

PROCESSI OSSIDATIVI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

Quarantelli A., Righi F., Renzi M., Bonomi A.

INTRODUZIONE

La conservazione dei cereali e di altri alimenti di origine vegetale rappresenta ancora oggi un problema per il quale non è stata individuata una soluzione definitiva e sufficientemente economica. Le perdite di materie prime, che si accumulano durante lo stoccaggio, sono stimate dalla FAO intorno al 10% della produzione mondiale con punte massime oscillanti fra il 30% ed il 50% nei paesi in via di sviluppo.

Una partita di alimenti vegetali è infatti un ecosistema artificiale costituito da un insieme di diverse entità viventi rappresentate dai semi con il loro germe, dai microrganismi infestanti (batteri, lieviti e muffe) e dagli zooparassiti (acari ed insetti). L'insieme è inoltre un eccellente isolante termico in grado di accumulare il calore prodotto dall'ecosistema medesimo.

L'obiettivo primario dello stoccaggio degli alimenti di origine vegetale è pertanto quello di stabilizzare l'ecosistema e la sua attività vitale con la finalità di mantenere il più possibile inalterata l'*energia chimica* accumulata sotto forma di amido, la *frazione azotata* rappresentata dalle proteine, ma soprattutto la *frazione lipidica* costituita da acidi grassi caratterizzati da un elevato grado di insaturazione. Patologie e danneggiamenti della coltura, così come le operazioni di raccolta, stoccaggio e trasformazione possono indurre nella frazione lipidica dei cambiamenti in grado di dare luogo a fenomeni di irrancidimento sia nelle materie prime sia nei prodotti derivati dalle stesse.

Il processo di irrancidimento e le reazioni di degradazione dei lipidi vegetali sono tuttora oggetto di grande interesse per le conseguenze che si ripercuotono negativamente sulla qualità delle materie prime. Particolarmente gravi sono infatti le perdite di valore nutritivo, la riduzione dell'appetibilità e gli effetti negativi che i prodotti dell'ossidazione lipidica possono esercitare sullo stato di salute degli animali.

Caratteristiche dei lipidi vegetali

La componente lipidica degli alimenti di origine vegetale è notoriamente costituita da fosfolipidi e glicolipidi, da cere, cutine e suberine nonché da grassi e da oli. I fosfolipidi e i glicolipidi sono i principali componenti strutturali delle membrane citoplasmatiche, nucleolari e degli organuli cellulari. Le cere, le cutine e le suberine formano il rivestimento protettivo esterno degli organi delle piante superiori. I grassi e gli oli sono sostanze di riserva accumulate dalle piante nei frutti e nei semi durante la crescita, in misura diversa a seconda della specie vegetale. Si trovano inoltre nei pollini, nelle spore e negli organi vegetativi (Huang, 1992).

Queste riserve lipidiche sono rappresentate da trigliceridi e da loro metaboliti o precursori, quali i mono e digliceridi i quali vengono utilizzati come fonte di energia

che le cellule vegetali utilizzano nei periodi di metabolismo attivo (Huang, 1992). Le sostanze grasse sono accumulate all'interno di particelle subcellulari sferiche dette oleosomi o sferosomi aventi un diametro variabile fra 0,6 e 2,0 μm a seconda della specie vegetale. Ciascun corpo lipidico è costituito da una matrice di trigliceridi circondata da uno strato fosfolipidico nel quale sono immerse proteine dette oleosine (Tzen and Huang, 1992). Le cellule più ricche in oli sono generalmente quelle dello strato aleuronico e del germe (Saunders, 1985). Questa naturale compartimentazione dei lipidi all'interno delle cellule e nei diversi tessuti rappresenta di fatto un meccanismo di difesa naturale delle piante nei confronti dell'irrancidimento (Galliard, 1989).

Tutte le molecole lipidiche hanno la caratteristica fondamentale di contenere una o più catene alifatiche di acidi grassi (acidi di lunghezza minima C_8). Esistono quasi 400 di questi acidi ma solo una decina ha una reale importanza sia ai fini nutrizionali, sia ai fini economici in quanto ampiamente disponibili per la produzione industriale degli oli. Prendendo in considerazione le riserve lipidiche localizzate delle piante, fatta eccezione per l'olio di cocco e per i semi di palma, che contengono circa un 50% di acido laurico (C_{12}), e per l'olio di palma, che è ricco di acido palmitico (C_{16} , 45%), gli altri oli vegetali sono dominati dal gruppo degli acidi grassi insaturi con 18 atomi di carbonio (Pehowich, 2000; Chow, 2002). Così, per ogni specie di pianta oleaginosa attualmente utilizzata, più dell'80% del contenuto in acidi grassi è generalmente rappresentato da oleico ($\text{C}_{18:1}$), linoleico ($\text{C}_{18:2}$) e linolenico ($\text{C}_{18:3}$). La stessa predominanza di acidi grassi C_{18} mono-, di-, e tri-insaturi, circa il 60% degli acidi grassi totali, è osservata nei semi dei cereali (Guillaumin, 1982; Galliard, 1989).

Osservazioni analoghe possono essere effettuate anche in merito alla composizione in acidi grassi di fosfolipidi e glicolipidi, che sono costituenti essenziali delle membrane cellulari.

