορρόφηση των λιπών και ελαίων είναι η υδρόλυσή τους από τις λιπάσες της πέψης. Αναστολή της δράσεως των ενζύμων αυτών συνεπάγεται αδυναμία απορρόφησης των λιπών με αποτέλεσμα μια σειρά δυσμενών επιπτώσεων για τον οργανισμό. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως π.χ. σε περιπτώσεις πασχόντων από παχυσαρκία, η αναστολή των λιπασών της πέψης μπορεί να καταστεί διεργασία επιθυμητή, καθώς συμβάλλει στη μείωση του σωματικού βάρους. Σε κάθε περίπτωση η δυνατότητα μέτρησης της δραστικότητας των λιπασών παρουσιάζει σημαντικό διατροφικό ενδιαφέρον.

Για την *in vitro* μελέτη της δραστικότητας των λιπασών έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι, οι κυριότερες των οποίων αναφέρονται στη συνέχεια (25).

2.5.1. Μέθοδος σταθερού pH (*pH-stat*)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αυτόματη ογκομέτρηση των απελευθερούμενων λιπαρών οξέων, κατά τη δράση του ενζύμου στο υπόστρωμα και επιτυγχάνεται με ποτενσιομετρική παρακολούθηση της αντίδρασης. Η πειραματική διάταξη της μεθόδου φαίνεται στο σχήμα 2.2. .



Σχήμα 2.2 . Πειραματική διάταξη για τη μέθοδο pH-stat (25).

Η μελέτη της αναστολής των λιπασών με την τεχνική pH-stat μπορεί να γίνει με τρεις μεθόδους, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σειρά προσθήκης λιπάσης, υποστρώματος και αναστολέα (Σχήμα 2.3.):

Μέθοδος Α : Προεπιώση της λιπάσης με τον αναστολέα.

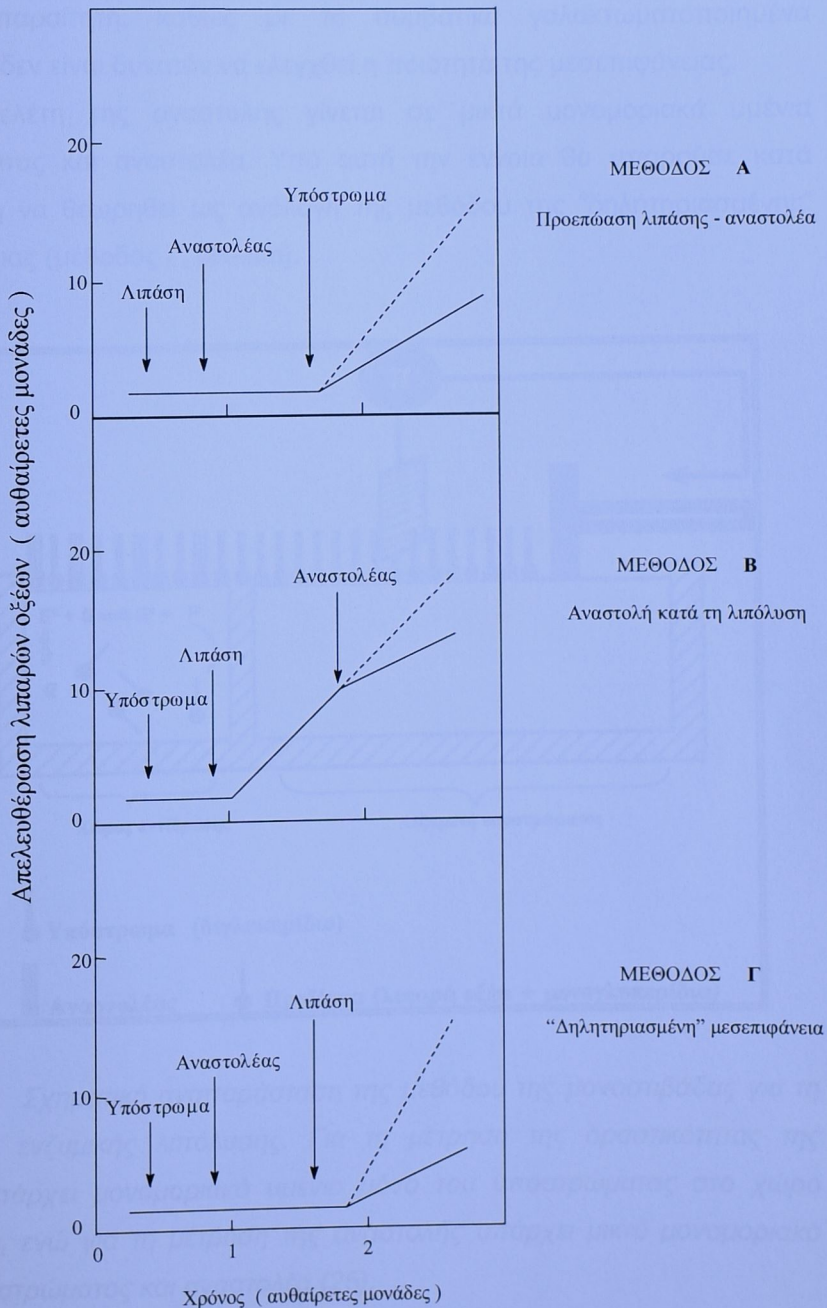
Με τη μέθοδο αυτή μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις λιπάσης και αναστολέα σε υδατικό μέσο απουσία υποστρώματος. Η παραμένουσα δραστηριότητα της λιπάσης μετράται ξεχωριστά, με τη βοήθεια γαλακτωματοποιημένου υποστρώματος.

Μέθοδος Β : Αναστολή κατά τη λιπόλυση.

Με αυτή τη μέθοδο μελετάται το κατά πόσον συμβαίνει αντίδραση αναστολής παρουσία μη υδατοδιαλυτού υποστρώματος κατά τη λιπόλυση. Το ένζυμο προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης που περιέχει γαλακτωματοποιημένο υπόστρωμα υπό ισχυρή ανάδευση. Ο αναστολέας προστίθεται λίγα λεπτά αργότερα. Η ενεργότητα της λιπάσης μετράται συνεχώς.

Μέθοδος Γ : Μέθοδος της “δηλητηριασμένης” μεσεπιφάνειας.

Ο αναστολέας προστίθεται πριν από το ένζυμο σε διάφορες συγκεντρώσεις στο μίγμα της αντίδρασης που αποτελείται από γαλακτωματοποιημένο υπόστρωμα. Η ενεργότητα του ενζύμου παρακολουθείται συνεχώς.

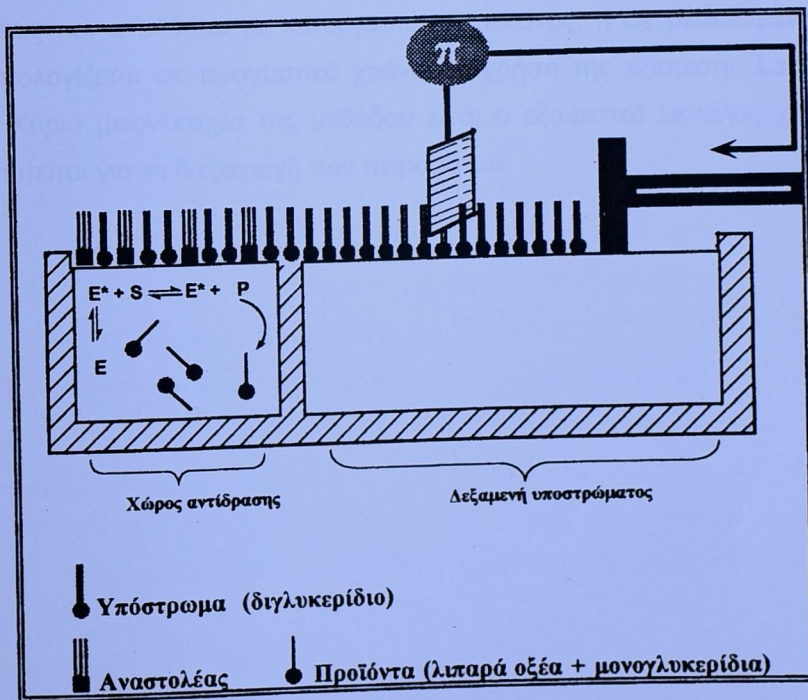


Σχήμα 2. 3. Οι τρεις μέθοδοι της pH-stat (25).

2.5.2. Μέθοδος της μονοστιβάδας (monolayer)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ελάττωση της επιφανειακής πίεσης που προκαλείται κατά την υδρόλυση του λιπιδικού υμενίου. Η εισαγωγή της μεθόδου αυτής για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηκότητας και αναστολής κρίθηκε απαραίτητη, καθώς με τα συμβατικά γαλακτωματοποιημένα συστήματα δεν είναι δυνατόν να ελεγχθεί η ποιότητα της μεσεπιφάνειας.

Η μελέτη της αναστολής γίνεται σε μικτά μονομοριακά υμένα υποστρώματος και αναστολέα. Υπό αυτή την έννοια θα μπορούσε κατά προσέγγιση να θεωρηθεί ως ανάλογη της μεθόδου της “δηλητηριασμένης” μεσεπιφάνειας (μέθοδος Γ, pH-stat).



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της μονοστιβάδας για τη μελέτη της ενζυμικής λιπόλυσης. Για τη μέτρηση της δραστηκότητας της λιπάσης υπάρχει μονομοριακό υμένιο μόνο του υποστρώματος στο χώρο αντίδρασης, ενώ για τη μέτρηση της αναστολής υπάρχει μικτό μονομοριακό υμένιο υποστρώματος και αναστολέα (25).

2.5.3. Μέθοδος της σταγόνας ελαίου (oil-drop)

Η μέθοδος της σταγόνας ελαίου είναι μια από τις πρόσφατα αναπτυχθείσες μεθόδους για τη μέτρηση της δραστικότητας των λιπασών. Βασίζεται στη μέτρηση των διαφορών της τάσης της μεσεπιφάνειας λιπιδίου/νερού σε συνάρτηση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης των τριγλυκεριδίων. Η συσσώρευση των αδιάλυτων προϊόντων της υδρόλυσης στην επιφάνεια μιας σταγόνας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση αυτής της τάσης, η οποία με τη σειρά της συσχετίζεται με αλλαγές συναρτήσεως του χρόνου στο σχήμα και το μέγεθος (προφίλ) της σταγόνας. Για τον προσδιορισμό της τάσης λαμβάνονται εικόνες της λιπιδικής σταγόνας από μετρήσεις της διαμέτρου της. Το προφίλ της σταγόνας καταγράφεται ψηφιακά αυτομάτως και αναλύεται με κατεργασία της εικόνας, η δε μεσεπιφανειακή τάση υπολογίζεται σε πραγματικό χρόνο με χρήση της εξίσωσης Laplace-Young. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο εξαιρετικά μεγάλος χρόνος που απαιτείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΗΓΑΝΙΣΜΕΝΑ ΕΛΑΙΑ

3.1. Γενικά

Το τηγάνισμα των τροφίμων είναι μια σημαντική μέθοδος προετοιμασίας του φαγητού, η οποία έχει γίνει πολύ δημοφιλής κατά τα τελευταία χρόνια, καθώς προσδίδει στα τρόφιμα επιθυμητή ευχάριστη γεύση, χρυσοκάστανο χρώμα και κριτσανιστή υφή. Παρ'όλα αυτά κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος το μέσο τηγανίσματος, το έλαιο, εκτίθεται σε παράγοντες οι οποίοι προκαλούν δραστικές δομικές μεταβολές σε αυτό. Η υγρασία του τροφίμου προκαλεί υδρολυτική υποβάθμιση, το ατμοσφαιρικό οξυγόνο που έρχεται σε επαφή με το έλαιο προκαλεί οξειδωση και η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα το τηγάνισμα επιταχύνει χημικές μεταβολές που σχετίζονται με το σχηματισμό σύνθετων προϊόντων, όπως προϊόντα οξειδωσης λιπιδίων, αναστολείς ενζύμων, καρκινογόνα και μεταλλαξιγόνα προϊόντα (30).

Πολλά από τα παραπροϊόντα τηγανίσματος μπορεί να επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία. Έρευνες σε λίπη και έλαια που προέρχονται από τηγάνισμα σε εστιατόρια ή εργαστήρια έχουν δείξει ότι αυτά τα έλαια έχουν σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε πειραματόζωα. Αντίθετα, καμία αρνητική επίδραση οφειλόμενη είτε σε τηγανισμένα τρόφιμα είτε σε διάφορα συστατικά που έχουν απομονωθεί από θερμικά κατεργασμένα έλαια δεν έχει αναφερθεί σε άλλες έρευνες. Αν και η ασφάλεια των θερμικά κατεργασμένων ελαίων μελετάται επί μακρόν και στη βιβλιογραφία υπάρχει σημαντικός αριθμός εργασιών, τα αποτελέσματα των ερευνών είναι συχνά αντικρουόμενα (1).

Μια σειρά ερευνών έχει δείξει ότι η πρόσληψη θερμικά κατεργασμένων ελαίων οδηγεί σε μειωμένη απορρόφηση λίπους, χωρίς να έχει διευκρινιστεί εάν η μειωμένη αυτή απορρόφηση οφείλεται σε ανεπαρκή ενζυμική υδρόλυση ή σε δυσκολίες απορρόφησης των πολύπλοκων λιπαρών οξέων που απελευθερώνονται από τη δράση της παγκρεατικής λιπάσης (32). Η παγκρεατική λιπάση είναι το ένζυμο κλειδί για την εντερική πέψη των λιπών της διατροφής. Υδρολύει τις μακράς αλυσίδας τριακυλογλυκερόλες σε περισσότερο πολικά κλάσματα, κυρίως μονοακυλογλυκερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία στη συνέχεια απορροφώνται (33). Το ένζυμο αυτό δείχνει εκλεκτικότητα ως προς το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, τη θέση και τη γεωμετρία των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων (34). Παρόλα αυτά, λίγα είναι γνωστά για την κινητική συμπεριφορά της παγκρεατικής λιπάσης ως προς τα θερμοοξειδωμένα ακύλια των τριγλυκεριδικών μορίων (32).

3.2. Έρευνες για την επίδραση ελαίων τηγανίσματος στη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης *in vitro*

Σε μια έρευνα που αφορούσε στην υδρόλυση τηγανισμένου φοινικελαίου και ηλιελαίου από χοίρεια παγκρεατική λιπάση, βρέθηκε ότι τα παραπροϊόντα τηγανίσματος μεγάλης πολικότητας ή μεγάλου μοριακού βάρους δεν επηρεάζουν σημαντικά την ενζυμική υδρόλυση. Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος λαμβάνουν χώρα έντονες θερμοοξειδωτικές αντιδράσεις και συνεπώς ο βαθμός πολυμερισμού των μαγειρικών ελαίων αυξάνεται. Κατά τις διαδοχικές διαδικασίες τηγανίσματος τα ολικά πολικά συστατικά (TPM) αυξάνονταν σταδιακά και στα δυο έλαια, φτάνοντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ηλιέλαιο, λόγω του μεγαλύτερου βαθμού ακορεστότητάς του (32).

Αργότερα ο Henderson και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή των τριακυλογλυκερολών οξειδωμένων ιχθυελαίων μπορούσαν να υδρολυθούν από την παγκρεατική λιπάση *in vitro* (35).

Αντίθετα, οι Yoshida και Alexander παρατήρησαν ότι υπάρχει μείωση της ενζυμικής υδρόλυσης θερμοοξειδωμένων ελαίων από την παγκρεατική λιπάση (36). Επώση για 30 λεπτά του ακατέργαστου θερμικά, φρέσκου, ελαίου με παγκρεατική λιπάση οδήγησε σε περισσότερο από 30% υδρόλυση

αυτού. Αντίθετα, οι τιμές υδρόλυσης για τα έλαια που είχαν θερμανθεί σε τρεις διαφορετικές περιόδους θέρμανσης ήταν μειωμένη (23, 18, και 13% αντίστοιχα). Ανεξαρτήτως της περιόδου θέρμανσης των ελαίων, τα μονομερή υδρολύθηκαν στον ίδιο βαθμό όπως και στο μη χρησιμοποιημένο έλαιο. Αν και τα μονομερή κλάσματα τα οποία απομονώθηκαν μετά τη θέρμανση έδειξαν αλλαγές στις χημικές τους ιδιότητες (αριθμός I_2 , αριθμός καρβονυλίου), ο βαθμός οξειδωσής τους δεν επηρέασε την υδρόλυσή τους από την παγκρεατική λιπάση. Τα κλάσματα των διμερών, τριμερών και πολυμερών τριακυλογλυκερολών υδρολύονταν λιγότερο καθώς αυξανόταν η περίοδος θέρμανσης. Μετά από 70 ώρες θέρμανσης η ολική υδρόλυση για τα διμερή ήταν περίπου 50% της υδρόλυσης των μονομερών και η υδρόλυση των τριμερών ήταν 33% της υδρόλυσης των μονομερών. Ο βαθμός υδρόλυσης για τα τριμερή και τα πολυμερή ήταν σχετικά χαμηλότερος και σχεδόν σταθερός σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Οι αλλαγές στις χημικές ιδιότητες των διμερών και τριμερών έδειξαν μεγαλύτερη ικανότητα οξειδωτικής υποβάθμισης η οποία αντανακλούσε σε μειωμένη υδρόλυση. Στα μονομερή είναι δυνατόν να υδρολύονται εύκολα οι 2 από τους 3 εστερικούς δεσμούς, ενώ στα διμερή και τριμερή οι εσωτερικές εστερικές ομάδες δεν ήταν διαθέσιμες για υδρόλυση και έτσι μόνο το μέγιστο των 2 εκτεθειμένων εστερικών ομάδων στα πρωτοταγή άτομα άνθρακα μπορούσαν να υδρολυθούν. Στα πολυμερή η μείωση των εστερικών τους δεσμών ήταν υπαρκτή. Τα πολυμερή κλάσματα ήταν περισσότερο πολικά και περιείχαν προϊόντα θερμικής διάσπασης και οξειδωσης, τα οποία μπορούσαν να απενεργοποιήσουν το ένζυμο. Για το λόγο αυτό οι πειραματικές τιμές υδρόλυσης ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες θεωρητικές που υπολογίστηκαν για τα θερμικά κατεργασμένα έλαια. Η μειωμένη υδρόλυση που παρατηρήθηκε πειραματικά αποδόθηκε στην παρουσία αναστολέων του ενζύμου στα μη διαχωρισμένα κλάσματα. Οι πειραματικές όμως τιμές, έδειξαν ότι τουλάχιστον όσον αφορά στην υδρόλυση των μονομερών δεν υπήρξε αναστολή. Η υδρόλυση των μονομερών είχε την κύρια συνεισφέρουσα συμμετοχή στη συνολική υδρόλυση του ελαίου. Η υδρόλυση των διαχωρισμένων κλασμάτων των θερμοοξειδωμένων ελαίων μειωνόταν με την αύξηση της έκθεσης στη θερμοκρασία τηγανίσματος και με την αύξηση της

πολικότητας των κλασμάτων, λόγω σχηματισμού οξειδωμένων και πολυμερισμένων προϊόντων των τριακυλογλυκερολών.