Reattività dei lipidi vegetali

A causa della predominanza di acidi grassi insaturi, i lipidi di origine vegetale risultano più reattivi rispetto a quelli di origine animale caratterizzati da un più elevato contenuto di acidi grassi saturi. Diversamente dagli animali, le piante non possiedono un sistema per trasportare i lipidi fra i diversi comparti dell'organismo; inoltre, la ridotta umidità presente nei semi limita la diffusione dei lipidi fra i vari tessuti (Galliard, 1989). Di conseguenza queste sostanze non vanno incontro a modificazioni di rilievo finché rimangono racchiuse, all'interno della cellula, nel loro tessuto originale. In questa sede si conservano integri fino a quando non vengono innescati i processi biologici legati alla germinazione (Bahri, 2000) oppure quando gli alimenti sono sottoposti a processi di lavorazione che arrecano danno alle particelle contenenti il grasso (Malekian, 2000).

I lipidi non più protetti dalle membrane integre possono infatti entrare in rapporto diretto con l'ossigeno atmosferico, venire dispersi su un'ampia superficie e trovarsi a contatto con tracce di metalli presenti nei tessuti vegetali, che agiscono come catalizzatori del processo di ossidazione. Possono inoltre essere esposti alla luce e ad altri agenti ossidanti esogeni, la cui azione si somma a quella degli enzimi lipolitici *endogeni*, presenti nei tessuti dei semi e a quelli *esogeni* prodotti dai

microorganismi ad essi associati (Gaillard, 1989).

REAZIONI DEI LIPIDI VEGETALI

Le reazioni dei lipidi vegetali durante l'immagazzinamento e la trasformazione possono essere suddivise in *reazioni enzimatiche* e *reazioni non enzimatiche*.

Le reazioni enzimatiche sono coinvolte nei processi di idrolisi, ossidazione ed isomerizzazione dei trigliceridi e degli acidi grassi. Le reazioni non enzimatiche sono limitate alla via ossidativa (autossidazione) ed alla isomerizzazione.

IDROLISI DEI LIPIDI

Gli enzimi responsabili del fenomeno idrolitico a carico dei lipidi sono la *lipasi* ed in minor misura la *fosfolipasi*, la *glicolipasi* e l'*esterasi*.

Azione degli enzimi lipolitici

La maggior parte degli acidi grassi che si trova nei semi e nelle cariossidi è esterificata ad una specifica molecola alcolica, il glicerolo. In condizioni di umidità, temperatura e pH favorevoli, gli enzimi lipolitici si attivano ed idrolizzano, attraverso una reazione di trans-esterificazione, i trigliceridi in acidi grassi liberi, saturi ed insaturi; anche i fosfolipidi sono soggetti a tale trasformazione. Gli enzimi coinvolti sono rispettivamente la **lipasi** e la **fosfolipasi**. Durante le varie lavorazioni, i lipidi dei cereali possono poi essere esposti all'azione delle lipasi di origine microbica, il cui ruolo è tuttavia ancora in discussione (O'Connor, 1992).

Le reazioni catalizzate da questi enzimi comportano, come già accennato, la liberazione di acidi grassi liberi (Takano, 1993) e sono pertanto responsabili dell'incremento dell'acidità che viene frequentemente registrato, durante lo stoccaggio, negli oli estratti dai semi delle oleaginose. Analogamente, un incremento dell'acidità si verifica nei semi danneggiati a seguito della movimentazione meccanica e dell'azione lesiva provocata dagli insetti. La loro rimozione attraverso opportune tecniche di pulitura, prima dell'immissione negli impianti di macinazione, consente di ottenere farine con una componente lipidica stabile e che si conserva più a lungo durante lo stoccaggio (Guillaumin, 1982).

Takano (1993) propone un modello per spiegare il meccanismo di decomposizione operata dalla lipasi sui lipidi della pula di riso. La fosfolipasi D, secondo l'Autore, trasforma in acido fosfatidico la fosfatidilcolina che è la principale componente della membrana degli sferosomi. Questa trasformazione provoca la disintegrazione degli sferosomi e consente il contatto dei trigliceridi, non più protetti dalla membrana, con la lipasi che ne inizia la degradazione, con la creazione di acidi grassi liberi.

Origine delle lipasi

Le lipasi, responsabili della degradazione dei lipidi, possono avere due origini:

Lipasi endogena. La lipasi endogena è stata studiata nei semi di soia, di fagiolo e di ravizzone così come nelle cariossidi del frumento, del sorgo, del riso e dell'avena

(Guillaumin, 1982; Gaillard, 1989; Saunders, 1985). Nel frumento, la lipasi è localizzata principalmente nella crusca e nel germe (Dapron, 1983; Gaillard 1983, 1986; O'Connor, 1992) (Tabella n. 1). Nelle cariossidi dei cereali inoltre sono stati individuati talvolta più di tre isoenzimi della lipasi (Baxter, 1984; O'Connor et al., 1989; Peterson, 1999; Edlin et al., 2002) ed isoenzimi multipli della fosfolipasi che agiscono in diverse posizioni della molecola fosfolipidica (Wang, 2001); esistono tuttavia anche altri enzimi in grado di degradare le molecole lipidiche: nella pula di riso sono stati individuati, oltre a diversi tipi di lipasi e fosfolipasi (A1,A2,B,C,D), anche glicolipasi ed esterasi che agiscono degradando i trigliceridi (Takano, 1993).

La sintesi degli enzimi idrolitici, fra i quali è annoverata la lipasi, è indotta nei cereali da segnali ormonali provenienti dal tessuto embrionale. Tali segnali possono indurre la sintesi delle proteine enzimatiche in toto oppure determinare l'attivazione di proenzimi nello strato aleuronico e apparentemente, in modo parziale, anche nei tessuti dell'endosperma (Tavener et al., 1969; Laidman and Tavener, 1971; Gallie and Young, 1994). È stato osservato come l'attività lipasica permanga nell'avena matura, tanto nella crusca (contenente una elevata percentuale di strato aleuronico) quanto nelle frazioni dell'endosperma (Ekstrand et al., 1992; Hutchinson et al., 1951). Poiché tale attività è stata osservata anche in assenza di processi germinativi (O'Connor et al., 1992; Peterson, 1999; Outinen, 1999), essa è ritenuta come residua dai processi di sintesi lipidica verificatisi durante lo sviluppo dei semi (ad opera appunto della lipasi) ed in parte anche come manifestazione di altre attività biologiche del seme, riferibili ad esempio a meccanismi di difesa (Urquhart et al., 1983).

Per la lipasi del frumento non è stata dimostrata alcuna specificità certa nei confronti dei gruppi acilici; analogamente, nessuna azione enzimatica selettiva è stata individuata durante la lipolisi dell'avena (O'Connor et al., 1992; Heiniö et al., 2002). L'idrolisi dei lipidi dell'avena procede infatti apparentemente senza accumulo di mono- e diacilgliceroli: una volta che i trigliceridi sono accessibili alla lipasi, tutti e tre i gruppi acilici vengono rapidamente convertiti in acidi grassi liberi (Liukkonen et al., 1993). Un dato contrastante deriva tuttavia dallo studio della attività della lipasi dell'avena sull'1,2,3-triisnagoglicerolo, che è stata dimostrata avvenire con una forte specificità posizionale (Yasuhide et al., 1997). L'idrolisi dei lipidi neutri di riserva presenti nell'avena è infatti più veloce di quella di altri cereali; sempre nell'avena scarse sono invece le informazioni sull'idrolisi nei lipidi polari, che appare comunque minima durante la trasformazione e lo stoccaggio (Liukkonen et al., 1992). Al contrario, nell'orzo ed in modo particolare nel malto d'orzo, l'idrolisi dei lipidi polari si verifica rapidamente appena il seme è macinato e la temperatura incrementata. Dati più certi sono disponibili invece per quanto concerne l'azione della fosfolipasi che mostra in tutti i casi una notevole specificità per differenti gruppi acilici (Kaukovirta et al., 1998).

Tabella n. 1 - Attività della lipasi in alcuni cereali ed in alcuni prodotti della molitura.

Alimenti	Attività lipasica (1) µmol ac oleico/hr/g	Attività lipasica (2) µmol ac oleico/hr/g
Frumento	2 - 4,5	—
Farina di frumento	1 - 1,25	—
Crusca di frumento	7	270,7*
Germe di frumento	—	62,6*
Avena	—	96 - 190** 10 - 770***
Avena fioccata	20	—
Sorgo	6	—
Risone	11 - 13	—
Riso brillato	1,25	—
Pula di riso	20 - 30	—

(1) da Galliard, 1989;

(2) altri autori : * da O'Connor, 1992; ** da Peterson, 1999; ***Matlashewsky et al., 1982 e Urquhart;

Lipasi esogena. E' prodotta da microrganismi durante la loro crescita sul seme (Guillaumin, 1982). I semi e le cariossidi al momento della raccolta veicolano infatti una microflora rappresentata principalmente da batteri e muffe, con una piccola percentuale di lieviti.

La temperatura ed il tenore in acqua libera del substrato rivestono una notevole importanza per il loro sviluppo. Batteri e lieviti hanno scarse possibilità di crescita quando, attraverso l'essiccazione, l'umidità dei semi è portata a livelli inferiori al 10 %, (questo corrisponde ad una umidità relativa inferiore al 75% e ad una temperatura intorno a 22°C - Vertucci and Roos, 1990). Questi microrganismi necessitano infatti di una quantità minima di acqua libera per la crescita. I batteri in particolare richiedono un'umidità relativa prossima al 90%, mentre i lieviti non si sviluppano a livelli inferiori all'88%. Queste umidità relative corrispondono a un contenuto di acqua della granella oscillante fra il 15% e il 17%. Tali valori sono ben al di sopra dei normali livelli di umidità previsti per lo stoccaggio nei silos. E' tuttavia dimostrato che le spore di muffe xerofile, cui appartengono alcune specie di *Aspergillus*, possono germinare a livelli di umidità inferiori a quelle sopra riportati (Dragoni et al. 1997). Al contrario, quando i semi sono stoccati in condizioni non ideali, in presenza di ossigeno e di umidità relativa elevata (maggiore al 90%), tutti i microrganismi presenti (batteri, lieviti e muffe) crescono e la produzione di enzimi e di lipasi in particolare risulta accentuata. Pertanto, ad un aumento della umidità dei semi corrisponde la formazione di acidi grassi liberi derivanti in parte dall'azione della lipasi endogena, la cui attività ha luogo a bassi livelli di umidità ed in parte da quella degli enzimi generati dalla microflora contaminante che prolifera in modo ottimale nelle condizioni sopra esposte.