Οι ίδιοι ερευνητές σε άλλη έρευνά τους μελέτησαν την *in vitro* υδρόλυση απομονωμένων κλασμάτων TG από θερμασμένο στο εργαστήριο ηλιέλαιο, σογιέλαιο και καλαμποκέλαιο από παγκρεατική λιπάση (37). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διμερή συστατικά υδρολύονταν σημαντικά λιγότερο από τα μονομερή συστατικά που προέρχονταν από το ίδιο έλαιο και υπό τις ίδιες συνθήκες θέρμανσης. Η υδρόλυση των θερμασμένων διμερών συστατικών ήταν πιο δύσκολη από αυτή των διμερών που προέρχονταν από μη θερμασμένα έλαια. Τα απομονωμένα ολιγομερή συστατικά των θερμασμένων ελαίων υδρολύθηκαν σε μικρό ποσοστό.

Ομοίως ο Marquez-Ruiz και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η ενζυμική υδρόλυση ελαιολάδου που έχει θερμανθεί στους 180 °C εξαρτάται από το μοριακό βάρος των γλυκεριδίων και μειώνεται καθώς αυξάνει το μοριακό βάρος των προϊόντων υποβάθμισης (38). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα πολυμερή που σχηματίζονται στα τηγανισμένα έλαια έχουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Συνεπώς γαλακτώματα με υψηλότερο ποσοστό επιφανειοδραστικών συστατικών είναι πιο σταθερά και η μεσεπιφάνειά τους είναι μεγαλύτερη (39).

Με σκοπό τη μελέτη της επιδεκτικότητας σε υδρόλυση των οξειδωμένων και πολυμερισμένων TG, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος σε φριτέζα ο Marquez-Ruiz και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν χρωματογραφία TLC και SE-HPLC (40). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι οξειδωμένες μονομερείς τριακυλογλυκερόλες (TGM) είναι το είδος των διαφοροποιημένων συστατικών το οποίο υδρολύεται σε υψηλό ποσοστό.

Στην εργασία παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των μη υδρολυόμενων, μη οξειδωμένων TG και του ολικού ποσοστού των διμερών (TGD) και πολυμερισμένων (TGP) τριακυλογλυκερολών, ανεξάρτητα του είδους του τηγανισμένου ελαίου. Τα TGP παρουσίασαν χαμηλές τιμές υδρόλυσης, ειδικά σε εκείνα τα δείγματα που περιείχαν αρχικά τη μεγαλύτερη αναλογία πολυμερών. Οι τιμές υδρόλυσης των TGD ήταν σταθερά υψηλότερες των τιμών υδρόλυσης των TGP και χαμηλότερες των τιμών υδρόλυσης των οξειδωμένων TGM. Όσον

αφορά στο ρυθμό υδρόλυσης, η αναλογία των οξειδωμένων TGM μειώθηκε ραγδαία κατά τα πρώτα 2 λεπτά, ενώ τα TGD παρουσίασαν σταθερό ρυθμό υδρόλυσης σε διάστημα 20 λεπτών. Τα TGP παρουσίασαν το χαμηλότερο ρυθμό υδρόλυσης.

Υψηλές τιμές υδρόλυσης έχουν αναφερθεί και για τα TG μονοϋδροϋπεροξειδία από τον Miyashita και τους συνεργάτες του (41), οι οποίοι έδειξαν ότι η παγκρεατική λιπάση όχι μόνο δεν αδρανοποιείται από την παρουσία μονοϋδροϋπεροξειδίων αλλά και ότι η υδρόλυση λαμβάνει χώρα επιλεκτικά στα λιπαρά οξέα των μονοϋδροϋπεροξειδίων έναντι των μη οξειδωμένων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στην ίδια θέση των τριγλυκεριδίων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη πολικότητα των μονοϋδροϋπεροξειδίων και στο παρόμοιο μοριακό τους βάρος σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα τριγλυκερίδια.

Στην εργασία του Marquez-Ruiz και των συνεργατών του (40), τα οξειδωμένα TGM δεν ήταν υδροϋπεροξειδία, τα οποία είναι ιδιαίτερα ασταθή στις υψηλές θερμοκρασίες, αλλά αποτελούνταν κυρίως από άλλα οξειδωμένα συστατικά με υδροξυ-, κετο- και εποξυ- ομάδες.

3.3. Διατροφικές και μεταβολικές έρευνες σε πειραματόζωα σιτιζόμενα με θερμοοξειδωμένα έλαια

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός εργασιών που αναφέρονται σε έρευνες που αφορούν στα είδη και στις ποσότητες των τοξικών συστατικών που σχηματίζονται στα έλαια υπό συνθήκες τηγανίσματος σε φριτέζα και τις επιδράσεις αυτών σε πειραματόζωα.

Έρευνες που έγιναν κατά τη δεκαετία του '60 έδειξαν ότι πειραματόζωα που σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα έλαια παρουσίασαν μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές (44). Εξέταση των αποθηκών λίπους σε επίμυες που σιτίζονταν με οξειδωμένο σογιέλαιο, έδειξε ότι περιείχαν σχετικώς υψηλά επίπεδα οξειδωμένων λιπών. Τα λιπίδια των ιστών βρέθηκαν να περιέχουν χαμηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), γεγονός που αποδόθηκε στο μειωμένο επίπεδο λινολεϊκού οξέος στο τηγανισμένο σογιέλαιο (43).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο των ακόρεστων λιπαρών οξέων ενός ελαίου και ιδιαίτερα των πολυακόρεστων,

τόσο πιο εύκολα σχηματίζονται τοξικές ενώσεις. Επιπλέον, έρευνα σίτισης πειραματόζων με ήπια οξειδωμένα φυτικά έλαια έδειξε ότι οι πιο σοβαρές βλάβες στους ιστούς προκλήθηκαν από ακόρεστα έλαια (44).

Οι Gabriel και Alexander κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μόνο οι επίμυες, οι οποίοι σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένο ελαιόλαδο, και όχι καλαμποκέλαιο, παρουσίασαν έντονα συμπτώματα τοξικότητας (44). Συγκεκριμένα τα ζώα σιτίζονταν με ημισυνθετικές δίαιτες αποτελούμενες σε ποσοστό 15% κ. β. από απεσταγμένα κλάσματα φρέσκου ελαιολάδου (DOO) ή καλαμποκέλαιου (DCO), από απεσταγμένα κλάσματα οξειδωμένου ελαιολάδου (OOO) ή καλαμποκέλαιου (OCO) και φρέσκο ελαιόλαδο (FOO) ή καλαμποκέλαιο (FCO).

Κανένα πειραματόζωο δεν παρουσίασε μεταβολή του σωματικού βάρους και του βάρους των οργάνων που εξετάστηκαν, με εξαίρεση μια μικρή αύξηση του ήπατος σε ζώα που σιτίζονταν με OCO και DOO. Όσον αφορά στα ουδέτερα πολικά λιπίδια των οργάνων η πιο αξιοσημείωτη μεταβολή ήταν η αύξηση του αραχιδονικού οξέος στην καρδιά για το OOO, και η αύξηση του στεαρικού και αραχιδονικού οξέος στα νεφρά στις δίαιτες με OCO. Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στα λιπίδια της καρδιάς των ζώων που σιτίζονταν με OCO και OOO ενώ τα ολικά λιπίδια του ήπατος και των νεφρών δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές. Αλλαγές παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων στα πολικά λιπίδια του ήπατος. Τα επίπεδα του παλμιτικού, παλμιτελαϊκού και ελαϊκού οξέος αυξήθηκαν σημαντικά ίσως λόγω μειωμένης χρησιμοποίησής τους στο μεταβολισμό ή και αυξημένης συμμετοχής τους στο πολικό λιπιδικό κλάσμα. Αντίθετα, τα επίπεδα του στεαρικού και αραχιδονικού οξέος μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, ίσως λόγω επιλεκτικής οξειδωσής τους ή μειωμένης συμμετοχής τους στα φωσφολιπίδια. Παρά τα χαμηλά επίπεδα του λινολεϊκού οξέος στις δίαιτες με OCO, παρατηρήθηκε αύξηση του λινολεϊκού οξέος στο ήπαρ, γεγονός που πιθανολογείται ότι οφείλεται σε αναστολή της μετατροπής του λινολεϊκού σε αραχιδονικό από το OCO.

Χαμηλά επίπεδα λινολεϊκού οξέος παρουσίασαν και τα τρία όργανα των πειραματόζων που σιτίζονταν με OOO. Αυτό μπορεί να είναι το άμεσο αποτέλεσμα των πολύ χαμηλών επιπέδων του λινολεϊκού οξέος στο έλαιο αυτό. Οι υπερβολικά χαμηλές συγκεντρώσεις του λινολεϊκού οξέος στις δίαιτες

που περιείχαν ΟΟΟ μπορεί να οδήγησαν σε ανεπάρκεια στα απαραίτητα λιπαρά οξέα στα ζώα αυτά καθώς και στην αύξηση των τοξικών επιδράσεων των θερμοοξειδωμένων προϊόντων του ελαιολάδου.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έρευνα των Gabriel και Alexander δείχνουν ότι η πρόσληψη DCO και DOO δεν είχε τοξικές επιδράσεις στα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Το γεγονός ότι το ΟΟΟ ήταν περισσότερο τοξικό από το ΟCO, έρχεται σε αντίθεση με τις βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι τα θερμικά κατεργασμένα έλαια υψηλής ακορεστότητας είναι πιο επιβλαβή από τα αντίστοιχα κορεσμένα έλαια. Η αυξημένη τοξικότητα του ελαιολάδου σε σχέση με το καλαμποκέλαιο πιθανώς να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση ελαϊκού οξέος στο ελαιολάδο. Υποστηρίζεται ότι το ελαϊκό οξύ σχηματίζει τοξικά κυκλικά μονομερή τα οποία έχουν μικρότερη τάση να πολυμερίζονται από τα κυκλικά προϊόντα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Έτσι, τα κυκλικά μονομερή του ελαϊκού οξέος συσσωρεύονται στα έλαια που είναι πλούσια στο οξύ αυτό. Πολλοί ερευνητές έχουν αποδώσει την τοξικότητα των θερμοοξειδωμένων ελαίων σε κυκλικά παράγωγα. Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το καλαμποκέλαιο έχει υψηλότερη συγκέντρωση τοκοφερόλης από το ελαιολάδο, η οποία θα μπορούσε να εμποδίσει μερικώς την οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Και για τα δύο έλαια (ΟΟΟ και ΟCO) βρέθηκαν υψηλές τιμές καρβονυλίου υποδηλώνοντας εκτεταμένη υποβάθμιση. Με αέρια χρωματογραφία βρέθηκε ότι στο ΟCO υπήρχε μείωση της συγκέντρωσης λινολεϊκού οξέος κατά 99%. Παρόμοια δραματική μείωση στο λινολεϊκό οξύ παρουσίασε το ΟΟΟ, στο οποίο η συγκέντρωση του λινολεϊκού οξέος μειώθηκε σε ίχνη.

Ο Narasimhamurthy και οι συνεργάτες του στην προσπάθεια να ερευνήσουν τις μακροχρόνιες επιδράσεις των θερμασμένων (HO) και τηγανισμένων (FRO) ελαίων στην ανάπτυξη, στα λιπίδια, στις λιποπρωτεΐνες και στην κατανομή των λιπαρών οξέων στους ιστούς χρησιμοποίησαν τρία διαφορετικά συχνά χρησιμοποιούμενα φυτικά έλαια με διαφορετική σύσταση σε λιπαρά οξέα: σησαμέλαιο (SO) φυσικέλαιο (PNO) και έλαιο ινδικής καρύδας (CNO) (31). Τα έλαια αυτά δόθηκαν σε επίμυες σε ποσοστό 5 ή 20% της συνολικής ενεργειακής τους πρόσληψης για 20 εβδομάδες.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των ζώων που παρατηρήθηκε κατά τη διατροφή τους με θερμασμένα και τηγανισμένα έλαια ήταν συγκρίσιμος με αυτόν της ομάδας ελέγχου. Μία οριακή μείωση στην αύξηση του σωματικού βάρους παρατηρήθηκε στους επίμους που σιτίζονταν με τηγανισμένο και θερμασμένο SO και CNO, η οποία πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί σε μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω της ανεπιθύμητης γεύσης και οσμής αυτής. Αυτό οδήγησε σε χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης, δυσσπορρόφηση και μείωση των λιποδιαλυτών βιταμινών. Το σχετικά χαμηλότερο πηλίκο επάρκειας τροφής (FER) που παρατηρήθηκε στα έλαια που είχαν υποστεί θέρμανση ή τηγάνισμα, αποδόθηκε στη χαμηλότερη ενεργειακή πρόσληψη.

Καμιά αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα απόλυτα και σχετικά βάρη του ήπατος στις ομάδες HO και FRO. Βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι τηγανίσματος που υιοθετήθηκαν δεν ήταν ιδιαίτερα δραστικές με αποτέλεσμα τα οξειδωμένα προϊόντα που σχηματίστηκαν στα έλαια της έρευνας να είναι πολύ λιγότερα από αυτά που υπάρχουν στα έντονα υποβαθμισμένα, εμπορικά τηγανισμένα έλαια. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η μείωση στην πρόσληψη τροφής και του ρυθμού ανάπτυξης σχετίζονται άμεσα με το βαθμό υπεροξειδωσης του χρησιμοποιημένου ελαίου (45).

Στην έρευνα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης (TC) στο πλάσμα των ομάδων που διατρέφονταν με θερμασμένα έλαια, οφειλόμενη μερικώς στα μειωμένα επίπεδα των PUFA των ελαίων αυτών σε σχέση με τα φρέσκα έλαια. Τα επίπεδα της HDL-C μειώθηκαν. Αυτό αποδόθηκε σε καταστροφή των PUFA και της βιταμίνης E. Το πηλίκο HDL-C/TC ήταν χαμηλότερο στις ομάδες που διατρέφονταν με θερμικά κατεργασμένα έλαια (SO, PNO) σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς τα φρέσκα έλαια περιέχουν υψηλά επίπεδα λινολεϊκού και λινολενικού οξέος, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν μείωση της TC του πλάσματος, συνήθως συνοδευόμενη από αύξηση της HDL-C.

Τα τριγλυκερίδια του πλάσματος ήταν σημαντικά μειωμένα στις ομάδες που διατρέφονταν με θερμασμένο SNO και CNO συγκρινόμενα με αυτά των διατρεφόμενων με θερμασμένο PNO, δείχνοντας μικρότερη διαθεσιμότητα των PUFA. Όπως υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές, το χαμηλότερο πηλίκο PUFA/SFA και η αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης μέσω των

κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) πιθανόν μειώνουν τις τριακυλογλυκερόλες στο πλάσμα.

Τα λιπαρά οξέα του πλάσματος γενικά αντανakλούν το είδος του διατροφικού λίπους που καταναλώνεται. Έτσι, στις ομάδες των διατρεφόμενων με θερμασμένα και τηγανισμένα έλαια υπήρχαν υψηλότερα επίπεδα SFA και χαμηλότερα επίπεδα λινολεϊκού οξέος ως προς τις ομάδες ελέγχου. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος στο πλάσμα δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή. Στην ομάδα των διατρεφόμενων με HO/FRO SO παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στο περιεχόμενο των SFA και μείωση των PUFA, οφειλόμενη σε μειωμένη δραστικότητα της Δ_6 ακορεσμάτωσης. Στην ομάδα των διατρεφόμενων με HO/FRO CNO τα αποτελέσματα παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα. Τα επίπεδα του λινολεϊκού οξέος ήταν σχετικά υψηλά, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι επίμυες που σιτίζονταν με χαμηλά ποσά λινολεϊκού οξέος είχαν συνηθίσει να ανταπεξέρχονται περισσότερο αποτελεσματικά στις μεταβολικές τους απαιτήσεις.

Στο ήπαρ παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης για τις ομάδες που διατρέφονταν με τηγανισμένα και θερμασμένα έλαια, πιθανώς λόγω χαμηλότερης πεπτικότητας αυτών των λιπών. Τα επίπεδα των τριακυλογλυκερολών του ήπατος ήταν αυξημένα στις HO ομάδες σε σύγκριση με τις FO ομάδες. Τα λιπαρά οξέα του ήπατος δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές από τη σίτιση με έλαια που είχαν υποστεί θέρμανση.

Η σύσταση του λιπώδους ιστού σε λιπαρά οξέα αντανakλά ιδιαίτερα τη διατροφική πρόσληψη λιπαρών οξέων. Όπως ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα λινολεϊκού οξέος ήταν χαμηλότερα στις διάφορες ομάδες HO/FRO. Στις HO ομάδες το πηλίκο PUFA/SFA ήταν χαμηλότερο υποδεικνύοντας υψηλό περιεχόμενο SFA. Το πηλίκο 16:0/18:1 ήταν φυσιολογικό και τα επίπεδα αραχιδονικού οξέος υψηλά, υποδεικνύοντας φυσιολογική δραστικότητα της επιμηκάσης και της Δ_5 ακορεσμάτωσης, αντίστοιχα. Έτσι, παρά την κατανάλωση θερμασμένων ελαίων σε υψηλά ποσοστά της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης για μεγάλο χρονικό διάστημα, τα ζώα ήταν ικανά να αντέχουν στο στρες και να χρησιμοποιούν τα διαθέσιμα απαραίτητα λιπαρά οξέα ικανοποιητικά. Τα πηλικά των διαφόρων λιπαρών οξέων ήταν

φυσιολογικά με μερικές οριακές διακυμάνσεις στις ομάδες που σιτίζονταν με τα τηγανισμένα και τα θερμασμένα έλαια.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας δεν υποδεικνύουν κάποια σημαντική αρνητική επίδραση οφειλόμενη στη σίτιση με τηγανισμένα και κατεργασμένα έλαια. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα έλαια αυτά δεν ήταν σημαντικά υποβαθμισμένα.