Durante i vari processi di lavorazione e di stoccaggio, i lipidi di riserva dei

semi possono quindi essere esposti in misura diversa alle lipasi microbiche. Tali lipasi, a differenza di quelle endogene, discriminano fra i differenti gruppi acilici e manifestano diverse affinità per gli acidi grassi esterificati al glicerolo (O'Connor et al., 1992; Heiniö et al., 2002).

Fattori che influenzano l'attività della lipasi

L'attività della lipasi è condizionata essenzialmente da umidità, temperatura e pH del mezzo; tuttavia anche il genotipo (Frey and Hammond, 1975) e l'andamento stagionale durante la maturazione della pianta (O'Connor, 1992) possono influenzare l'attività di questo enzima.

Fra questi fattori, l'umidità ed in particolare l'attività dell'acqua riveste un ruolo fondamentale. La presenza di acqua libera determina infatti l'attivazione dell'enzima ed influenza l'equilibrio termodinamico della reazione. Premesso che le diverse lipasi si comportano in modo differente, le acquisizioni inerenti la lipasi microbica fanno supporre che l'attivazione dell'enzima avvenga ad attività dell'acqua decisamente inferiori a 0,3 (Wehtye and Adlercreutz, 1997), essendo sufficienti anche strati singoli o multipli di acqua di adsorbimento intorno all'enzima (Caro et al., 2002). E' sufficiente quindi un'umidità del substrato inferiore al 5% perché si manifesti attività enzimatica (Galliard, 1989). L'effetto sull'equilibrio termodinamico della reazione catalizzata dall'enzima lipasi dipende dal fatto che l'acqua rientra fra i reagenti della reazione stessa. A questo proposito è stato dimostrato che nel range di attività dell'acqua compreso fra 0,2 e 0,3 l'equilibrio della reazione può invertirsi (Svensson et al., 1994). Anche gli altri substrati coinvolti in questa reazione, quali gli acidi grassi liberi, il glicerolo e diversi acilgliceroli ne influenzano tuttavia l'equilibrio, per cui quest'ultimo non può essere stabilito solo sulla base del contenuto in acqua.

Durante la lavorazione dei cereali, l'attività dell'acqua si stabilizza a livelli superiori allo 0,4 per cui l'idrolisi dei lipidi esterificati all'interno dei prodotti enzimaticamente attivi può procedere fino a livelli sensibili. Il tutto, anche in presenza di una maggiore quantità di acqua libera, rimane comunque funzione della concentrazione di substrato, della distribuzione dei substrati fra le fasi acquosa ed oleosa e probabilmente anche della fonte di lipasi presente (Adlercreutz et al., 2002; Ma et al., 2002).

Anche la temperatura ed il pH del mezzo rivestono, come già accennato, un ruolo importante nel determinismo dell'attività lipasica. Nella pula di riso Aizono et al. (1971) hanno riscontrato la massima attività dell'enzima in corrispondenza di una temperatura pari a 37 °C, e ad un pH oscillante fra 7,5 e 8,0.

OSSIDAZIONE DEI LIPIDI

Gli acidi grassi liberi formati in seguito all'azione della lipasi sui trigliceridi, rappresentano un potenziale substrato per un altro enzima, la *lipossigenasi*, caratterizzato da una spiccata azione ossidativa. Sono inoltre molto suscettibili alla autossidazione anche per l'azione catalitica svolta da rame e ferro normalmente presenti in tracce nel medium (Malekian, 2000). Gli acidi grassi insaturi in particolare, sono più sensibili ai fenomeni ossidativi rispetto a quelli saturi e la loro modificazione risulta tanto più

rapida e profonda quanto maggiore è il loro grado di insaturazione. I doppi legami delle catene carboniose, infatti, rappresentano centri reattivi soggetti all'azione di radicali ed enzimi (Barnes and Galliard, 1991; Malekian, 2000). Così, gli acidi grassi mono-, di-, e triinsaturi si decompongono molto rapidamente in idroperossidi instabili, che si degradano a loro volta per dare una mistura complessa di prodotti volatili e non volatili della ossidazione i quali, come tali o in seguito ad ulteriore degradazione, possono arrivare a compromettere l'accettabilità del prodotto.

Azione della lipossigenasi

Con il termine di lipossigenasi si indica un gruppo di isoenzimi presenti in numerosi semi, fra i quali quelli della soia, di alcune varietà di fagioli, dei piselli, delle arachidi e nelle cariossidi dei **cereali**, con particolare riferimento al frumento, avena, orzo e mais. Tale enzima, concentrato soprattutto nel germe, catalizza la reazione di ossidazione non reversibile degli isomeri cis degli acidi grassi polinsaturi contenenti il gruppo 1,4-pentadiene (diene [1,4] – CH = CH – CH – CH = CH –, comunemente chiamato metilene centrale o sistema malonico) formando i rispettivi idroperossidi con doppi legami coniugati cis-trans (Tappel, 1963; Galliard, 1989).