Ο Izaki και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν την υπεροξειδωση των λιπιδίων των ιστών σε πειραματόζωα τα οποία σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα εμπορικά έλαια κράμβης (46). Για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των αντιδρώντων με θειοβαρβιτουρικό οξύ συστατικών (TBARS). Η πρόσληψη τροφής στα πειραματόζωα που σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα έλαια ήταν μεγαλύτερη από αυτή της ομάδας ελέγχου, αλλά η αύξηση του σωματικού βάρους σε όλες τις ομάδες ήταν η ίδια. Τα επίπεδα των TBARS και της γλουταθειόνης (GSH) στο ήπαρ αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες που σιτίζονταν με έλαια που είχαν υποστεί θέρμανση. Η GSH έχει σημαντικές βιολογικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων η προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και η καταστροφή των υπεροξειδίων. Η GSH πιθανώς καταναλωνόταν από ένα δευτερογενή οξειδωτικό παράγοντα, ο οποίος παραγόταν στο ήπαρ μετά την πέψη των θερμοοξειδωμένων ελαίων και στη συνέχεια ακολουθούσε αυξημένη επανασύνθεσή της. Συνεπώς η πρόσληψη κάποιων συστατικών που βρίσκονται σε θερμοοξειδωμένα έλαια ευνοεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων του ήπατος.

Σε συμφωνία με την παραπάνω έρευνα είναι και τα αποτελέσματα της έρευνας του Kok και των συνεργατών του τα οποία δεν έδειξαν καμία αλλαγή στην αύξηση του σωματικού βάρους των πειραματόζωων που σιτίζονταν με θερμασμένα έλαια για μακρύ χρονικό διάστημα (47). Αντίθετα ο Nolen και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους σε επίμυες που σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα έλαια (48).

Ο Lopez-Varela και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι επίμυες οι οποίοι σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένο ηλιέλαιο παρουσίασαν μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους, μειωμένο πηλίκο επάρκειας πρωτεΐνης (PER) και FER σε σχέση με επίμυες οι οποίοι σιτίζονταν με φρέσκο ηλιέλαιο (49). Η αύξηση διαφόρων βιοχημικών δεικτών του ήπατος στους επίμυες που

σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα ηλιέλαια σχετίζεται με αυξημένη πέψη δυνητικά τοξικών συστατικών (διμερών και πολυμερών TG και οξειδωμένων TG).

Οι Marquez-Ruiz και Dobarganes μελέτησαν τους συντελεστές πέψης τεσσάρων κατηγοριών θερμοοξειδωμένου λινολεϊκού οξέος (50). Τα οξειδωμένα μονομερή (μη πτητικά μονομερή λιπαρά οξέα με τουλάχιστον μια ομάδα οξυγόνου) παρουσίασαν υψηλή πεπτικότητα. Εντυπωσιακά υψηλές ήταν οι τιμές πεπτικότητας των οξειδωμένων διμερών και πολυμερών, σε αντίθεση με τα μη πολικά διμερή τα οποία παρουσίασαν πολύ χαμηλές τιμές. Οι διαφορές αυτές πιθανώς να σχετίζονται με την επίδραση της πολικότητας στην απορρόφηση ενός συστατικού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε απέκκριση μη διαφοροποιημένου επισημασμένου λινολεϊκού οξέος, μολονότι δεν υπήρχε διατροφική πρόσληψη του οξέος αυτού. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι πριν την πέψη μπορεί να λαμβάνουν χώρα χημικές διαφοροποιήσεις με αποτέλεσμα το σχηματισμό λιγότερο πολύπλοκων προϊόντων τα οποία συνεισφέρουν στην αυξημένη πεπτικότητα των οξειδωμένων διμερών και πολυμερών. Για την εκτίμηση των αντιδράσεων αποπολυμερισμού που μπορεί να λαμβάνουν χώρα πριν από την πέψη διεξήχθησαν *in vitro* έρευνες, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν αύξηση του επιπέδου των οξειδωμένων μονομερών (21% κατά προσέγγιση) και μείωση του επιπέδου των πολυμερών (31% κατά προσέγγιση) παρουσία υδροχλωρικού οξέος. Συνεπώς παρόμοιες αντιδράσεις ενδέχεται να λαμβάνουν χώρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Ο Sánchez Muniz και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι οι συντελεστές πεπτικότητας των διμερών και μονομερών τριακυλογλυκερολών θερμοοξειδωμένων ελαιολάδων ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους των μη θερμασμένων ελαίων (51). Η πεπτικότητα των διμερών ήταν αρκετά υψηλή, αλλά μειωνόταν καθώς αυξανόταν η υποβάθμιση του ελαίου. Η υδρόλυση των μη οξειδωμένων τριακυλογλυκερολών αναστάλθηκε ή τουλάχιστον επιβραδύνθηκε από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων θερμοοξειδωμένων συστατικών.

Σε συμφωνία με την παραπάνω έρευνα, είναι και τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Marquez-Ruiz και Camino, οι οποίοι παρατήρησαν ότι η έκταση της *in vivo* υδρόλυσης συνδέεται στενά με την ποσότητα και τον βαθμό

υποβάθμισης του διατροφικά προσλαμβανόμενου λίπους, ιδιαίτερα για τα μη διαφοροποιημένα λιπαρά οξέα (52). Αντίθετα, στην περίπτωση των μη πολικών διμερών λιπαρών οξέων οι χαμηλές τιμές πεπτικότητας μπορεί να οφείλονται εν μέρει σε δυσκολίες κατά τη διαδικασία απορρόφησης.

Οι ίδιοι ερευνητές σε μεταγενέστερη έρευνά τους παρατήρησαν ότι οι οξειδωμένες μονομερείς τριακυλογλυκερόλες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό υδρόλυσης και τα προερχόμενα από αυτά οξειδωμένα λιπαρά οξέα απορροφώνται εύκολα από επίμυες (53).

Ο Klaus Eder μελέτησε την επίδραση μίγματος θερμικά οξειδωμένων ελαίων στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε επίμυες και ιδιαίτερα στην ακορεσματοποίηση των απαραίτητων λιπαρών οξέων (54). Η ακορεσματοποίηση των λιπαρών οξέων είναι μία σημαντική φυσιολογική μεταβολική πορεία, διότι τα λιπαρά οξέα με υψηλό βαθμό ακορεστότητας που προκύπτουν αποτελούν σημαντικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, επηρεάζοντας τις ιδιότητές τους ή δρουν σαν πρόδρομες ενώσεις των εικοσανοειδών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μείωση της ακορεσματοποίησης του λινολεϊκού και α -λινολενικού οξέος λόγω μειωμένης δραστηριότητας των Δ_6 -, Δ_5 -και Δ_4 - ακορεσματοσών. Η μειωμένη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών μπορεί να συμβαίνει αντισταθμιστικά για τη διατήρηση της ρευστότητας των μικροσωματικών μεμβρανών. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των τριακυλογλυκερολών στο πλάσμα και στο ήπαρ και της χοληστερόλης στο πλάσμα. Η μείωση των τριακυλογλυκερολών μπορεί να οφείλεται σε μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ η μείωση της χοληστερόλης στην αυξημένη απέκκριση της. Η οσμωτική ευπάθεια των ερυθροκυττάρων ήταν μειωμένη πιθανώς λόγω διαφοροποίησης της δομής των κυτταρικών τους μεμβρανών. Προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων και ιδιαίτερα οι διαλδεϋδες του μηλονικού οξέος μπορούν να αντιδράσουν με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών και με λιπίδια και να σχηματίσουν προϊόντα με σταυροειδείς δεσμούς μεταξύ των διαφόρων συστατικών των μεμβρανών, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη ακαμψία των μεμβρανών. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους του ήπατος των ζώων που σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα έλαια λόγω αυξημένου πολλαπλασιασμού του ενδοπλασματικού δικτύου. Σημαντική ήταν η μείωση

των επιπέδων τοκοφερόλης στο πλάσμα και στο ήπαρ λόγω οξειδωσης τους από υπεροξειδικές ρίζες ή λόγω μειωμένης απορρόφησής της. Τα παραπάνω συμπεράσματα δείχνουν ότι η κατανάλωση θερμοοξειδωμένων ελαίων προκαλεί διαφοροποιήσεις στο μεταβολισμό των λιπιδίων, οι οποίες όμως ενδέχεται να είναι φυσιολογικής σημασίας. Οι επιδράσεις των οξειδωμένων ελαίων στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως στην ακορεσματοποίηση των λιπαρών οξέων, μπορεί να τροποποιηθούν από διάφορους διατροφικούς παράγοντες, όπως π.χ. το είδος και η ποιότητα της προσλαμβανομένης πρωτεΐνης.

Οι Porsgaard και Zhang μελέτησαν την ικανότητα απορρόφησης από επίμυες μέτρια θερμασμένου ηλιελαίου (SNO), σογιελαίου (SOO) και ελαίου κράμβης (RO) (55). Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της λεμφικής μεταφοράς των θερμασμένων ελαίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη θερμασμένα έλαια, παρά τη μικρή αύξηση των πολυμερισμένων συστατικών των ελαίων. Η παρατήρηση αυτή δείχνει είτε ότι ακόμη και μικρή αύξηση των πολυμερών συστατικών των ελαίων εμποδίζει τη μεταφορά τους μέσω της λέμφου είτε ότι άλλα συστατικά, μη αναγνωρισμένα ακόμα, είναι η αιτία της μειωμένης μεταφοράς των ελαίων. Την υψηλότερη μείωση στη λεμφική μεταφορά παρουσίασε το θερμασμένο ηλιέλαιο και τη χαμηλότερη το θερμασμένο σογιέλαιο. Το ποσοστό των τοκοφερολών στο σογιέλαιο δεν επηρεάστηκε από τη θέρμανση. Το ηλιέλαιο αν και είχε υψηλότερα επίπεδα συνολικής τοκοφερόλης, παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα αυτής μετά τη θέρμανσή του, με αποτέλεσμα μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία, γεγονός που μπορεί να επηρέασε τη λεμφική μεταφορά του ελαίου.

Ο Stangl και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία προκαλείται από χρόνια ανεπάρκεια βιταμίνης E και από κατανάλωση θερμοοξειδωμένων ελαίων, στην παραγωγή μεταλλοθειονινών (56). Οι μεταλλοθειονίνες (MT) παράγονται από διάφορα όργανα και κυρίως από το ήπαρ και συμμετέχουν στην αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων, στην ομοιοστάσή τους και στη φάση οξείας απόκρισης. Η παραγωγή των MT διεγείρεται από διάφορα βαρέα μέταλλα (ψευδάργυρος, χαλκός, κάδμιο), μη μεταλλικά στοιχεία και από διάφορες συνθήκες όπως το οξειδωτικό στρες. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ένα πρόσθετο ρόλο των MT ως

δεσμευτές των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται στους ιστούς και κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι σε επίμυες οι οποίοι προσελάμβαναν φυσιολογικές ποσότητες διατροφικού ψευδαργύρου, η πέψη θερμοοξειδωμένου σογιελαίου μείωνε τα επίπεδα της τοκοφερόλης στο πλάσμα και στο ήπαρ, σε σύγκριση με τους επίμυες που κατανάλωναν φρέσκα έλαια, αν και η επίδραση αυτή ήταν σημαντική μόνο στις ομάδες με ανεπάρκεια σε βιταμίνη Ε. Επίσης βρέθηκε ότι χρόνια ανεπάρκεια βιταμίνης Ε αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα των ηπατικών MT, αλλά μόνο στους επίμυες που σιτίζονται με φρέσκα έλαια και όχι στους επίμυες που σιτίζονται με θερμοοξειδωμένα έλαια. Στους τελευταίους παρατηρήθηκε μείωση της σύνθεσης μεταλλοθειονινών κατά 52% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αίτια της μείωσης της σύνθεσης των MT παραμένουν άγνωστα. Πιθανώς κάποια συστατικά των θερμοοξειδωμένων ελαίων, όπως τα μονομερή κυκλικά οξέα, να έχουν κρίσιμη επίδραση στην παραγωγή MT ως απόκριση σε στρες ή στο είδος της απόκρισης. Καθώς η παραγωγή MT απαιτεί την παρουσία βαρέων μετάλλων, όπως ο ψευδάργυρος, είναι επίσης πιθανό τα θερμοοξειδωμένα έλαια να μειώνουν τη διαθεσιμότητα του ψευδαργύρου για τη σύνδεσή του με το μόριο των θειονινών.

Οι Eder και Stangl παρατήρησαν ότι πειραματόζωα τα οποία σιτίζονταν με θερμοοξειδωμένα ηλιέλαια είχαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικής και ελεύθερης θυροξίνης στο πλάσμα σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (57). Επίσης, τα πειραματόζωα που σιτίζονταν με τα θερμοοξειδωμένα έλαια είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις χοληστερόλης πλάσματος, LDL και HDL. Υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων στο πλάσμα της ολικής και ελεύθερης θυροξίνης και των συγκεντρώσεων της χοληστερόλης, προτείνοντας ότι υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών στη συγκέντρωση της θυροξίνης και στη μείωση της χοληστερόλης στο πλάσμα, στα πειραματόζωα σιτιζόμενα με θερμοοξειδωμένα έλαια. Συνεπώς τα θερμοοξειδωμένα έλαια θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω σε σχέση με τις διαταραχές του θυρεοειδούς αδένος.

Οι Marquez-Ruiz και Dobarganes παρατήρησαν ότι αυξάνεται η απέκκριση ενδογενών στερολών και ιδιαίτερα χοληστερόλης καθώς αυξάνεται η υποβάθμιση του προσλαμβανόμενου λίπους (θερμασμένου ελαιολάδου)

(58). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα ενδογενή λιπαρά οξέα. Η εξαρτώμενη από την υποβάθμιση του ελαίου απέκκριση των στερολών, μπορεί να αποδοθεί στη μειωμένη υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών και στη συνεπακόλουθη επίδρασή της στη διαλυτοποίηση της χοληστερόλης στα μικκύλια. Επίσης οι υψηλές συγκεντρώσεις των μειωμένης απορρόφησης λιπιδίων, ενδέχεται να οδήγησαν σε διαφοροποιήσεις της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας.

Σε συμφωνία με την παραπάνω έρευνα είναι τα αποτελέσματα της έρευνας του Cuesta C. και των συνεργατών του, οι οποίοι παρατήρησαν ότι σε επίμυες σιτιζόμενους με θερμοοξειδωμένο ελαιόλαδο λάμβανε χώρα ένας προσαρμοστικός μηχανισμός για την παρεμπόδιση της αύξησης της ελεύθερης χοληστερόλης του πλάσματος (59).

Ο Combe και οι συνεργάτες του μελετώντας την λεμφική απορρόφηση μη πτητικών θερμοοξειδωμένων προϊόντων ελαίων, παρατήρησαν ότι τα διάφορα επιμέρους συστατικά έχουν διαφορετικούς βαθμούς απορρόφησης (60). Στα λεμφικά λιπίδια ανακτήθηκε το 53% των ολικών οξειδωμένων μονομερών οξέων, το 4% των ολικών πολυμερισμένων οξέων και το 96% των ολικών κυκλικών μονομερών οξέων. Όσον αφορά το πολυμερισμένο κλάσμα τα μη πολικά διμερή απορροφήθηκαν κατά 1%, τα πολικά διμερή κατά 6,8% και τα πολικά ολιγομερή κατά 12%. Τα αρωματικά οξέα απορροφήθηκαν σε χαμηλότερο βαθμό (50-60%) από τα κυκλοεξενικά οξέα (91-98%).

2	Αλάτι	Ροφητικό	Αντιοξειδωτικό
3	Αλάτι	Υποδομολόγος	Αντιοξειδωτικό

Αντιοξειδωτικό

Αλάτι (Sera)

Τετραοξικό νάτριο (NaTC, Sigma)

Τρι-υδροξυμεθυλο-αμινο-μεθάνιο (THIS, Sigma)

Υδροχλωρικό οξύ 0,1000 M (Titrax, Merck)

Υδροχλωρικό οξύ 12 M (Labscan)

Χλωροφόρμιο

Χωρητικό συγκροτικό λίπος (PPL, Sigma)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Υλικά και αντιδραστήρια

✧ Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά έλαια:

A/A	Έλαιο	Ποιότητα	Προέλευση
1	Ελαιόλαδο	Extra παρθένο	Blaüel A.E.
2	Ηλιέλαιο	Ραφινέ Αποκηρωμένο	Αγροτική Α.Ε.
3	Ηλιέλαιο Τηγανισμένο	Υποβαθμισμένο	Από Εστιατόρια του ν. Αττικής (61)

✧ Αντιδραστήρια:

Αραβικό κόμμι (Serva),

Ταυροχολικό νάτριο (NaTC, Sigma),

Τρι-(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο (TRIS, Sigma),

Υδροξείδιο νατρίου 0,1000 M (Titrisol, Merck)

Υδροχλωρικό οξύ 12 M (Labscan)

Χλωριούχο ασβέστιο,

Χοίρεια παγκρεατική λιπάση (PPL, Sigma).

Η ζύγιση των δειγμάτων ελαίου και των αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκε σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και δυνατότητα ζύγισης μέχρι 100 g.

✦ Διαλύτες:

(α) Ποιότητας HPLC:

CH_3CN (Sds),

CH_3OH (Merck),

$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (Merck)

(β) Κοινοί διαλύτες:

CH_3CN (Labscan),

Et_2O (Labscan),

CHCl_3 (Labscan),

Εξάνιο (Labscan).

✦ Δις απεσταγμένο H_2O ,

✦ Απιονισμένο H_2O .

4.2. Όργανα-Συσκευές

✦ pH-Stat (720 Titrino, Metrohm) συνδεδεμένο με καταγραφέα,

✦ Λουτρό υπερήχων (Branson 2210),

✦ Συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού (EasyPure RF, Barnstead),

✦ Συσκευή περιστρεφόμενου εξατμιστήρα (Rotary Evaporator),

✦ Υγρός Χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC, HP 1050, ανιχνευτής DAD),

✦ Υδρόλουτρα σταθερής θερμοκρασίας.

✦ Vortex

✦ Ζυγός

✦ Φιάλη αερίου N_2 για την εξάτμιση διαλυτών

4.3. Γενικές πορείες

4.3.1. Εκχύλιση κλάσματος MPM

Η παραλαβή του κλάσματος των MPMs από τηγανισμένο ηλιέλαιο έγινε με εκχύλιση. Ως πηγή των MPMs χρησιμοποιήθηκαν τηγανισμένα ηλιέλαια

που ελήφθησαν από εστιατόρια και εστιατόρια ταχείας εξυπηρέτησης του νομού Αττικής (61). Τα έλαια αυτά ήταν γνωστού, υψηλού βαθμού υποβάθμισης.

Για την απομόνωση του κλάσματος των MPMs το έλαιο (41 mL) διαλύθηκε σε εξάνιο (45 mL). Ακολούθησε εκχύλιση με διάλυμα MeOH/H₂O 6/4 (85 mL×2). Η παραμένουσα στιβάδα του εξανίου εκχυλίστηκε με CH₃CN (85 mL×2). Οι στιβάδες του CH₃CN που περιείχαν το MPM κλάσμα του ελαίου συλλέχθηκαν μαζί. Ακολούθησε απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του διαλύτη. Το ξηρό δείγμα αναδιαλύθηκε σε εξάνιο (2 mL) και έγινε νέα εκχύλιση με CH₃CN (2 mL), ακολουθούμενη από εξάτμιση μέχρι ξηρού με αέριο N₂ και αναδιάλυση σε CH₃CN έως συνολικού όγκου 1 mL. Το εκχύλισμα που παραλήφθηκε περιείχε το συνολικό κλάσμα MPM του ελαίου και μικρές ποσότητες άλλων συστατικών. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες σε παγκρεατική λιπάση είτε ως έχει, είτε υπέστη HPLC χρωματογραφία για την παραλαβή καθαρού MPM κλάσματος.

4.3.2. Συλλογή καθαρού MPM κλάσματος με HPLC

Η απομόνωση του MPM έγινε με χρωματογραφία HPLC αναστρόφου φάσεως. Έγιναν ενέσεις στην HPLC και συλλέχθηκε το κλάσμα με RT 19-21 min σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 0,180 g ηλιελαίου. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και μερική εξάτμιση των διαλυτών της HPLC υπό ρεύμα αζώτου N₂ (συμπύκνωση στο ½ του όγκου). Στη συνέχεια προστέθηκε εξάνιο (1,5 mL), το μίγμα αναδεύτηκε σε vortex και μετά το διαχωρισμό των στιβάδων έγινε παραλαβή της στιβάδας του εξανίου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές. Τα οργανικά εκχυλίσματα που περιείχαν το έλαιο και το κλάσμα MPM συλλέχθηκαν μαζί και ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂. Στις περιπτώσεις που ήταν επιθυμητή μεγαλύτερη συγκέντρωση MPM στο έλαιο, στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα συλλέγονταν κατά περίπτωση περισσότερα του ενός εκλούσματα με RT 19-21 min και η εκχύλιση γινόταν με αναλόγως μεγαλύτερη ποσότητα εξανίου.

4.3.3. Μελέτες ενζυμικής δραστηριότητας

Σκοπός της μεθόδου ήταν ο προσδιορισμός της πιθανής μεταβολής της δραστηριότητας παγκρεατικής λιπάσης για την υδρόλυση υποστρωμάτων της (έλαια) εμπλουτισμένων με MPM.

4.3.3.1. Μέθοδος pH-stat

Η μέθοδος βασίζεται στην ογκομέτρηση των απελευθερούμενων λιπαρών οξέων από τη δράση της λιπάσης σε υπόστρωμά της.

(1) Παρασκευή διαλυμάτων για τη μέθοδο pH-stat.

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

(Α) **Ρυθμιστικό διάλυμα (ρδ) TRIS**: Περιελάμβανε TRIS 1 mM, CaCl_2 6 mM, NaCl 0,1 M.

TRIS (12 mg), CaCl_2 (66,6 mg) και NaCl (585 mg) διαλύθηκαν σε δις απεσταγμένο νερό (100 mL).

(Β) **Διάλυμα NaTC 15 mM**: NaTC (320 mg) διαλύθηκε σε ρδ TRIS (40 mL).

(Γ) **Διάλυμα NaCl 9‰**: NaCl (0,9 g) διαλύθηκε σε δις απεσταγμένο νερό (100 mL).

(Δ) **Διάλυμα αραβικού κόμμεος 10% w/v**: Σε αραβικό κόμμα (10 g) προστέθηκε δις απεσταγμένο νερό (100 mL). Ακολούθησε θέρμανση στους 80-90 °C για τη διάλυση και ομογενοποίηση του μίγματος και διήθηση των αδιάλυτων συστατικών εν θερμώ. Το διήθημα παρέμεινε υπό ψύξη μέχρι τη χρήση του.

(Ε) **Διάλυμα ενζύμου 4 mg/mL**: PPL (20 mg) διαλύθηκε σε ρδ TRIS (5 mL).

(2) Γαλακτώμα ελαίου

Για την παρασκευή του γαλακτώματος ελαίου, το έλαιο (ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο, 180 mg) αναμίχθηκε με προψυγμένο (4-5 °C) διάλυμα αραβικού κόμμεος (1,8 g). Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και γαλακτωματοποίηση σε λουτρό υπερήχων για 15 min.

(3) Πειραματική διαδικασία pH-stat

(A) Προετοιμασία των εξαρτημάτων της συσκευής.

Η βαθμονόμηση του συνδυαστικού ηλεκτροδίου στην αρχή και το σωστό πλύσιμο της συσκευής pH-stat στο τέλος κάθε δοκιμής αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επίτευξη καλών αποτελεσμάτων.

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας εφαρμόστηκαν τα παρακάτω στάδια.

1. Καθαρισμός της συσκευής pH-stat.

Η κυψελίδα και τα ηλεκτρόδια ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό. Ακολουθούσε προσθήκη αιθανόλης στην κυψελίδα, τοποθετούνταν το ηλεκτρόδιο και η κατάληξη της προχοϊδας στην ειδική θέση και το σύστημα παρέμενε υπό μαγνητική ανάδευση για 15 min. Ακολουθούσε έκπλυση με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με καθαρό χαρτί.

2. Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου

Πριν την εκκίνηση κάθε δοκιμής, το ηλεκτρόδιο εμβαπτιζόταν διαδοχικά σε δύο ρυθμιστικά διαλύματα με $\text{pH}=7$, και $\text{pH}=9$ θερμοκρασίας $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση του pH του αντιδρώντος μίγματος στη συνέχεια.

3. Απαέρωση προχοϊδας.

Γεμίζονταν και στη συνέχεια αδειάζονταν οι σωληνώσεις της προχοϊδας, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ογκομέτρηση των λιπαρών οξέων.

(B) Εκτέλεση του πειράματος.

Η θερμοκρασία εκτέλεσης των πειραματικών δοκιμών ήταν $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ο χρόνος λειτουργίας της συσκευής για το ελαιόλαδο και το ηλιέλαιο ρυθμίστηκε στα 8 min για τη μέθοδο Γ και στα 12 min για τη μέθοδο Β. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιγράφεται σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Στην κυψελίδα της συσκευής τοποθετούνταν το μίγμα αντίδρασης και στις ειδικές θέσεις το συνδυαστικό ηλεκτρόδιο για τη μέτρηση του pH και η προχοϊδα του NaOH . Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης το μίγμα αναδευόταν μαγνητικά.

Το μίγμα της αντίδρασης στην κυψελίδα περιλάμβανε:

- 2 mL ρδ TRIS
- 2 mL NaTC
- 2 mL NaCl
- 2 mL γαλακτώματος ελαίου.

Ακολουθούσαν τα εξής στάδια:

α) Γινόταν μέτρηση του pH του αντιδρώντος μίγματος και ρύθμιση αυτού στην τιμή pH=8 με προσθήκη διαλύματος NaOH.

β) Γινόταν εκκίνηση του πειράματος και μετά την παραμονή του μίγματος για 1-2 min προσθήκη της λιπάσης (100 μ L, 0,4mg/mL). Τα απελευθερούμενα οξέα από τη δράση του ενζύμου εξουδετερώνονταν με την αυτόματη προσθήκη NaOH (0,1000M) διατηρώντας έτσι το pH σταθερό (pH=8).

pH stat. Μέθοδος Γ.

Γινόταν σύγκριση της δραστικότητας παγκρεατικής λιπάσης για την υδρόλυση γαλακτώματος φρέσκου ελαίου και ελαίου που περιελάμβανε MPM σε ανεξάρτητα πειράματα.

Για τη μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα παγκρεατικής λιπάσης έγιναν τα ακόλουθα πειράματα:

Έλαιο (0,180 g)	Εκχύλισμα MPM (Au*s)
Φρέσκο SNO	—
Φρέσκο SNO	500
Φρέσκο SNO	1004
Φρέσκο SNO	750
Φρέσκο SNO	1500
Φρέσκο SNO	810
Φρέσκο SNO	600
Φρέσκο VO	—
Φρέσκο VO	800
Φρέσκο VO	1100
Φρέσκο VO	400
Φρέσκο VO	720

Έλαιο (0,180 g)	Απομονωμένο με HPLC MPM (Au*s)
Φρέσκο SNO	—
Φρέσκο SNO	550
Φρέσκο SNO	487
Φρέσκο SNO	1130

pH stat. Μέθοδος B

Γινόταν μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα παγκρεατικής λιπάσης με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας MPM στο μίγμα της αντίδρασης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης φρέσκου ελαίου (7 min μετά την εκκίνηση του πειράματος).

Για τη μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα παγκρεατικής λιπάσης έγιναν τα ακόλουθα πειράματα

Έλαιο (0,180 g)	Εκχύλισμα MPM (Au*s)
Φρέσκο SNO	—
Φρέσκο SNO	200
Φρέσκο SNO	400
Φρέσκο SNO	600
Φρέσκο SNO	800
Φρέσκο SNO	1300
Φρέσκο VOO	—
Φρέσκο VOO	216
Φρέσκο VOO	864

4.3.3.2. Μέθοδος HPLC

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής της ποσότητας των τριακυλογλυκερολών που βρίσκονται σε ορισμένο δείγμα ελαίου πριν και μετά τη δράση λιπάσης.

(1) Παρασκευή διαλυμάτων για τη μέθοδο HPLC.

(Α) **Ρδ TRIS 1 M**: TRIS (2,23 g) διαλύθηκε σε δις απεσταγμένο νερό (10 mL) και ρυθμίστηκε το pH στην τιμή pH=8 με προσθήκη διαλύματος HCl 6 M και 0,5 M.

(Β) **Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 20%**: CaCl_2 (10 g) διαλύθηκε σε δις-απεσταγμένο νερό (50 mL).

(Γ) **Διάλυμα χολικών αλάτων 0,1%**: NaTC (0,05 g) διαλύθηκε σε δις-απεσταγμένο νερό (50 mL).

(Δ) **Διάλυμα ενζύμου 100 mg/mL**: PPL (100 mg) διαλύθηκε σε ρδ TRIS (1 mL).

(2) Πειραματική διαδικασία

(Α) Εκτέλεση του πειράματος

1) Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν:

- 100 μL ρδ TRIS
- 0,045 mg Έλαιο (ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο)
- 1 mL CaCl_2
- 250 μL NaTC

2) Ακολούθησε γαλακτωματοποίηση σε λουτρό υπερήχων για 5-7 min.

3) Προστέθηκε PPL (50 μL , 100 mg/mL).

4) Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε υδρόλουτρο στους 37 °C για 20 min, με περιοδική ανάδευση σε vortex ανά 4-5 min.

5) Μετά την πάροδο των 20 min προστέθηκε διάλυμα HCl (0,5 mL, 6 M) και ακολούθησε ανάδευση σε vortex.

6) Έγινε μικροεκχύλιση με διαιθυλαιθέρα (2 mLx2). Η πορεία περιελάμβανε ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για καλύτερο διαχωρισμό των στιβάδων, (1300 rpm, 2 min).

7) Η παραμένουσα υδατική στιβάδα εκχυλίστηκε με χλωροφόρμιο (2 mL), και αιθερικές στιβάδες συλλέχθηκαν μαζί και εκπλύθηκαν με νερό (1 mL). Ακολούθως έγινε έκπλυση της στιβάδας του χλωροφορμίου με νερό (1 mL).

8) Τα οργανικά εκχυλίσματα παραλήφθησαν μαζί και οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό ρεύμα αερίου N_2 .

9) Στο ξηρό δείγμα προστέθηκε διάλυμα $CHCl_3$ /εξανίου/ CH_3CN (1:1:1, 1150 μL) και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες για HPLC.

Για τη μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα παγκρεατικής λιπάσης έγιναν τα ακόλουθα πειράματα:

Έλαιο (0,045 mg)	Απομονωμένο με HPLC MPM (Au*s)
Φρέσκο SNO	—
Φρέσκο SNO	180
Φρέσκο SNO	354
Φρέσκο SNO	526
Φρέσκο SNO	730
Φρέσκο SNO	176
Φρέσκο SNO	298
Φρέσκο SNO	450
Φρέσκο SNO	500

Η ποσότητα των τριακυλογλυκερολών που παρέμεινε μετά τη δράση της λιπάσης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μετρήθηκε με HPLC. Για τον προσδιορισμό της υδρόλυσης έγινε σύγκριση της ποσότητας των τριακυλογλυκερολών στα δείγματα αυτά και σε αντίστοιχα τυφλά δείγματα. (που περιελάμβανε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από ένζυμο)

(B) Μέθοδος ανάλυσης

Μέθοδος Ανάλυσης: Χρωματογραφία HPLC αναστρόφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση.

Στήλη: C18 Nucleosil 120 (5 μm) (120 $\times$ 4mm).

Ανιχνευτής: UV-Vis (280, 214, 295, 254 nm).

Ροή διαλυτών: 1 mL/min.

Όγκος δείγματος: 50 μL .

Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλυσης (67):

Χρόνος (min)	%A	%B	%C	%D
0	70,0	17,5	12,5	0
35	0	58,3	41,7	0
45	0	58,3	41,7	0
51	0	23,4	16,6	60,0
56	0	23,4	16,6	60,0
60	0	58,3	41,7	0
65	70,0	17,5	12,5	0
70	70,0	17,5	12,5	0

A = υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος σε pH=3, B = CH_3CN , C = CH_3OH , D = $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Παραλαβή του MPM από τα τηγανισμένα έλαια

Η παραλαβή του κλάσματος του MPMs έγινε με εκχύλιση τηγανισμένων ηλιελαίων, τα οποία είχαν συλλεχθεί από εστιατόρια και εστιατόρια ταχείας εξυπηρέτησης του νομού Αττικής (61). Τα έλαια αυτά ήταν γνωστού, υψηλού βαθμού υποβάθμισης. Για την παραλαβή του κλάσματος των MPM το έλαιο διαλύθηκε σε εξάνιο και ακολούθησε δύο φορές εκχύλιση με διάλυμα $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 6/4 για την απομάκρυνση των πολικών συστατικών. Η παραμένουσα οργανική, μη πολική, στιβάδα του εξανίου εκχυλίστηκε δύο φορές με CH_3CN . Οι στιβάδες του CH_3CN που περιείχαν το MPM κλάσμα του ελαίου συλλέχθηκαν μαζί και ακολούθησε απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του διαλύτη. Το ξηρό δείγμα αναδιαλύθηκε σε εξάνιο και έγινε νέα εκχύλιση με CH_3CN , ακολουθούμενη από εξάτμιση μέχρι ξηρού με αέριο N_2 και αναδιάλυση έως τελικού συνολικού όγκου 1,5 mL (διάλυμα Α).

Το εκχύλισμα που παραλήφθηκε περιείχε το κλάσμα MPM του ελαίου και μικρές ποσότητες άλλων συστατικών. Με χρωματογραφία HPLC αναστροφής φάσεως (RP-HPLC) και χρήση φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή UV-VIS βρέθηκε ότι το εκχύλισμα MPM περιείχε ποσότητα MPM ίση με 14,4

Au*s/μL διαλύματος A. Ένα τυπικό χρωματογράφημα του εκχυλισμένου MPM φαίνεται στο Σχήμα 6.1.A. Το MPM κλάσμα εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με χρόνο κατακράτησης (RT) 19-21 min (16).

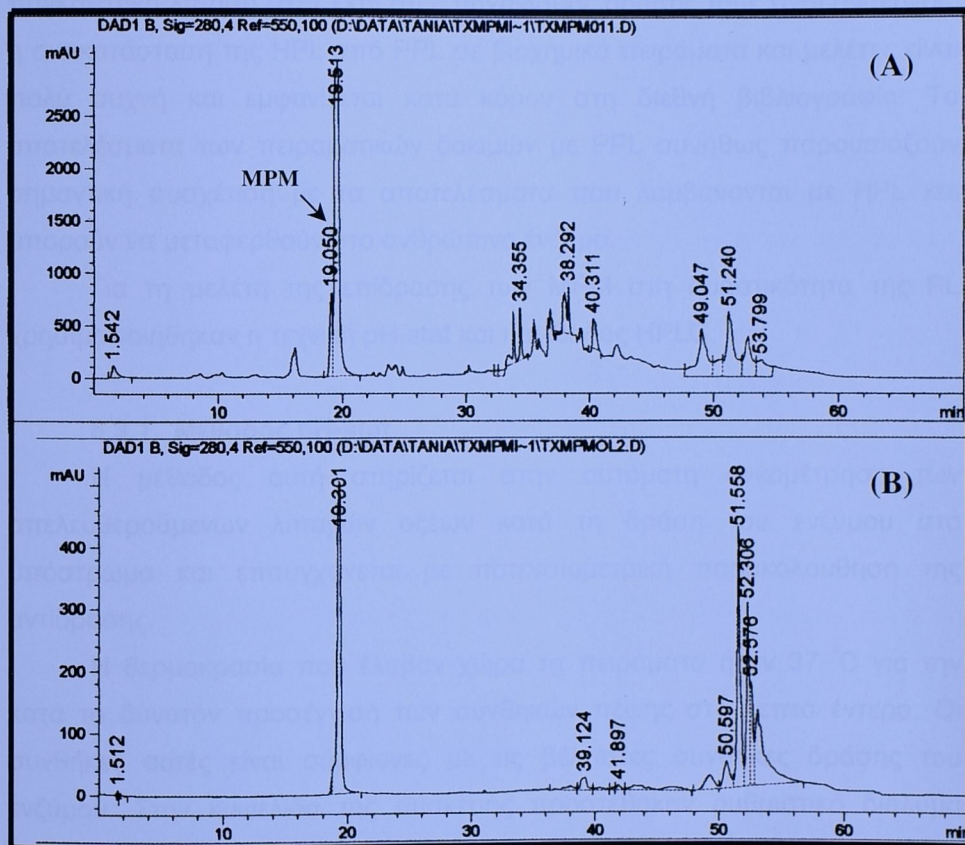
Η απομόνωση καθαρού, πλήρως διαχωρισμένου από τα υπόλοιπα συστατικά του ελαίου, MPM δεν έχει καταστεί μέχρι στιγμής δυνατή. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε σχετική πτητικότητα του κλάσματος, είτε σε οξείδωση των συστατικών του, είτε σε αδιαλυτότητα μετά την απομόνωσή του στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Κατά συνέπεια, προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα των MPMs στο εκχύλισμα του ελαίου χρησιμοποιήθηκαν οι μονάδες Au*s. Τα Au*s εκφράζουν μονάδες απορρόφησης (Au) του MPM κλάσματος στα 280 nm επί seconds (s).

5.2. Απομόνωση του MPM με χρωματογραφία HPLC

Το εκχύλισμα του MPM που παραλήφθηκε περιείχε εκτός από το MPM και μικρές ποσότητες άλλων συστατικών του ελαίου (βλ. σχήμα 6.1.A). Για το διαχωρισμό των MPMs εφαρμόστηκε χρωματογραφία RP-HPLC με ανιχνευτή UV-VIS, DAD (62). Το κλάσμα MPM, με RT 19-21 min συλλέχθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε φρέσκο ηλιέλαιο. Η παρουσία του ηλιελαίου αποδείχθηκε ικανή να παρεμποδίσει την απώλεια του MPM κατά τη διάρκεια της απομόνωσής του. Εφαρμόζοντας αυτή τη διαδικασία το μεγαλύτερο ποσοστό MPM διατηρήθηκε στο έλαιο.