I cereali contengono isoenzimi multipli della lipossigenasi: nell'orzo in via di germinazione sono state determinate le sequenze del cDNA di due isoenzimi aventi attività lipossigenasica (Hamberg and Samuelsson, 1967; Hugues et al., 1994; Van Mechelen et al., 1999; Shiiba et al., 1991). Questi isoenzimi hanno apparentemente diversa specificità di substrato, diversa distribuzione in vari tessuti e producono vari isomeri degli idroperossidi in differenti proporzioni, tuttavia il loro ruolo biologico non è ancora stato determinato con certezza (Feussner and Wasternack, 1998; Schmitt and Van Mechelen, 1997). Recentemente Van der Stelt et al., (2000), hanno ipotizzato che la lipossigenasi intervenga nella sintesi di sostanze necessarie per la difesa dei tessuti vegetali dai patogeni.

Fonti di lipossigenasi

L'enzima lipossigenasi è stato individuato per la prima volta nella soia nel 1932 da Andre e Hou, che ne hanno descritto l'azione sugli acidi grassi. Oggi è risaputo che l'enzima è diffuso fra gli organismi vegetali ed è stato isolato anche da una muffa appartenente al genere *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*). E' abbondante soprattutto nelle leguminose e nei cereali come riportato nella tabella 2.

Tabella n. 2 - attività delle lipossigenasi derivanti da diverse fonti in comparazione con quelle ottenute dalla soia (attività = 100)

Alimenti	Attività lipossigenasica relativa %
Soia	100
Fava	60
Pisello	38
Frumento	0, 5 - 16
Germe di frumento	3 - 5
Orzo	12
Arachidi	1

(da Tappel, 1961).

La soia e il pisello proteico figurano fra le specie vegetali maggiormente studiate (Nicolas, 1981) in funzione del loro elevato contenuto in lipossigenasi.

Nei cereali, il tasso di reazione della lipossigenasi è molto variabile. Dalla tabella n. 3 si evince che l'orzo, così come il frumento, è caratterizzato da una elevata attività della lipossigenasi mentre nella segale e nell'avena l'azione di questo enzima è meno rilevante (Fretzdorff et al., 1986; Lehtinen et al., 2000).

Tabella n. 3. Attività della lipossigenasi di diversi cereali (Lehtinen et al., 2000).

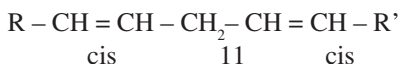
Alimenti	Attività della lipossigenasi (umol/min) / 100 mg di farina
Orzo	1200
Frumento	630
Segale	290
Avena	<50
Malto di avena	<50
Malto di orzo	<50

Attività enzimatica della lipossigenasi

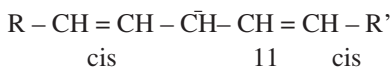
Non è ancora stato accertato se la lipossigenasi è ugualmente reattiva verso gli acidi grassi liberi ed i loro esteri del glicerolo. Alcuni autori, in particolare Guss et al. (1967), ritengono che alcuni isoenzimi della lipossigenasi abbiano affinità per gli acidi grassi liberi polinsaturi, mentre altri isoenzimi siano più inclini ad ossidare le forme esterificate degli stessi acidi presenti nelle molecole di trigliceridi.

L'azione catalitica della lipossigenasi si esplica prevalentemente sugli isomeri naturali degli acidi grassi linoleico, linolenico ed arachidonico. La sequenza a quattro fasi che descrive l'attività di questo enzima è stata proposta da Tappel (1961) e completata da Hamberg e Samuelson (1967).

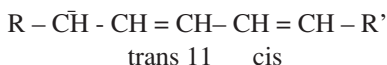
Un acido dienico a struttura malonica, insaturato e nella forma *cis* è la molecola di partenza:



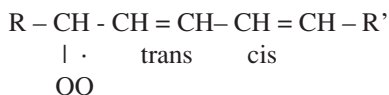
1- Nella prima fase un atomo di idrogeno viene eliminato dal carbonio del gruppo metilenico centrale in posizione 11:



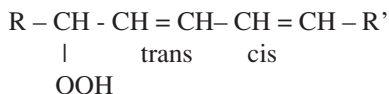
2- Nella seconda fase si verifica una isomerizzazione *cis-trans* del doppio legame ed una coniugazione:



3- Una molecola radicalica di ossigeno $\bar{O} - \bar{O}$ è poi inserita in posizione 13:



4- L'ultima fase comporta l'inserimento di un idrogeno nel radicale perossilico, con formazione di un **idroperossido**:



Acido 13-idroperossioctadecaenoico, per esempio.

La reazione continua poi in condizioni aerobiche o anaerobiche e gli idroperossidi possono dare luogo ad altri prodotti. Il passo successivo porta infatti alla decomposizione od alla conversione enzimatica degli idroperossidi in una varietà di acidi grassi ossidati (Gardner, 1979; Gardner, 1988). L'*esanale* è generalmente riconosciuto come uno dei maggiori componenti responsabili dell'odore che si sviluppa nella pula di riso durante lunghi periodi di stoccaggio (Yamamoto et al., 1980).

Il ferro (Fe) presente come coenzima nella lipossigenasi sembra essere coinvolto nel trasferimento di elettroni durante l'incorporazione dell'ossigeno negli acidi grassi insaturi contenenti il sistema cis,cis- 1,4- pentadiene. La lipossigenasi deve essere nella forma ossidata (Fe^{3+}) affinché la reazione di ossidazione possa procedere. La forma ossidata della lipossigenasi può infatti catalizzare la rimozione stereospecifica di idrogeno da uno specifico carbonio (ad esempio: gruppo metilenico C-11 dell'acido linoleico o dell'acido linolenico) degli acidi grassi (O'Connor and O'Brien, 1991). Si forma così un radicale e la lipossigenasi è ridotta alla forma Fe^{2+} (Gardner, 1988).

Cinetica della reazione di ossidazione enzimatica

Il tasso di ossidazione dell'acido linoleico da parte della lipossigenasi, dopo una brevissima fase di induzione, aumenta rapidamente e costantemente prima di crollare. Questo decremento è dovuto da un lato all'esaurimento del substrato e dall'altro all'inibizione competitiva esercitata dagli idroperossidi generati dall'enzima. I tassi di reazione sono sostenuti e dipendono da diversi parametri. I più importanti sono il pH, la temperatura e la presenza di attivatori ed inibitori.

pH e temperatura. Il pH ottimale per molte lipossigenasi vegetali è compreso fra 6 e 7 e varia leggermente in dipendenza del tipo di substrato e del suo grado di dispersione. Le temperature ottimali per l'attività delle lipossigenasi, estratte dal fagiolo volgare, dalla soia e dall'orzo, sono pari a 25, 30 e 40°C rispettivamente. Oltre i 50° C tuttavia, la lipossigenasi viene inattivata per denaturazione. Dal punto di vista tecnologico questo rappresenta una importante opportunità. Processi di lavorazione che prevedono il ricorso

a trattamenti termici (pellettatura, fiaccatura, estrusione) portano alla inibizione od alla distruzione degli enzimi senza eccessivi rischi o degradazione dei lipidi, proteine e carboidrati degli alimenti trattati (Guillaumin, 1982).

Attivatori ed inibitori. Fra gli attivatori della lipossigenasi gli ioni Ca^{++} sono considerati quelli più efficaci nell'accentuare l'azione ossidante nei confronti degli acidi grassi polinsaturi (Tappel, 1963). Secondo Berry et al., (1997) anche l'elevata concentrazione di ossigeno è in grado di incrementare l'attività dell'enzima.

L'azione inibente della lipossigenasi è fortemente manifestata dagli antiossidanti fenolici. Tuttavia l'impiego di appropriati antiossidanti, siano essi di sintesi (BHA; BHT; Etossichina) o naturali (es. tocoferoli) può ritardare il progredire dell'irrancidimento ossidativo provocato da particolari processi di lavorazione. Anche l'acido nordiidroguaiaretico (N.D.G.A.) è considerato molto attivo (Nicolas and Dapron, 1977). Altri inibitori sono stati descritti: mono-alcool, composti contenenti gruppi tiolici (cisteina, glutatione), perossido d'idrogeno (molto attivo) e sistemi che portano alla perturbazione dell'equilibrio esistente a livello molecolare fra gli enzimi, il loro substrato ed il loro prodotto.

Conseguenze delle reazioni operate dalla lipossigenasi

L'attività dell'enzima lipossigenasi, così come quella della lipasi, risultano incrementate negli alimenti che hanno subito particolari alterazioni strutturali durante le operazioni di stoccaggio e di lavorazione. La contemporanea presenza di aria favorisce inoltre un rapido aumento dell'azione lipossigenasica.

A causa dell'azione della lipasi, le porzioni di seme danneggiate tendono ad essere altamente acide e forniscono un ambiente chimico favorevole alla azione della lipossigenasi, la quale determina la formazione di idroperossidi. Questi ultimi in seguito si degradano con formazione di prodotti volatili e non volatili. Per le trasformazioni cui dà luogo, la lipossigenasi può quindi influenzare il colore, l'aroma (off-flavors nei cereali stoccati e negli alimenti proteici conservati) e le proprietà nutritive degli alimenti. Si verifica infatti una distruzione di pigmenti (provitamina A) e di vitamine, E in particolare, una perdita di acidi grassi essenziali polinsaturi (acido linoleico soprattutto), una alterazione degli aminoacidi solforati ed una interazione dei prodotti enzimatici con alcuni aminoacidi essenziali che abbassa la qualità delle proteine (Richardson and Hyslop, 1985; Galliard, 1989).

Sottoprodotti della ossidazione enzimatica

Gli idroperossidi, prodotti dagli acidi grassi polinsaturi per azione dell'enzima lipossigenasi, sono instabili e mantengono la loro identità chimica solo per breve tempo prima di essere modificati secondo numerose vie. Generalmente si considerano due possibili pathways di rottura radicalica.