Σύμφωνα με την ακολουθούμενη χρωματογραφική μέθοδο (62) οι διαλύτες στους οποίους βρίσκεται το MPM κατά την έκλουσή του από τη στήλη είναι H₂O/MeOH/CH₃CN 30:29:41. Δεδομένου ότι η ροή της κινητής φάσης είναι 1 mL/min, ο συνολικός όγκος των διαλυτών είναι 2 mL. Μετά τη συλλογή του εκλούσματος των MPM (2 mL) στο ηλιέλαιο, ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex ώστε να αναμιχθούν οι φάσεις (ελαίου και εκλούσματος). Στη συνέχεια έγινε μερική εξάτμιση των διαλυτών της HPLC υπό ρεύμα N₂, μέχρι τελικού όγκου περίπου 0,6 mL ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατόν το μεγαλύτερο μέρος των οργανικών διαλυτών. Στο προκύπτον μίγμα προστέθηκε εξάνιο και ακολούθησε εκχύλιση. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε δύο φορές. Στο σύνολο των οργανικών φάσεων που συλλέχθηκαν βρέθηκε το έλαιο και το συνολικό σχεδόν ποσό των MPM (ανάκτηση περίπου 90%, Σχήμα 5.1. A και B). Ακολούθησε εξάτμιση του

διαλύτη μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 . Στις περιπτώσεις που ήταν επιθυμητή μεγαλύτερη συγκέντρωση MPM στο έλαιο, στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα συλλέγονταν κατά περίπτωση περισσότερα του ενός εκλούσματα με RT 19-21 min και η εκχύλιση γινόταν με αναλόγως μεγαλύτερη ποσότητα εξάνιου.



Σχήμα 5.1. (A) Χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος MPM με ανιχνευτή UV-VIS (280 nm) (67). Η κορυφή των MPM έχει RT 19-21 min. Το εμβαδόν της κορυφής είναι 143 Au*s. **(B)** Χρωματογραφική ανάλυση φρέσκου ηλιελαίου στο οποίο έχει γίνει προσθήκη των MPM (RT 19-21) του (A) ακολουθούμενη από μερική εξάτμιση των διαλυτών έκλουσης και εκχύλιση με εξάνιο. Η κορυφή με RT 19-21 min (MPM) είχε εμβαδόν 12,9 Au*s. Λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο της ένεσης (100 μ L) και την αραιώση του ελαίου (1:20, τελικός όγκος 1 mL), η συνολική ποσότητα των MPM που παρέμεινε στο έλαιο ήταν 129 Au*s (ανάκτηση 90%).

5.3. Πειράματα με παγκρεατική λιπάση

Στην παρούσα εργασία για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε παγκρεατική λιπάση χοίρου (PPL). Δεδομένου ότι η PPL παρουσιάζει 85% ομοιότητα στην πρωτοταγή της δομή με την ανθρώπινη παγκρεατική λιπάση (HPL) και ότι ο μηχανισμός δράσης τους είναι ανάλογος, η αντικατάσταση της HPL από PPL σε βιοχημικά πειράματα και μελέτες είναι πολύ συχνή και εμφανίζεται κατά κόρον στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών με PPL συνήθως παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με HPL και μπορούν να μεταφερθούν στο ανθρώπινο ένζυμο.

Για τη μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα της PL χρησιμοποιήθηκαν η τεχνική pH-stat και η μέθοδος HPLC.

5.3.1. Μέθοδος pH-stat.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αυτόματη ογκομέτρηση των απελευθερούμενων λιπαρών οξέων κατά τη δράση του ενζύμου στο υπόστρωμα και επιτυγχάνεται με ποτενσιομετρική παρακολούθηση της αντίδρασης.

Η θερμοκρασία που έλαβαν χώρα τα πειράματα ήταν 37 °C για την κατά το δυνατόν προσέγγιση των συνθηκών πέψης στο λεπτό έντερο. Οι συνθήκες αυτές είναι σύμφωνες με τις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Στην κυψελίδα της συσκευής προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα TRIS, διάλυμα NaTC, διάλυμα NaCl και γαλάκτωμα ελαίου. Το μίγμα τέθηκε υπό μαγνητική ανάδευση. Η προσθήκη του ελαίου υπό μορφή γαλακτώματος έγινε για να μιμηθούμε τη γαλακτωματοποίηση των λιπών στο λεπτό έντερο. Επιπροσθέτως, η δράση της παγκρεατικής λιπάσης ευνοείται σε γαλακτωματοποιημένα υποστρώματα. Το διάλυμα NaTC προστέθηκε για τη μείωση της επιφανειακής τάσης του λίπους και το ρδ TRIS για τη σταθεροποίηση του pH του αντιδρώντος μίγματος πριν την προσθήκη του ενζύμου. Το μίγμα της αντίδρασης τέθηκε υπό ανάδευση για να δημιουργηθούν συνθήκες ανάλογες με τις κινήσεις ανάμιξης του γαστρεντερικού σωλήνα. Η προσθήκη του ενζύμου έγινε μετά τη σταθεροποίηση του pH, για την αποφυγή του συνυπολογισμού στη

δραστικότητα της λιπάσης της αυθόρμητης υδρόλυσης των τριακυλογλυκερολών.

Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονταν από τη δράση του ενζύμου εξουδετερώνονταν αυτόματα με διάλυμα NaOH. Ο ρυθμός κατανάλωσης της βάσεως (mL/min) απεικονιζόταν σε καταγραφέα συνδεδεμένο με τη συσκευή pH-stat και η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου (IU) προσδιοριζόταν ως τα μμολ των λιπαρών οξέων που απελευθερώνονταν ανά min και ανά mg καθαρού ενζύμου.

Η μελέτη της αναστολής της λιπάσης με την τεχνική pH-stat έγινε με δύο μεθόδους (μέθοδος Β και μέθοδος Γ), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σειρά προσθήκης λιπάσης, υποστρώματος και κλάσματος MPM. Σε όλες τις μεθόδους pH-stat (Β και Γ) που ακολουθήθηκαν, η δραστηριότητα του ενζύμου μετρήθηκε κατά τα πρώτα 10 λεπτά της αντίδρασης.

(α) Μέθοδος Γ: Μέθοδος της «δηλητηριασμένης» μεσεπιφάνειας.

Η επίδραση των MPM στη δράση της PL έγινε με σύγκριση της δραστηριότητας που είχε το ένζυμο για την υδρόλυση γαλακτώματος φρέσκου ελαίου (τυφλό) και της δραστηριότητας αυτού για την υδρόλυση γαλακτώματος ελαίου στο οποίο είχε προστεθεί κατάλληλη ποσότητα MPM, σε ανεξάρτητα πειράματα. Το κλάσμα MPM προστέθηκε στο έλαιο σε διάφορες συγκεντρώσεις και ακολούθησε γαλακτωματοποίηση με «προψυγμένο» διάλυμα αραβικού κόμμεος.

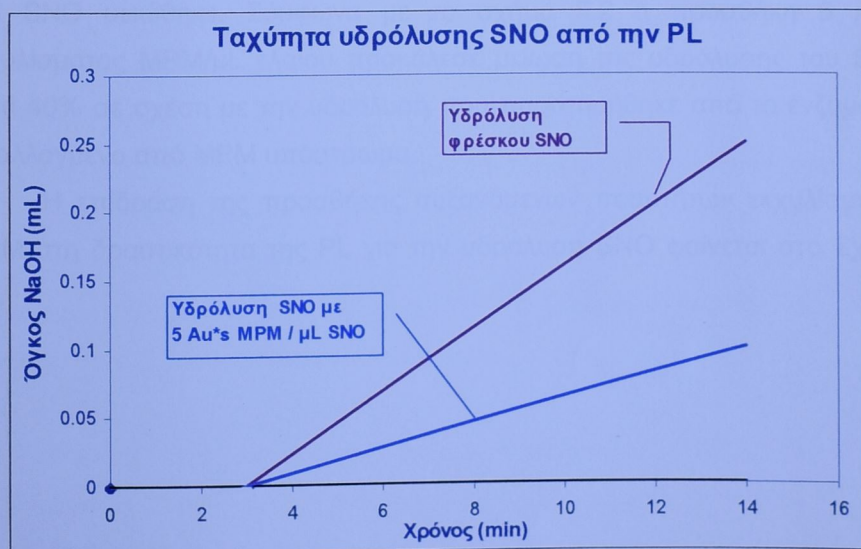
Στη μέθοδο Γ της pH-stat τα συστατικά που μπορεί να έχουν επίδραση στην PL βρίσκονται ήδη στο προς υδρόλυση γαλάκτωμα του ελαίου. Έτσι, με τη μέθοδο αυτή το ένζυμο συναντά μαζί με το φυσικό του υπόστρωμα και συστατικά που μπορεί να μεταβάλουν τη δραστηριότητά του.

Όταν χρησιμοποιηθεί ένα υποβαθμισμένο έλαιο ως έχει, μπορεί κανείς να υπολογίσει τη μεταβολή της δραστηριότητας της PL που θα προκληθεί στο ένζυμο από το σύνολο των παραπροϊόντων του υποβαθμισμένου ελαίου. Στη διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα θερμικά υποβαθμισμένα, τηγανισμένα έλαια υδρολύονται σε μικρότερο βαθμό από την PL σε σχέση με τα αντίστοιχα φρέσκα έλαια. Η αναστολή του ενζύμου που έχει παρατηρηθεί έχει αποδοθεί κατά κύριο λόγο στην παρουσία των PTG (40).

Για να καταστεί δυνατή η μελέτη της επίδρασης των MPM στη δραστικότητα του ενζύμου θα πρέπει να αποκλειστούν όλα τα άλλα παραπροϊόντα του τηγανισμένου ελαίου που έχουν πιθανή συμμετοχή στην αναστολή, όπως π.χ. τα PTG. Καθώς τα τηγανισμένα έλαια περιλαμβάνουν PTG, για να αποκλειστεί η συμμετοχή τους θα πρέπει το έλαιο να μην έχει υποστεί θερμική επεξεργασία. Έτσι, επιλέχθηκε η χρήση φρέσκων ελαίων στα οποία προστέθηκε MPM. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίστηκε η παρουσία υποστρώματος ελαίου για το ένζυμο το οποίο όμως ήταν συγχρόνως «δηλητηριασμένο» με το προς μελέτη απομονωμένο από τηγανισμένα έλαια κλάσμα MPM.

(α₁) Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος MPM από τηγανισμένο ηλιέλαιο στη δραστικότητα λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO

Ένα τυπικό παράδειγμα της κινητικής της παγκρεατικής λιπάσης που καταγραφόταν κατά τη μελέτη με την τεχνική pH-stat φαίνεται στο Σχήμα 5.2.



Σχήμα 5.2. Δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO και φρέσκου SNO που περιελάμβανε 5 Au*s MPM/μL SNO. Οι δύο ευθείες αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Η δραστικότητα της PL εκφράζεται σε μmol λιπαρών οξέων που υδρολύονται από το ένζυμο ανά min .

Με την τεχνική pH-stat τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από τη δράση του ενζύμου στο υπόστρωμά του εξουδετερώνονται από διάλυμα NaOH σύμφωνα με την αντίδραση



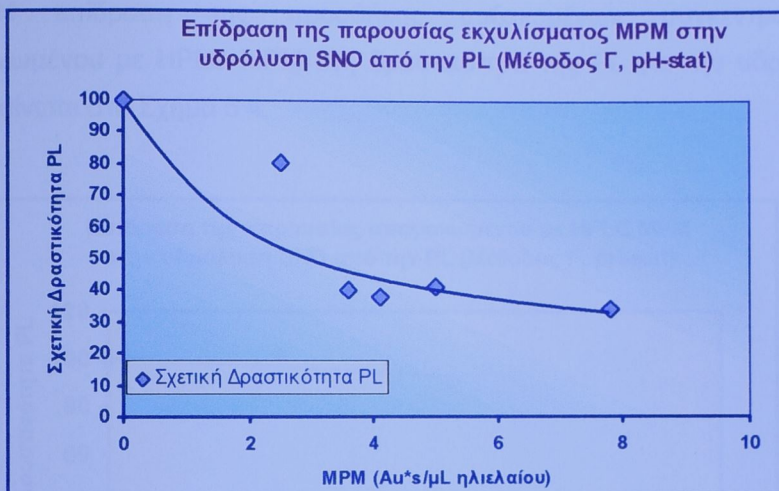
και στον καταγραφέα δίνεται η κατανάλωση NaOH (mL) ανά min .

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOH 0,1 N. Έτσι κάθε mL NaOH που καταναλωνόταν εξουδετέρωνε $100 \mu\text{mol}$ οξέος ($0,1 \text{ mmol/mL} * 1 \text{ mL} * 10^{-3} \mu\text{mol/mmol}$).

Η δραστικότητα της λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO βρέθηκε ότι ήταν 2,5 U. Δεδομένου ότι σε κάθε ενζυμική δοκιμή γινόταν προσθήκη $100 \mu\text{L}$ διαλύματος ενζύμου 4 mg/mL , δηλαδή $0,4 \text{ mg}$ PL, η ειδική δραστικότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 6,25 IU ($2,5 \text{ U} * 1 \text{ mg} / 0,4 \text{ mg}$).

Όταν ως υπόστρωμα λιπάσης χρησιμοποιήθηκε SNO στο οποίο είχε προστεθεί εκχυλισμένο MPM η δραστικότητα του ενζύμου για την υδρόλυση του SNO μειώθηκε. Σύμφωνα με το σχήμα 5.2 η προσθήκη $5 \text{ Au}^*\text{s}$ εκχυλίσματος MPM/ μL ελαίου προκάλεσε μείωση της υδρόλυσης του SNO κατά 40% σε σχέση με την υδρόλυση που παρατηρήθηκε από το ένζυμο σε απαλλαγμένο από MPM υπόστρωμα.

Η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενων ποσοτήτων εκχυλίσματος MPM στη δραστικότητα της PL για την υδρόλυση SNO φαίνεται στο Σχήμα 5.3.



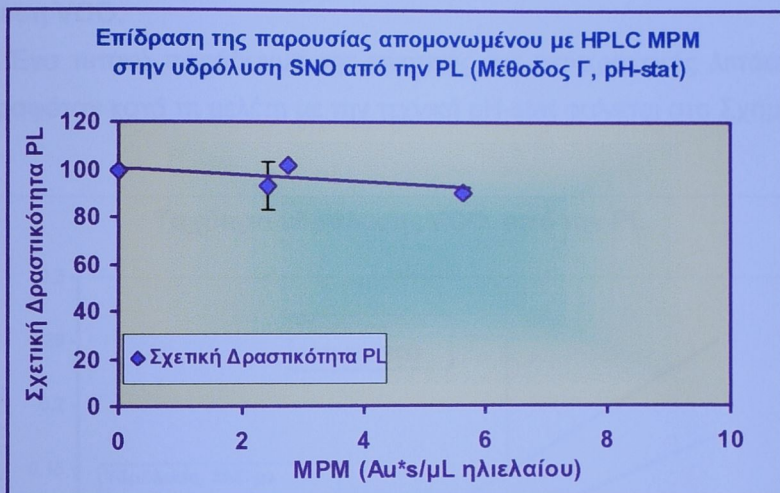
Σχήμα 5.3. Σχετική δραστηριότητα της PL για την υδρόλυση SNO που περιελάμβανε διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες εκχυλισμένου MPM. Η δραστηριότητα της λιπάσης για την υδρόλυση των ελαίων που περιελάμβαναν MPM συγκρινόταν με αυτή που είχε το ένζυμο για την υδρόλυση φρέσκου SNO

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 5.3, η δραστηριότητα της PL μειώθηκε μετά την προσθήκη εκχυλίσματος MPM στο υπόστρωμα. Η προσθήκη μικρής ποσότητας MPM (2,5 Au*s/μL SNO) προκάλεσε μικρή μείωση της σχετικής δραστηριότητας της PL (10%). Καθώς η ποσότητα του MPM στο έλαιο αυξανόταν, παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου μέχρι την οριακή τιμή των περίπου 5 Au*s/μL SNO. Πέρα από την τιμή αυτή η περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του MPM δε φαίνεται να είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου.

(α₂) Μελέτη της επίδρασης απομονωμένου με HPLC MPM στη δραστηριότητα της λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO

Προκειμένου να γίνουν τα πειράματα μελέτης της επίδρασης μόνο του MPM κλάσματος στη δραστηριότητα της PL για την υδρόλυση του SNO έγινε απομόνωση του κλάσματος αυτού με RP-HPLC. Τα καθαρά κλάσματα MPM συλλέγονταν σε 200 μL SNO και στη συνέχεια ακολουθείτο η πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.

Η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενων συγκεντρώσεων απομονωμένου με HPLC MPM στη δραστικότητα της PL για την υδρόλυση SNO φαίνεται στο Σχήμα 5.4.



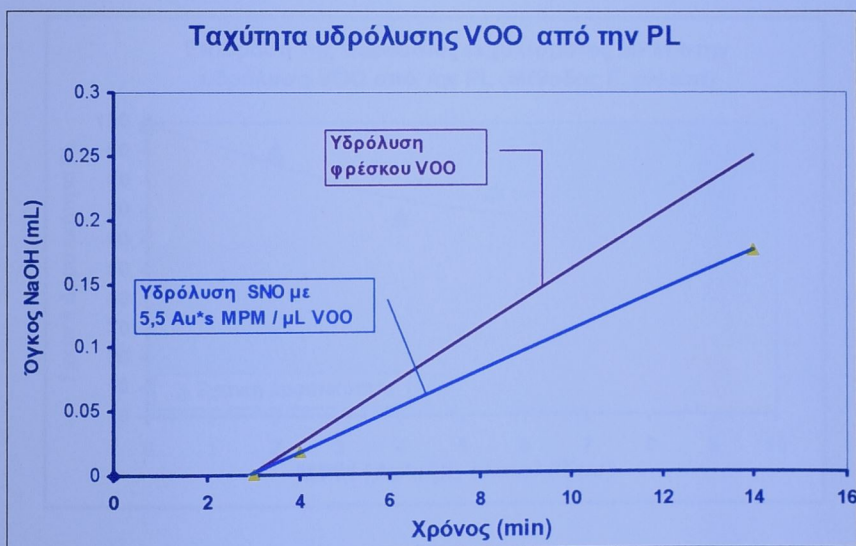
Σχήμα 5.4. Σχετική δραστικότητα της PL για την υδρόλυση SNO που περιελάμβανε αυξανόμενες διαδοχικά ποσότητες απομονωμένου με HPLC MPM. Η δραστικότητα της λιπάσης για την υδρόλυση των ελαίων που περιελάμβαναν MPM συγκρινόταν με αυτή που είχε το ένζυμο για την υδρόλυση φρέσκου SNO.