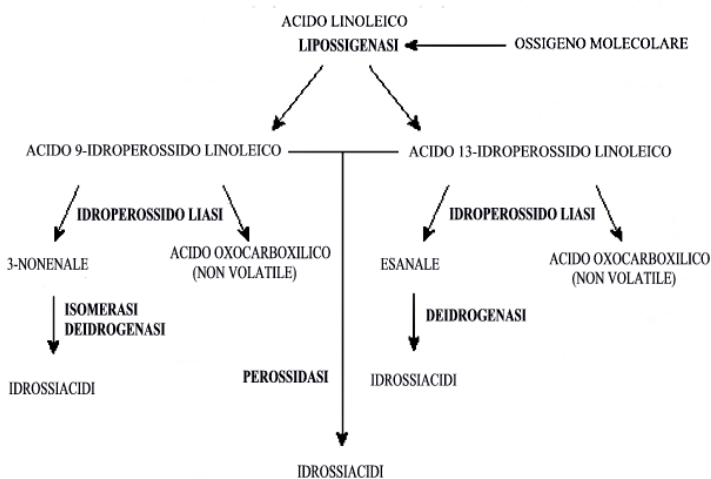
La prima comporta la degradazione dei prodotti iniziali in catene carboniose più brevi. Tale degradazione porta alla formazione di composti carbonilici volatili, principalmente aldeidi α -eniche o dieniche individuabili, per il loro sapore ed odore, anche a basse dosi. Queste aldeidi, insieme con altri prodotti volatili della degradazione, sono il principale indicatore dell'avvenuto irrancidimento dei grassi.

La seconda pathway porta alla formazione di composti non volatili; monomeri con gruppi secondari ossigenati e diversi tipi di polimeri: polari ed apolari, legati da

ponti che possono o meno contenere atomi di ossigeno. Anche se più stabili degli idroperossidi, questi composti non sono completamente inerti e possono andare incontro a cambiamenti col tempo. Possono trasformarsi spontaneamente oppure sotto l'influenza di altri attacchi ossidativi dare luogo a prodotti di degradazione volatili e non volatili. La comparsa di questi composti negli alimenti è generalmente considerata deleteria.

Diversi enzimi entrano nel processo di degradazione degli idroperossidi (figura 1): l'idroperossido-liasi è responsabile della produzione di aldeidi ed aldeidi acide; l'isomerasi produce acidi grassi epossiidroxiacici che sono idrolizzati ad acidi grassi triidrossiacici; l'idroperossido-isomerasi produce α -cheti e γ -cheti acidi grassi; infine, una idroperossido-ciclastasi produce acido 12-oxo-fitosienoico, un precursore dell'acido jasmonico, importante fitormone (Royo et al., 1996).

Figura n. 1. Schema semplificato delle reazioni che si verificano durante l'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico nei cereali (da Noordermeer et al., 2001 e Biermann et al., 1980, modificato).



AUTOSSIDAZIONE

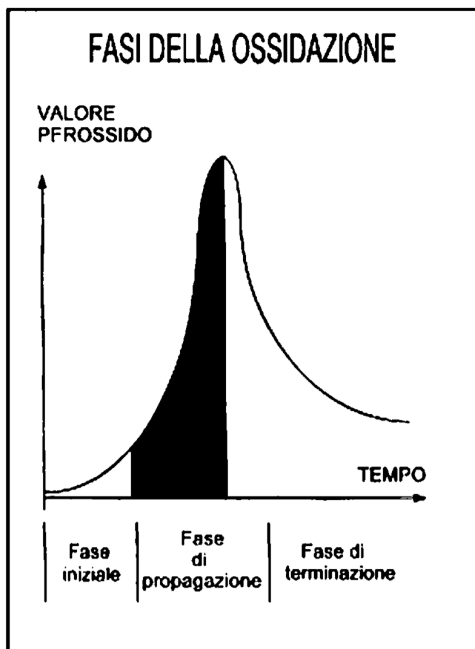
L'ossidazione spontanea dei grassi sotto l'influenza dell'ossigeno presente nell'aria, o autoossidazione, è un fenomeno estremamente diffuso nei lipidi dei vegetali. Tutti gli acidi grassi insaturi sono coinvolti. I prodotti della autoossidazione dei grassi, come quelli della ossidazione enzimatica, hanno il fondamentale inconveniente di alterare in maniera considerevole le proprietà organolettiche del prodotto.

Le reazioni che si verificano durante l'autoossidazione dei grassi sono piuttosto complesse e danno origine ad una grande varietà di molecole presenti, talvolta, solo in tracce. In primo luogo si verifica la formazione di idroperossidi, poi di prodotti volatili quali la CO_2 , prodotti di degradazione legati alla attività fisica dell'energia luminosa e prodotti di ricombinazione degli acidi grassi. Infine si verifica la formazione di composti non volatili: monomeri ossidati, polimeri ed ossipolimeri degli acidi grassi.

Meccanismo della autossidazione

Gli idroperossidi sono il prodotto fondamentale primario della autossidazione; infatti, la loro decomposizione ha effetti biologici importanti e causa alterazioni dell'aroma degli alimenti contenenti grassi (Malekian, 2000). Gli idroperossidi si formano continuamente durante il processo autossidativo che procede attraverso una ben nota reazione a catena descritta da Farmer (1942) e, più recentemente, da Frankel (1984). Tale reazione passa attraverso una fase iniziale in cui il tasso di trasformazione è ridotto (iniziazione), seguita da una fase successiva più rapida (propagazione) cui fa seguito un rapido declino (terminazione) del processo (figura 2).