Από τις τιμές της σχετικής δραστικότητας της PL προκύπτει ότι η προσθήκη απομονωμένου με HPLC MPM δεν έχει σημαντική επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου. Παρατηρείται μια τάση οριακής μείωσης (5,5 Au*s) ή ακόμα και οριακής αύξησης (2,5 Au*s) της δραστικότητας της PL. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της προσθήκης 5,5 Au*s MPM/μL ελαίου η οποία στην περίπτωση του εκχυλισμένου MPM προκαλεί μείωση της σχετικής δραστικότητας του ενζύμου στο 40% (Σχήμα 5.3) ενώ στην περίπτωση του απομονωμένου από HPLC κλάσματος προκαλεί μείωση της σχετικής δραστικότητας του ενζύμου στο 90% (Σχήμα 5.4) της δραστικότητάς του για την υδρόλυση φρέσκου SNO.

(α₃) Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος MPM από τηγανισμένο ηλιέλαιο στη δραστικότητα λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου VOO

Εκχυλισμένο MPM από ηλιέλαιο προστέθηκε σε VOO και μελετήθηκε η επίδραση του κλάσματος αυτού (MPM) στη δραστικότητα της PL για την υδρόλυση VOO.

Ένα τυπικό παράδειγμα της κινητικής της παγκρεατικής λιπάσης που καταγραφόταν κατά τη μελέτη με την τεχνική pH-stat φαίνεται στο Σχήμα 5.5.

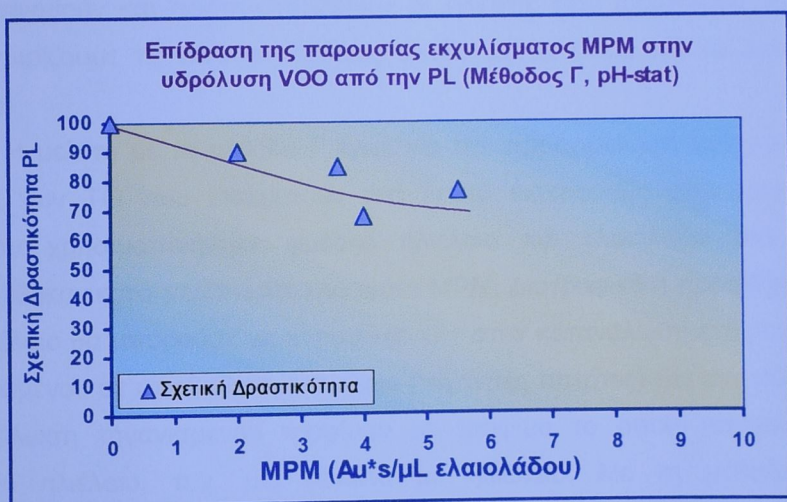


Σχήμα 5.5. Δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου VOO και VOO που περιελάμβανε 5,5 Au*s MPM/μL SNO. Οι δύο ευθείες αντιστοιχούν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Όταν ως υπόστρωμα λιπάσης χρησιμοποιήθηκε VOO στο οποίο είχε προστεθεί εκχυλισμένο MPM η δραστικότητα του ενζύμου για την υδρόλυση του VOO μειώθηκε (Σχήμα 5.5). Η προσθήκη 5,5 Au*s MPM/μL VOO οδήγησε σε μείωση της δραστικότητας του ενζύμου κατά 30%.

Η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενων ποσοτήτων εκχυλίσματος MPM στη δραστικότητα της PL για την υδρόλυση VOO φαίνεται στο Σχήμα 5.6.

Από τις τιμές των αποτελεσμάτων του σχήματος 5.6. προκύπτει ότι η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων εκχυλίσματος MPM σε υπόστρωμα VOO προκαλεί μείωση της σχετικής δραστικότητας της PL για την υδρόλυση του υποστρώματος. Η προσθήκη μικρής σχετικά ποσότητας MPM (2 Au*s/μL VOO) προκαλεί μικρή μείωση της σχετικής δραστικότητας (10%), ενώ η μείωση της δραστικότητας φθάνει στο 25% όταν η ποσότητα των MPM γίνει ίση με περίπου 5,5 Au*s/μL VOO.



Σχήμα 5.6. Σχετική δραστικότητα της PL για την υδρόλυση VOO που περιελάμβανε διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες εκχυλισμένου MPM. Η δραστικότητα της λιπάσης για την υδρόλυση των ελαίων που περιελάμβαναν MPM συγκρινόταν με αυτή που είχε το ένζυμο για την υδρόλυση φρέσκου VOO.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της επίδρασης εκχυλίσματος MPM στη δραστικότητα της PL για την υδρόλυση υποστρώματος ελαίου προκύπτει ότι η επίδραση του MPM είναι μεγαλύτερη όταν αυτό προστίθεται σε υπόστρωμα ηλιελαίου (σχήμα 5.3) σε σχέση με την επίδραση αυτού σε υπόστρωμα ελαιολάδου (σχήμα 5.6). Προσθήκη MPM της τάξεως των 5 Au*s ανά μL ελαίου οδηγεί σε μείωση της σχετικής δραστικότητας της PL στο 70% και 40% περίπου όταν το υπόστρωμα είναι VOO και SNO, αντίστοιχα. Μια

πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι ότι η τριελαΐνη του ελαιολάδου μπορεί να ανταγωνιστεί περισσότερο ικανοποιητικά το MPM για τη δέσμευσή της στο ένζυμο από ότι η τριλινολεΐνη του ηλιελαίου. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το κλάσμα των MPM που προστέθηκε τόσο στο ηλιέλαιο όσο και στο ελαιολάδο προερχόταν από δείγματα τηγανισμένων ηλιελαίων. Αν και προκαταρκτικές μελέτες επί της φύσεως των MPM (16) δεν έχουν υποδείξει διαφορές μεταξύ των MPM που παράγονται από διαφορετικά έλαια (ελαιολάδο, ηλιέλαιο, έλαιο τηγανίσματος FRIOL), εντούτοις έως ότου ταυτοποιηθούν και ποσοτικοποιηθούν οι ενώσεις που αποτελούν το MPM, δεν γνωρίζουμε τις αλληλεπιδράσεις αυτών με τα έλαια και τα λιπολυτικά ένζυμα.

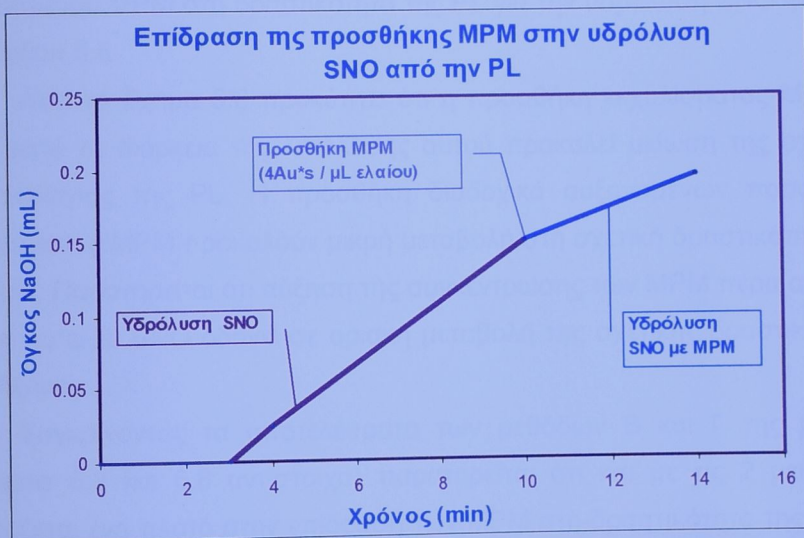
Η μελέτη με τη μέθοδο Γ έγινε για την προσομοίωση των συνθηκών πέψης των TG που επικρατούν στο λεπτό έντερο. Ως υπόστρωμα του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε φρέσκο ηλιέλαιο και ελαιολάδο στα οποία προστέθηκαν κατά περίπτωση κλάσματα MPM. Διατροφικά η προσθήκη MPM σε ηλιέλαιο θα μπορούσε να αντιστοιχεί είτε στην κατανάλωση ενός τροφίμου τηγανισμένου σε υποβαθμισμένο έλαιο (τηγανιτές πατάτες) είτε στη σύγχρονη κατανάλωση τηγανισμένου τροφίμου με τρόφιμο το οποίο περιελάμβανε φρέσκο ηλιέλαιο, π.χ. μια σαλάτα με ηλιέλαιο. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίστηκε η μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου για την υδρόλυση των TG του ηλιελαίου παρουσία των MPM. Η προσθήκη MPM σε ελαιολάδο θα μπορούσε να αντιστοιχεί στη σύγχρονη κατανάλωση τηγανισμένου τροφίμου, με τρόφιμο το οποίο περιελάμβανε φρέσκο ελαιολάδο, π.χ. μια σαλάτα με φρέσκο ελαιολάδο. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίστηκε η μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου για την υδρόλυση των TG του ελαιολάδου παρουσία των MPM.

(β) Μέθοδος Β: Αναστολή κατά τη λιπόλυση

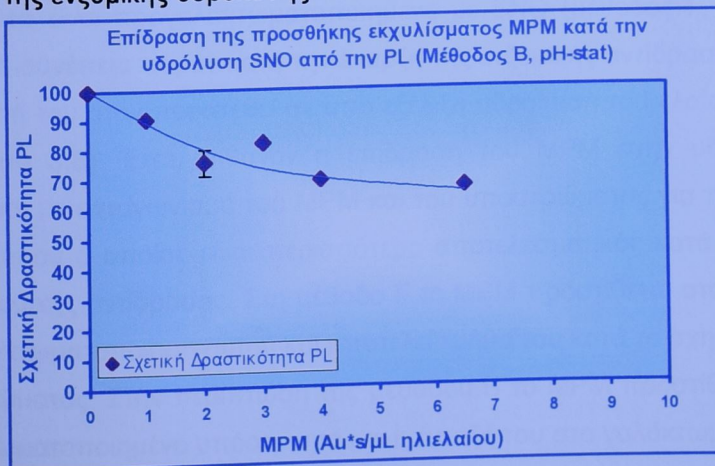
Η επίδραση των παραπροϊόντων τηγανίσματος στη δράση παγκρεατικής λιπάσης έγινε με σύγκριση της δραστηριότητας που είχε το ένζυμο για την υδρόλυση γαλακτώματος φρέσκου ελαίου και της δραστηριότητας αυτού για την υδρόλυση του ίδιου γαλακτώματος μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας MPM στο μίγμα της αντίδρασης, 7 min μετά την εκκίνηση της ενζυμικής υδρόλυσης.

(β₁) Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος MPM από τηγανισμένο ηλιέλαιο στη δραστικότητα λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO

Ένα τυπικό παράδειγμα της κινητικής της παγκρεατικής λιπάσης που καταγραφόταν κατά τη μελέτη με την τεχνική pH-stat φαίνεται στο Σχήμα 5.7.



Σχήμα 5.7. Επίδραση της προσθήκης εκχυλίσματος MPM στο μίγμα της υδρόλυσης SNO από PL. Η προσθήκη του MPM γινόταν 7 min μετά την έναρξη της ενζυμικής υδρόλυσης.



Σχήμα 5.8. Σχετική δραστικότητα της PL για την υδρόλυση SNO που περιελάμβανε αυξανόμενες διαδοχικά ποσότητες εκχυλίσματος MPM. Η σχετική δραστικότητα της PL υπολογιζόταν με βάση τη δραστικότητα που είχε το ένζυμο στα πρώτα 7 min της αντίδρασης (απουσία MPM) για την υδρόλυση φρέσκου ηλιελαίου και της δραστικότητά του μετά την προσθήκη των MPM στο μίγμα της αντίδρασης.

Από το Σχήμα 5.7 προκύπτει ότι η προσθήκη εκχυλίσματος MPM 4 $\text{Au}^*\text{s}/\mu\text{L}$ SNO προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου στο 70% σε σχέση με τη δραστηριότητα που παρουσιάζει το ένζυμο σε απαλλαγμένο από MPM υπόστρωμα.

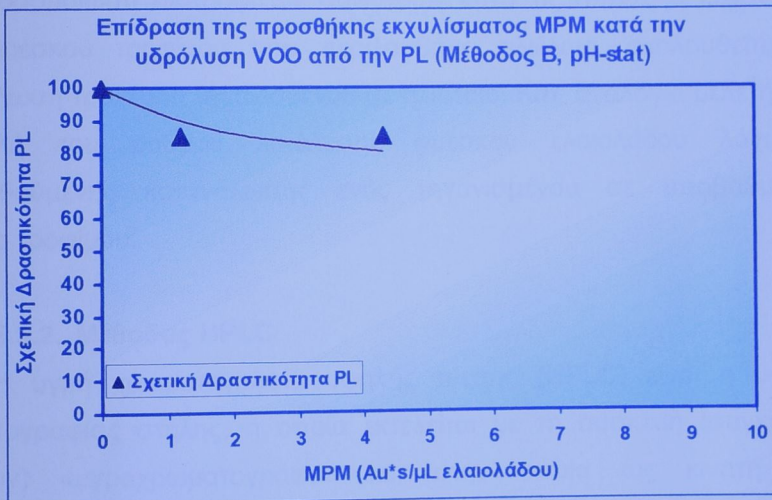
Η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενων συγκεντρώσεων εκχυλισμένου MPM στη δραστηριότητα της PL για την υδρόλυση SNO φαίνεται στο Σχήμα 5.8.

Από το Σχήμα 5.8 προκύπτει ότι η προσθήκη εκχυλίσματος MPM σε SNO κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης αυτού προκαλεί μείωση της σχετικής δραστηριότητας της PL. Η προσθήκη διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων εκχυλίσματος MPM προκαλούν μικρή μεταβολή στη σχετική δραστηριότητα του ενζύμου. Παρατηρείται ότι αύξηση της συγκέντρωσης των MPM πέρα από την τιμή 4 $\text{Au}^*\text{s}/\mu\text{L}$ SNO οδηγεί σε οριακή μεταβολή της σχετικής δραστηριότητας του ενζύμου.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μεθόδων Β και Γ της pH-stat (σχήματα 6.3 και 6.8 αντίστοιχα) παρατηρείται ότι και με τις 2 μεθόδους εμφανίζεται ένα πλατό στην επίδραση των MPM στη δραστηριότητα της PL, το οποίο κυμαίνεται κατά προσέγγιση μεταξύ 4-5 $\text{Au}^*\text{s}/\mu\text{L}$ SNO. Επιπλέον προκύπτει ότι το MPM έχει σημαντικότερη επίδραση στην υδρόλυση του SNO όταν αυτό είναι προγαλακτωματοποιημένο με SNO (μέθοδος Γ, Σχήμα 5.3) και κατά συνέπεια παρόν κατά την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης, από την επίδρασή του όταν προστεθεί σε υπό εξέλιξη υδρόλυση του ελαίου (μέθοδος Β, Σχήμα 5.8). Έτσι, πιθανόν η επίδραση του MPM στην υδρόλυση να σχετίζεται με ανταγωνισμό του MPM και του υποστρώματος για τη δέσμευση του ενζύμου ο οποίος είναι περισσότερο αποτελεσματικός κατά την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης. Στη μέθοδο Γ το MPM προστίθεται στο έλαιο πριν τη γαλακτωματοποίηση αυτού και αποτελεί τμήμα του κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος. Στην περίπτωση της μεθόδου Β το MPM προστίθεται σε ήδη γαλακτωματοποιημένο υπόστρωμα και η ένταξή του στο γαλάκτωμα γίνεται με μηχανική ανάδευση, κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Έτσι, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα γαλακτώματα των 2 μεθόδων να διαφέρουν ως προς την κατανομή και διαθεσιμότητα των MPM.

(β₂) Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος MPM από τηγανισμένο ηλιέλαιο στη δραστικότητα λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου VOO

Για τη μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος από ηλιέλαιο MPM στην υδρόλυση του VOO έγιναν δύο πειράματα, με διαφορετικές ποσότητες MPM, τα οποία παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 5.9).



Σχήμα 5.9. Σχετική δραστικότητα της PL για την υδρόλυση VOO που περιελάμβανε αυξανόμενες διαδοχικά ποσότητες εκχυλίσματος MPM από ηλιέλαια. Η σχετική δραστικότητα της PL υπολογιζόταν με βάση τη δραστικότητα που είχε το ένζυμο στα πρώτα 7 min της αντίδρασης (απουσία MPM) για την υδρόλυση φρέσκου ελαιολάδου και της δραστικότητά του μετά την προσθήκη των MPM στο μίγμα της αντίδρασης.

Ανάλογα συμπεράσματα με αυτά που προέκυψαν από τη σύγκριση των μεθόδων Β και Γ για την υδρόλυση του SNO μπορούν να εξαχθούν και στην περίπτωση του VOO. Έτσι, το MPM έχει μια ελαφρά σημαντικότερη επίδραση στην υδρόλυση του VOO όντας προγαλακτωματοποιημένο με το έλαιο (μέθοδος Γ, Σχήμα 5.6) σε σχέση με την επίδραση αυτού όταν προστεθεί σε υπό εξέλιξη υδρόλυση του VOO (μέθοδος Β, Σχήμα 5.9). Παρουσία 4 Au*s MPM /μL ελαιολάδου η σχετική δραστικότητα του ενζύμου είναι περίπου 70% με τη μέθοδο Γ και περίπου 85% με τη μέθοδο Β.

Συγχρόνως και με τις δύο μεθόδους (B, Γ) το MPM έχει μεγαλύτερη επίδραση στην υδρόλυση SNO από ότι στην υδρόλυση VOO (σχήματα 5.3 και 5.6 για τη μέθοδο Γ, 5.8 και 5.9 για τη μέθοδο B).

Η μέθοδος B της pH-stat επιλέχθηκε για τη μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος MPM προερχόμενου από τηγανισμένο ηλιέλαιο, σε υπό εξέλιξη υδρόλυση φρέσκου ηλιελαίου ή ελαιολάδου από PL. Η μελέτη αυτή έγινε για την προσομοίωση διατροφικών συνηθειών κατά τις οποίες η κατανάλωση ενός φρέσκου τροφίμου που περιλαμβάνει ηλιέλαιο, ακολουθείται από κατανάλωση τροφίμου τηγανισμένου σε ηλιέλαιο. Κατ' αναλογία μελετήθηκε η μεταβολή του ρυθμού λιπόλυσης φρέσκου ελαιολάδου λόγω της ακολουθούμενης κατανάλωσης ενός τηγανισμένου σε υποβαθμισμένο ηλιέλαιο τροφίμου.

5.3.2. Μέθοδος HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) είναι η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη συσκευή (συγκρότημα οργάνων) «υγροχρωματογράφο» και στην οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση συνίσταται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις (63).

Η HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ενζυμικής υδρόλυσης των οξειδωμένων και πολυμερισμένων τριακυλογλυκερολών από την παγκρεατική λιπάση (40) και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των τριακυλογλυκερολών στα έλαια.

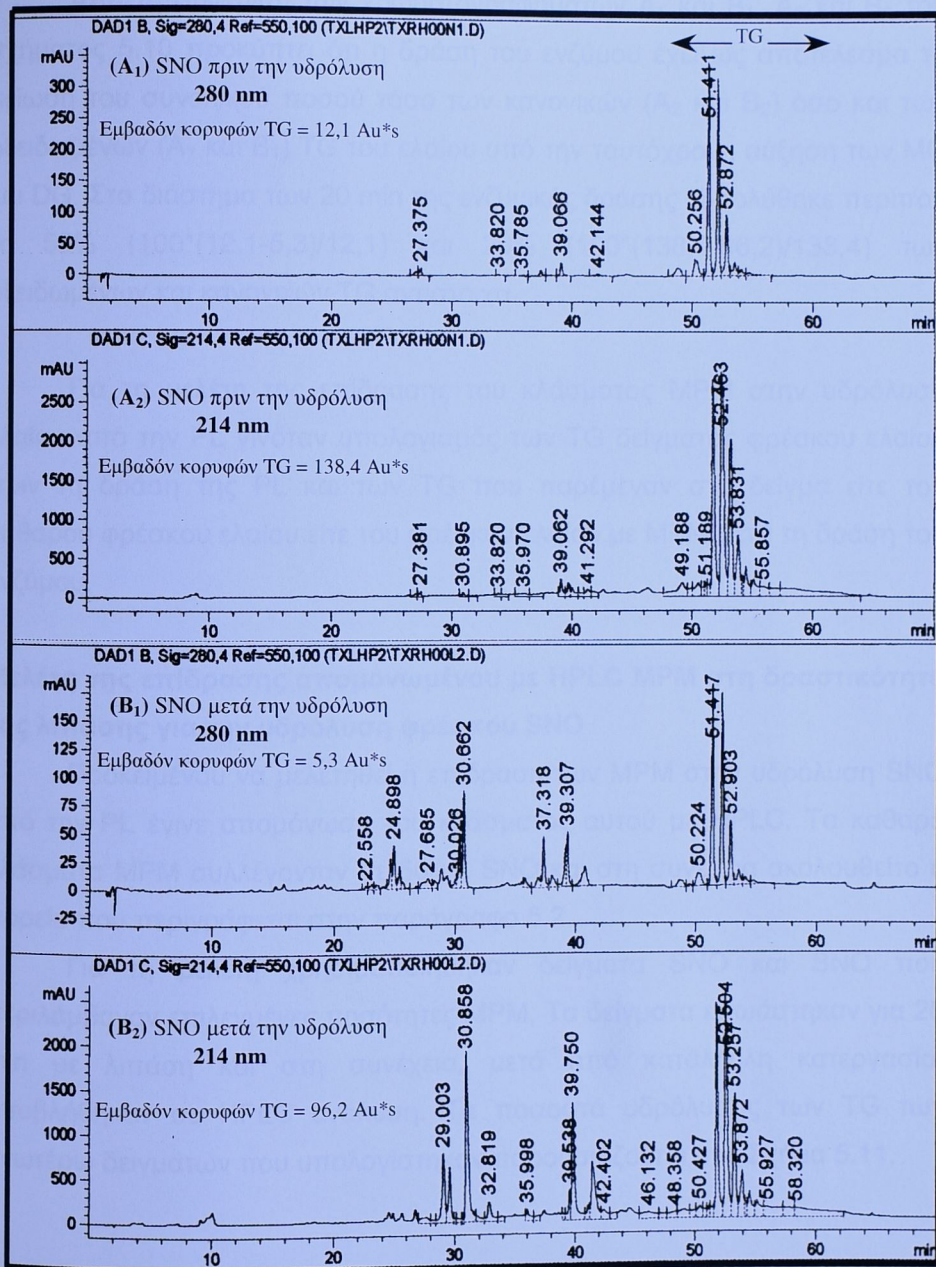
Στη συγκεκριμένη εργασία, για τις ενζυμικές μελέτες με HPLC χρησιμοποιήθηκαν έλαια, προζυγισμένα σε δοκιμαστικό σωλήνα, στα οποία προστέθηκαν ρδ TRIS (pH=8), διάλυμα CaCl_2 και διάλυμα NaTC. Ακολούθησε γαλακτωματοποίηση του μίγματος αντίδρασης σε λουτρό υπερήχων. Μετά την προσθήκη του ενζύμου οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν σε υδρόλουτρο στους 37°C για 20 min με περιοδική ανάδευση.

Η προσθήκη του ρδ TRIS έγινε για τη διατήρηση του pH του αντιδρώντος μίγματος κοντά στο βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου, του διαλύματος NaTC για τη μείωση της επιφανειακής τάσης των συστατικών του ελαίου και τη γαλακτωματοποίησή του, και του διαλύματος CaCl_2 διότι

σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα ιόντα Ca^{2+} είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου. Η επιλογή της θερμοκρασίας των 37 °C και η περιοδική ανάδευση έγιναν με σκοπό την προσομοίωση των συνθηκών πέψης στο λεπτό έντερο.

Η μελέτη της υδρόλυσης ενός ελαίου από PL με τη μέθοδο HPLC βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής της ποσότητας των TG που βρίσκονται σε ορισμένο δείγμα ελαίου πριν και μετά τη δράση του ενζύμου. Στη βιβλιογραφία για να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν τα TG των ελαίων έχει χρησιμοποιηθεί SE-HPLC με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RID) (40). Στην εργασία αυτή η ανάλυση των ελαίων έγινε με RP-HPLC και ανιχνευτή UV-VIS (DAD). Χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή UV-VIS μπορεί να υπολογιστεί και να εκφραστεί σε $\text{Au}^{\circ}\text{s}$ το ποσό των TG που υπάρχουν σε συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος ελαίου και το ποσό των TG που απομένουν στο ίδιο ή σε όμοιο διάλυμα του ελαίου μετά την ενζυμική του υδρόλυση. Ο λόγος της διαφοράς του συνολικού ποσού των TG που υπάρχουν στο έλαιο πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση προς τα συνολικά TG του ελαίου πριν την υδρόλυση παρέχει το ποσοστό της υδρόλυσης των TG του ελαίου από τη λιπάση. Με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος της απορρόφησης εξάγονται αποτελέσματα για την υδρόλυση των κανονικών (214 nm) και των οξειδωμένων (280 nm) TG του ελαίου.

Ένα τυπικό χρωματογράφημα δείγματος φρέσκου ελαίου πριν και μετά τη δράση παγκρεατικής λιπάσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.10.



Σχήμα 5.10. Χρωματογραφική ανάλυση φρέσκου ηλιελαίου (67), (Α) πριν και (Β) μετά τη δράση λιπάσης. Ο λόγος της διαφοράς του συνολικού ποσού των TG που υπάρχουν στο έλαιο πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση προς τα συνολικά TG του ελαίου πριν την υδρόλυση παρέχει το ποσοστό της υδρόλυσης των TG του ελαίου από τη λιπάση.

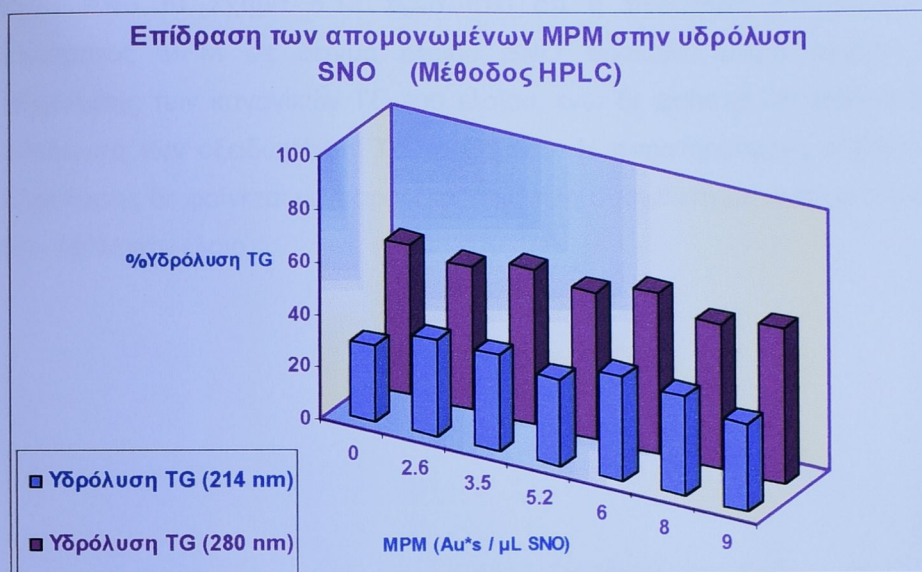
Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων A_1 και B_1 , A_2 και B_2 του σχήματος 5.10 προκύπτει ότι η δράση του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού ποσού τόσο των κανονικών (A_2 και B_2) όσο και των οξειδωμένων (A_1 και B_1) TG του ελαίου υπό την ταυτόχρονη αύξηση των MG και DG. Στο διάστημα των 20 min της ενζυμικής δράσης υδrolύθηκε περίπου το 56% ($100 \cdot (12,1-5,3)/12,1$) και 29% ($100 \cdot (138,4-96,2)/138,4$) των οξειδωμένων και κανονικών TG αντίστοιχα.

Για τη μελέτη της επίδρασης του κλάσματος MPM στην υδρόλυση ελαίου από την PL γινόταν υπολογισμός των TG δείγματος φρέσκου ελαίου πριν τη δράση της PL και των TG που παρέμεναν στο δείγμα είτε του καθαρού φρέσκου ελαίου είτε του φρέσκου ελαίου με MPM μετά τη δράση του ενζύμου.

Μελέτη της επίδρασης απομονωμένου με HPLC MPM στη δραστικότητα της λιπάσης για την υδρόλυση φρέσκου SNO

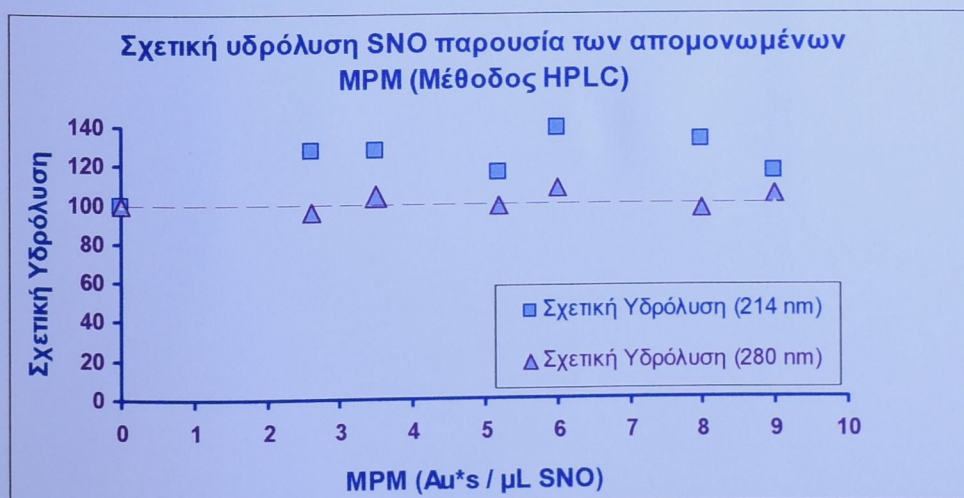
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των MPM στην υδρόλυση SNO από την PL έγινε απομόνωση του κλάσματος αυτού με HPLC. Τα καθαρά κλάσματα MPM συλλέγονταν σε 50 μ L SNO και στη συνέχεια ακολουθείτο η πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα SNO και SNO που περιλάμβαναν επιλεγμένες ποσότητες MPM. Τα δείγματα επωάστηκαν για 20 min με λιπάση και στη συνέχεια, μετά από κατάλληλη κατεργασία, υποβλήθηκαν σε HPLC ανάλυση. Τα ποσοστά υδρόλυσης των TG των ανωτέρω δειγμάτων που υπολογίστηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.11.



Σχήμα 5.11. % Υδρόλυση των κανονικών και οξειδωμένων TG απουσία και παρουσία επιλεγμένων ποσοτήτων απομονωμένου MPM.

Η επίδραση της προσθήκης αυξανόμενων συγκεντρώσεων απομονωμένου MPM στη σχετική υδρόλυση που υπέστησαν δείγματα SNO που περιελάμβαναν κλάσματα αυτού φαίνεται στο Σχήμα 5.12.



Σχήμα 5.12. Σχετική υδρόλυση κανονικών και οξειδωμένων TG δειγμάτων SNO που περιελάμβαναν αυξανόμενες διαδοχικά ποσότητες απομονωμένου με HPLC MPM. Η υδρόλυση των TG των ελαίων που περιελάμβαναν MPM συγκρινόταν με αυτή των TG καθαρού ελαίου.

Από το Σχήμα 5.12 προκύπτει ότι η προσθήκη απομονωμένου κλάσματος MPM σε δείγμα ελαίου SNO προκαλεί μικρή αύξηση της υδρόλυσης των κανονικών TG του ελαίου, ενώ δε φαίνεται να επιδρά στην υδρόλυση των οξειδωμένων TG του ελαίου. Η παρατηρούμενη αύξηση της υδρόλυσης δε φαίνεται να παρουσιάζει κάποια συσχέτιση με τη συγκέντρωση των MPM στο έλαιο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή έγινε μελέτη της επίδρασης κάποιων παραπροϊόντων της αλυσίδας: ενδομυϊκής πλάσματος (MPM) που παρατηρήθηκαν πρόσφατα με HPLC-MS (16) στην υδρόλυση και κατεργασία στη βιοκαύσιμα υποκατάσταση των δύο πιο κοινών ελαίων της καθημερινής διατροφής, του ελαιολάδου και του ελάϊου. Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό της μαγειρικής ζωής από το παλιό σιναίτικο ανάμειγμα από το συχνό χρησιμοποιούμενο να είναι η ηλιέλαιο.

Τα συστατικά MPM παρατηρήθηκαν από την ανάλυση ηλιακή απορρόφησης κατάλληλη διαδικασία εκχύλισης. Η ποσότητα που ακολουθήθηκε σύμφωνα με σημαντικό εργαλείο του εργαλείου σε MPM σε σύγκριση με τη ίδια αναλογία. Στη συνέχεια, κάποια MPM ελέγχεται επιδομολογία και από το εμπλουτισμένο εκχυλισμένο με χρωματογραφία HPLC.

Η επίδραση του εκχυλισμένου και απομονωμένου MPM στην υδρόλυση των ελαίων έγινε με δύο μεθόδους της βιοτεχνικής βιοκαύσιμα μεθόδους 2 και 1. Οι δύο αυτές μέθοδοι επιτρέπουν την εύκολη συμπαρακείμενη σχετικά με την επίδραση που μπορούν να έχουν τα παραπροϊόντα της αλυσίδας ανάλογα με τις διαφορετικές συζητήσεις των καθημερινών. Είναι σημαντικό την παρατηρούμενη της επίδρασης των MPM στην απορρόφηση του ελαίου ανάλογα με τα δύο συστατικά θα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή έγινε μελέτη της επίδρασης κάποιων παραπροϊόντων τηγανίσματος ενδιάμεσης πολικότητας (MPM) που παρατηρήθηκαν πρόσφατα με RP-HPLC (16), στην υδρόλυση και κατέπекταση στη δυνατότητα απορρόφησης των δύο πιο κοινών ελαίων της καθημερινής διατροφής, του ελαιολάδου και του ηλιελαίου. Το ελαιολάδο αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό της μεσογειακής δίαιτας, ενώ το ηλιέλαιο είναι ένα από τα συχνά χρησιμοποιούμενα έλαια τηγανίσματος.

Τα συστατικά MPM παραλήφθηκαν από τηγανισμένα ηλιέλαια ακολουθώντας κατάλληλη διαδικασία εκχύλισης. Η πορεία που ακολουθήθηκε οδήγησε σε σημαντικό εμπλουτισμό του εκχυλίσματος σε MPM σε σύγκριση με τα έλαια αναφοράς. Στη συνέχεια, καθαρά MPM κλάσματα απομονώθηκαν από τα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα με χρωματογραφία HPLC.

Η επίδραση του εκχυλισμένου και απομονωμένου MPM στην υδρόλυση των ελαίων έγινε με δύο μεθόδους της τεχνικής pH-stat, τις μεθόδους Β και Γ. Οι δύο αυτές μέθοδοι επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση που μπορούν να έχουν τα παραπροϊόντα τηγανίσματος ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών. Έτσι, επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των MPM στην απορρόφηση του ελαίου ανάλογα με το εάν ο καταναλωτής θα

επιλέξει να ξεκινήσει το γεύμα του με μια σαλάτα ή θα περάσει κατευθείαν στο κυρίως πιάτο.

Η επίδραση του απομονωμένου κλάσματος MPM στην υδρόλυση ελαίου μελετήθηκε επιπλέον με τη μέθοδο HPLC. Με τη μέθοδο αυτή εξάγονται συμπεράσματα για τη συνολική υδρόλυση του ελαίου μετά την πάροδο επιλεγμένου χρονικού διαστήματος. Η επιλογή της χρήσης ανιχνευτού UV-VIS για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των TG του ελαίου επέτρεψε, με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος, το σύγχρονο προσδιορισμό της υδρόλυσης των κανονικών και των οξειδωμένων TG του ελαίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα οξειδωμένα TG υδρολύονται ταχύτερα από την παγκρεατική λιπάση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και σε αυτή τη μελέτη. Δεδομένου ότι τα συστατικά που μπορούν να επηρεάσουν την υδρόλυση του ελαίου βρίσκονται εξ'αρχής στο υπό υδρόλυση μίγμα της αντίδρασης η μέθοδος HPLC προσομοιάζει με τη μέθοδο Γ της pH-stat.

Από τη μελέτη με τις μεθόδους Β και Γ της τεχνικής pH-stat διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα των MPM προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας της παγκρεατικής λιπάσης. Το εκχύλισμα αυτό μπορεί να προκαλέσει μειωμένη υδρόλυση τόσο του SNO όσο και του VOO, με ισχυρότερη επίδραση στο SNO. Έτσι, το εκχύλισμα του MPM περιλαμβάνει συστατικά τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης τόσο κατά την άμεση πρόσληψη ενός ελαίου με εκχυλισμένο MPM (μέθοδος Γ) όσο και κατά την πρόσληψη ενός ελαίου με MPM μετά την κατανάλωση φρέσκου ελαίου και την έναρξη της υδρόλυσης αυτού. Η αναστολή που προκαλείται στο SNO βρέθηκε ότι είναι πιο σημαντική από αυτή του VOO και με τις δύο μεθόδους, ενώ συγχρόνως η επίδραση του εκχυλίσματος MPM ήταν πιο σημαντική με τη μέθοδο Γ σε σχέση με τη Β και για τα δύο έλαια.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με το εκχύλισμα MPM, το απομονωμένο με HPLC κλάσμα MPM δεν παρουσίασε ουσιαστική επίδραση στη δραστηριότητα της παγκρεατικής λιπάσης, κατά τη μελέτη του με τη μέθοδο Γ της pH-stat, τουλάχιστον όχι όταν ήταν παρόν σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε αυτές που θα καταναλώσει κάποιος τρώγοντας μια λογική ποσότητα τηγανισμένου τροφίμου (1 μερίδα τηγανιτές πατάτες). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι άλλα συστατικά του εκχυλίσματος MPM, και όχι

καθεαυτό το MPM, προκαλούν την αναστολή στη δραστικότητα του ενζύμου με τη μέθοδο pH-stat. Βέβαια, δεδομένου ότι τα λοιπά αυτά συστατικά του εκχυλίσματος προσλαμβάνονται κατά την κατανάλωση τηγανισμένων τροφίμων ανεξάρτητα της αρνητικής ή μη επίδρασης των MPMs στη δραστικότητα της παγκρεατικής λιπάσης, είναι αυτονόητο ότι η κατανάλωση τηγανισμένων τροφίμων έχει επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου και την απορρόφηση των ελαίων.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται μερικώς σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την HPLC μέθοδο. Μελέτη της επίδρασης απομονωμένου MPM στην υδρόλυση SNO με τη μέθοδο HPLC υπέδειξε ότι η υδρόλυση των οξειδωμένων TG δεν επηρεάζεται από την παρουσία των MPM ενώ υπάρχει μια οριακή αύξηση της υδρόλυσης των κανονικών TG του ελαίου χωρίς να παρουσιάζεται κάποια αναλογική συσχέτιση με το ποσό των MPM που προστίθεται στο έλαιο.

Μια μερίδα πατάτες έχει βάρος περίπου 150 g, εκ των οποίων το 10% είναι έλαιο που έχει απορροφηθεί. Έτσι, η κατανάλωση μιας μερίδας τηγανιτών πατατών παρέχει περίπου 15 g (ή 16,6 mL) ελαίου τηγανίσματος. Με βάση μελέτη που αφορά στην υποβάθμιση ελαίων τηγανίσματος από εστιατόρια της Αττικής (66) έχει βρεθεί ότι ένα έλαιο που βρίσκεται στο μέσο βαθμό υποβάθμισης φέρει περίπου 41.500 Au*s ανά 15 g ελαίου ή 2,5 Au*s MPM ανά μ L ελαίου. Ένα έλαιο που βρίσκεται στο μέγιστο καταγραφέντα βαθμό υποβάθμισης έχει περίπου 169.000 Au*s ανά 15 g ελαίου ή 10,2 Au*s MPM ανά μ L. Οι τιμές για τα MPM σε έλαια μέσης και μέγιστης υποβάθμισης είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις ποσότητες των MPM που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της εργασίας αυτής (μέγιστη τιμή 9 Au*s MPM ανά μ L με τη μέθοδο HPLC). Δεν είναι γνωστό εάν το MPM ισοκατανέμεται μεταξύ ελαίου τηγανίσματος και τροφίμου. Εάν υποτεθεί ότι το MPM απορροφάται αναλογικά από το τρόφιμο τότε με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής προκύπτει ότι η κατανάλωσή του δεν θα προκαλέσει αναστολή της δράσης της παγκρεατικής λιπάσης. Εντούτοις, τα λοιπά συστατικά του εκχυλίσματος και άρα του τηγανισμένου ελαίου θα αναστείλουν τη δράση του ενζύμου σε ποσοστό εξαρτώμενο από το είδος και από τον τρόπο πρόσληψης της τροφής. Κατανάλωση ενός τροφίμου τηγανισμένου σε μέσης υποβάθμισης ηλιέλαιο θα προκαλέσει περίπου 50% μείωση της

υδρόλυσης του ελαίου (SNO, μέθοδος Γ) ενώ εάν έχει προηγηθεί η κατανάλωση φρέσκου ηλιελαίου η μείωση της υδρόλυσης θα είναι της τάξεως του 30% περίπου (SNO, μέθοδος Β). Σύγχρονη κατανάλωση ελαιολάδου και τηγανισμένου τροφίμου σε ηλιέλαιο μέσης υποβάθμισης θα μειώσει την υδρόλυση του ελαιολάδου κατά 20% (VOO, μέθοδος Γ). Κατανάλωση φρέσκου ελαιολάδου ακολουθούμενη από την κατανάλωση τηγανισμένου τροφίμου σε ηλιέλαιο μέσης υποβάθμισης θα μειώσει την υδρόλυση του ελαιολάδου κατά 15% (VOO, μέθοδος Β). Εάν το ηλιέλαιο βρίσκεται στο μέγιστο της υποβάθμισής του η μείωση της υδρόλυσης θα είναι περίπου 65% κατά την κατανάλωση ενός τηγανισμένου τροφίμου σε SNO (μέθοδος Γ, SNO, σύγκριση με την τιμή των 8 Au*s).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφηση των λιπών και ελαίων και συνεπώς για τη συμμετοχή τους στο ενεργειακό ισοζύγιο είναι η υδρόλυσή τους κυρίως από την παγκρεατική λιπάση. Όπως προκύπτει και από την παρούσα εργασία διάφορα παραπροϊόντα, γνωστής ή μη καθορισμένης μέχρι σήμερα φύσεως, παρόντα στα τηγανισμένα έλαια μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην απορρόφηση των ελαίων καθώς επιδρούν στη δράση του κύριου λιπολυτικού ενζύμου. Τα παραπροϊόντα MPM δε φαίνεται να ενοχοποιούνται για τέτοια δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ανδρικόπουλος Ν.Κ., *Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων (Τόμος Ι)*, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 1-12 και 17-19, **1999**.
2. Eurosciences Communication και Ινστιτούτο Ερευνών, *European Olive Oil Medical Information Library*, Φύλλο Πληροφοριών Αρ.5, **2001**.
3. EC. Off. J. Commission Eur. Communities, Regulation no. 2568/91, **1991**.
4. Boskou D., *Olive Oil Chemistry and Technology*, AOCS Press, **1996**.
5. Μπαλατσούρας Γ.Δ., *Σύγχρονη Ελαιοκομία: Το Ελαιόδενδρο-Το Ελαιόλαδο-Η Επιτραπέζια Ελιά*, Τόμος ΙΙ, Αθήνα, **1997**.
6. Vaclavik V.A., *Essentials of Food Science*, Chapman and Hall, International Thomson Publishing, USA, **1998**.
7. Μπόσκου Δ., *Χημεία Τροφίμων*, 4^η έκδοση, Εκδ. Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 157-159 και 161-163, **1997**.
8. Kathleen W., *Impact of High-Temperature Food Processing on Fats and Oils*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
9. Varela G., Baltasar R.-R., Some Effects of Deep Frying on Dietary Fat Intake. *Nutrition Reviews*, 50:256-262, **1992**.
10. Gertz C., Chemical and Physical Parameters as Quality Indicators of Used Frying Fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102:566-572, **2000**.
11. *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*: Polar Components in Frying Fats. Arlington (VA), AOAC press, Official Method 982.27, Chapter 41.1.34.
12. Dobarganes C., Marquez-Ruiz G., Velasco J., Interactions between fat and Food During Deep-Frying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102:521-528, **2000**.
13. Andrikopoulos Ν.Κ., Tzamtzis V.A., Giannopoulos G.A., Kalantzopoulos G.R., Demopoulos C.A. Deterioration of Some Vegetable Oils. I. During Heating of Frying of Several Foods. *Rev. Franc. Corps Gras*, 36:127-129, **1989**.

14. Marquez-Ruiz G., Tasioula-Margari M., Dobarganes M.C., Quantitation and Distribution of Altered Fatty Acids in Frying Fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72:1171-1176, **1995**.
15. German Society for Fat Science (DGF): 3rd International Symposium on Deep-fat Frying-optimal Operation, 20-21 March 2000, Haagen (Germany) 2000. *European Lipid Science Technology*, 102,594, **2000**.
16. Andrikopoulos N.K. Dedoussis, G.V.Z., Tzamtzis V., Chiou A., Boskou G. Evaluation of Medium Polarity Materials Isolated From Fried Edible Oils by RP-HPLC. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:110-115, **2002**.
17. Δημόπουλος Κ. και Ανδρικόπουλος Ν.Κ., *Διατροφή*, Εκ. Μπιστικέα, 125-128, **1996**.
18. Whitney, Cataldo, Rolfes, *Understanding Normal and Clinical Nutrition*, WEST, Wadsworth, 141-150, **1998**.
19. Krause's, Mahan, Escott-Stump, *Food Nutrition, & Diet Therapy*, 43-51, **2000**.
20. Verger, R., Aoubala, M., Carrière, F., Ransac, S., Dupuis, L., de Caro, J., Ferrato, F., Douchet, I., Laugier, R., de Caro, A. Regulation of Luminal Fat Digestion: Enzymatic Aspects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55:5-18, **1996**.
21. Volhard, F., A New Lipase From the Gastric Juice. *Zeitschrift für Klinische Medizin*, 42:414, **1901**.
22. Hull, M., Keaton, R.W., *Journal of Biological Chemistry*, 32:127, **1917**.
23. Carrière, F., Barrowman, J.A., Verger, R., Laugier, R. Secretion and Contribution to Lipolysis of Digestive Lipases During a Test Meal in Humans: Gastric Lipase Remains Active in the Duodenum. *Gastroenterology*, 105:876-888, **1993**.
24. Guyton A., *Φυσιολογία του Ανθρώπου*, Εκ. Λίτσας, 587-588 και 590-593, **1990**.
25. Χίου Α.Π., *Σύνθεση και Μελέτη Αναστολέων Λιπασών*. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, **2000**.
26. Thirstrup, K., Carrière, F., Hjorth, S., Rasmussen, P.B., Wöldike, H., Nielsen, P.F., Thim, L. One Step Purification and Characterization of

- Human Pancreatic Lipase Expressed in Insect Cells. *FEBS Letters*, 327:79-84, **1993**.
27. Winkler, F.C., D'Arcy, A., Hunziker, W. Structure of Human Pancreatic Lipase. *Nature*, 343:771-774, **1990**.
28. Van der Tilbeurgh, H., Egloff, M-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C. Interfacial Activation of the Lipase-Procolipase Complex By Mixed Micelles Revealed by X-Ray Crystallography. *Nature*, 362:814-820, **1993**.
29. Verger, R., de Haas, G.H., Sarda, L., Desnuelle, P. Purification from Porcine Pancreas of two Molecular Species with Lipase Activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 188:272-282, **1969**.
30. Billek G., Heated Oils - Chemistry and Nutritional Aspects. *Nutrition of Metabolism*, 24 Suppl 1:200-10, **1980**.
31. Narasimhamurthy K., Raina P.L, Long Term Feeding Effects of Heated and Fried Oils on Lipids and Lipoproteins in Rats. *Molecular and Biochemistry*, 195:143-153, **1999**.
32. Arroyo. R., Sánchez-Muniz F.J., Cuesta C., Burguillo F.J, Sánchez-Montero J.M., Hydrolysis of Used Palm Olein and Sunflower Oil Catalyzed by Porcine Lipase. *Lipids*, 31:1133-1139, **1996**.
33. Rogalska E., Ransac S. Verger R. Stereoselectivity of Lipases. II. Stereoselective Hydrolysis of Triglycerides by Gastric and Pancreatic Lipases. *Journal of Biological Chemistry*, **265**:20271-20276, **1990**.
34. Jensen R.G., De Jong F.A., Clark R.M. Determination of Lipase Specificity. *Lipids*, 18:239-252, **1983**.
35. Henderson R.J., Burkow I.C., Millar R.M. Hydrolysis of Fish Oils Containing Polymers of Triacylglycerols by Pancreatic Lipase *In Vitro*. *Lipids*, 28:313-9, **1993**.
36. Yoshida H., Alexander J.C. Enzymatic Hydrolysis *In Vitro* of Thermally Oxidized Sunflower Oil. *Lipids*, 18:611-616, **1983**.
37. Yoshida H., Alexander J.C. Enzymatic Hydrolysis of Fractionated Products from Oils Thermally Oxidized in the Laboratory. *Lipids*, 18:402-407, **1983**.

38. Marquez-Ruiz G., Perez-Camino M.C., Dobarganes M.C. *In Vitro* Action of Pancreatic Lipase on Complex Glycerides from Thermally Oxidized Oils. *Fat science and technology*, 94: 307-311, **1992**.
39. Blumenthal M.M. A new Look at the Chemistry and Physics of Deep-Fat Frying. *Food Technology*, 45:68-71, **1991**.
40. Marquez-Ruiz G., Guevel G, Dobarganes M.C. Applications of Chromatographic Techniques to Evaluate Enzymatic Hydrolysis of Oxidized and Polymeric Triglycerides by Pancreatic Lipase *In Vitro*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:119-126, **1998**.
41. Miyashita K., Takagi T., Frankel E.N. Preferential Hydrolysis of Monohydroperoxides of Linoleoyl and linolenoyl Triacylglycerol by Pancreatic Lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1045:233-8, **1990**.
42. Artman N.R. The Chemical and Biological Properties of Heated and Oxidized Fats. *Advances in Lipid Research*, 7:245-330, **1969**.
43. Dugan L.R Jr. Processing and other Stress Effects on the Nutritive Value of lipids. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 9:181-205, **1969**.
44. Gabriel H.G., Alexander J.C. Nutritional and Metabolic Studies of Distillable Fractions from Fresh and Thermally Oxidized Corn Oil and Olive Oil. *Lipids*, 13:49-55, **1977**.
45. Andrews J., Wendell H.G., Meal J.F., Stein R. Toxicity of Air-oxidized Soybean Oil. *Journal of Nutrition*, 70:1999-210, **1960**.
46. Izaki Y., Yoshikawa S., Uchiyama M. Effects of Ingestion of Thermally Oxidized Frying Oil on Peroxidative Criteria in Rats. *Lipids*, 19:324-331, **1984**.
47. Kok T.S., Harris P.G., Alexander J.C. Heated Canola Oil and Oxidative Stress in Rats. *Nutrition Research*, 8:673-684, **1988**.
48. Nolen G.A., Alexander J.C., Artman N.R., Long Term Rat Feeding Study with Used Frying Fats. *Journal of Nutrition*, 93:337-348, **1967**.
49. Lopez-Varela S., Sánchez-Muniz F.J., Cuesta C. Decreased Food Efficiency Ratio, Growth Retardation and Changes in Liver Fatty Acid Composition in Rats Consuming Thermally Oxidized and Polymerized Sunflower Oil used for Frying. *Food Chemical Toxicology*, 33:181-9, **1995**.

50. Marquez-Ruiz G., Dobarganes M.C. Assessments on Digestibility of Oxidized Compounds from [1-¹⁴C]Linoleic Acid using a Combination of Chromatographic Techniques. *Journal of Chromatography B*, 675:1-8, **1995**.
51. Francisco J., Sánchez-Muniz G., Bastida S., Gonzalez-Munoz M.J. Column and High-Performance Size Exclusion Chromatography Applications to the *In Vivo* Digestibility Study of a Thermoxidized and Polymerized Olive Oil. *Lipids*, 34:1187-1192, **1999**.
52. Màrquez-Ruiz G., Peter-Camino M.C., Dobarganes M.C. Evaluation of Hydrolysis and Absorption of Thermally Oxidized Olive Oil in Non-absorbed Lipids in the Rat. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 37:121-8, **1993**.
53. Marquez-Ruiz G., Tasioula-Margari M., Dobarganes M.C. Quantitation and Distribution of Altered Fatty Acids in Frying Fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72:1171-1176, **1995**.
54. Klaus E. The Effects of a Dietary Oxidized Oil on Lipid Metabolism in Rats. *Lipids*, 34:717-725, **1999**.
55. Porsgaard T., Zhang H., Nielsen R.G., Hoy C.-E. Absorption in Rats of Rapeseed, Soybean, and Sunflower Oils Before and Following Moderate Heating. *Lipids*, 34:727-732, **1999**.
56. Stangl G.I., Nöstelbacher K., Eder K., Kirchgessner M. Chronic Vitamin E Inadequacy and Thermally Treated Oils Affect the Synthesis of Hepatic Metallothionein Isoforms. *European Journal of Nutrition*, 39:112-120, **2000**.
57. Eder K., Stangl G.I. Plasma Thyroxine and Cholesterol concentrations of Miniature Pigs are Influenced by Thermally Oxidized Dietary Lipids. *Journal of Nutrition*, 130:116-21, **2000**.
58. Màrquez-Ruiz G., Dobarganes M.C. Changes in Endogenous Lipid Excretion in Rats Fed Diets containing Non-heated and Thermally Oxidized Olive Oils. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:1069-76, **1992**.
59. Cuesta C., Sánchez-Muniz F.J., Rodriguez A., Varela G. Physico-Chemical Changes in Olive Oil used in repeated Frying and its Impact

- on Blood Lipoproteins in Rats. *Revista Espanola de Fisiologia*, 43:51-6, **1987**.
60. Combe N., Constantin M.J., Entressangles B. Lymphatic Absorption of Nonvolatile Oxidation Products of Heated Oils in the Rat. *Lipids*, 16:8-14, **1981**.
61. Andrikopoulos N.K., Boskou G., Dedousis G.V.Z., Tzamtzis A., Papathanasiou A. Quality Assessment of Frying Oils and Fats from 63 Restaurants in Athens, Greece. *17th International Congress of Nutrition*, 27-31 Aug, Vienna, **2001**.
62. Andrikopoulos N.K., Bruschweiler H., Felber H., Taeschler C. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68:359-364, **1991**.
63. Ανδρικόπουλος Ν.Κ., *Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων (Τόμος II)*, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 1-12, 17-19, **1999**.
64. Martin J.C., Joffre F., Siess M.H., Vernevaunt M.F., Collenot P., Genty M., Sebedio J.L. Cyclic Fatty Acid Monomers from Heated Oil Modify the Activities of Lipid Synthesizing and Oxidizing Enzymes in Rat Liver. *Journal of Nutrition*, 130:1524-30, **2000**.
65. J.C. Martin, Caselli C., Brquest S., Juaneda P., Nour M., Sebedio J.L., Bernard A. Effect of Cyclic Fatty Acid Monomers on Fat Absorption and Transport Depends on their Positioning within the Ingested Triacylglycerols. *Journal of Lipids Research*, 38:1666-79, **1977**.
66. Grandgigard A. Recent Research on the Physiological Effects of Various Types of Compounds Present in Heated Fats. *Annales de la Nutrition et de l' Alimentation*, 342:377-87, **1980**.
67. Alexander J.C., Finley J.W., Schwass (eds) D.E., Xenobiotics in Foods and Feeds, *American Chemical Society*, Washington DC, **1983**.