Figura n. 2. Grafico rappresentante il livello di idroperossidi durante le fasi di iniziazione, propagazione e terminazione.



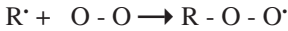
Nella fase di **iniziazione**, un idrogeno radicalico viene rimosso da un gruppo metilico. Tale gruppo metilico è posizionato a livello di un doppio legame della catena dell'acido grasso R con formazione di un radicale alchene R[•]:



Questa fase viene accelerata dalla temperatura, dalla luce o dalla presenza di tracce di ferro e rame che agiscono come catalizzatori a concentrazioni molto basse.

L'autossidazione dei lipidi può essere rallentata considerevolmente od anche arrestata per un certo periodo tempo, se lo stoccaggio è effettuato a basse temperature, in assenza di luce, in presenza di sostanze ad azione chelante nei confronti degli ioni metallici ed in presenza di antiossidanti naturali (α , γ e δ tocoferolo) e sintetici (composti fenolici).

Durante la fase di **propagazione** il radicale alchene reagisce con una molecola di ossigeno e da luogo ad un radicale idroperossido:



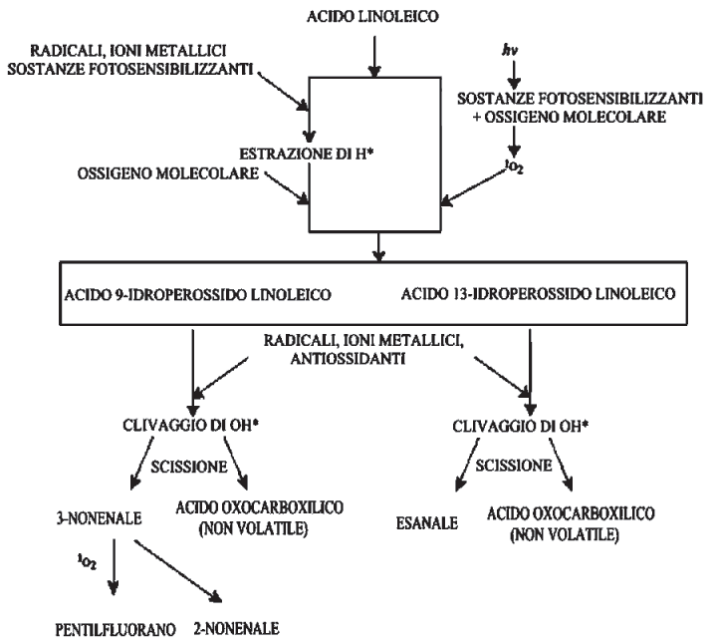
Il radicale reagisce poi con un atomo di idrogeno di un gruppo metilico posto in posizione α rispetto ad un doppio legame:



Il nuovo radicale alchene può quindi reagire con molecole di ossigeno riattivando il ciclo precedentemente descritto. Queste reazioni sono rapide per cui in presenza di elevate quantità di ossigeno numerose molecole sono facilmente trasformate. La reazione avrà termine con la completa trasformazione dei substrati - **terminazione**- (Frankel, 1984; Lehtinen, 2003).

Al termine della reazione ossidativa descritta, il livello dei perossidi accumulati nell'alimento decresce col tempo. Tale riduzione è conseguente alla rottura omolitica degli acidi grassi ossidati con formazione di aldeidi, chetoni, acidi organici, idrocarburi di lunghezza variabile, polimeri e numerosi altri composti, molti dei quali non sono ancora stati ben isolati e caratterizzati (Ottaviani, 1977).

Figura n. 3. Schema semplificato delle reazioni che si verificano durante l'ossidazione non enzimatica dell'acido linoleico nei cereali (da Min and Boff, 2002, modificato). Oltre agli idroperossidi 9 e 13, per foto-ossidazione dell'acido linoleico si formano anche gli idroperossidi 10 e 12.



Evoluzione degli idroperossidi

In assenza di attività enzimatica, che come tale comporterebbe un accumulo di idroperossidi, il tasso di decomposizione di queste molecole è determinato dalle condizioni fisico-chimiche del mezzo ovvero dalla presenza di fattori in grado di incrementare o ridurre la loro reattività (Nishiike et al., 1999; McClements and Decker, 2000; Mäkinen et al., 2000). Nei cereali stoccati, gli idroperossidi si evolvono principalmente in prodotti di rottura o scissione. Il processo ossidativo dei lipidi può tuttavia portare anche alla formazione di composti polimerici. Questi ultimi si originano principalmente a partire dagli acidi grassi altamente insaturi od in seguito a stress termici di notevole entità (Shukla and Perkins, 1991; Neff et al., 1988).

La rottura degli idroperossidi, favorita da molecole radicaliche e ioni metallici, porta alla formazione di diverse sostanze, volatili e non volatili (Figura 3). L'acido oxocarbossilico è la principale molecola non volatile originata, mentre fra i composti volatili, nei cereali stoccati, molto rappresentato è il pentilfluorano, principale prodotto di rottura dell'acido 9 idroperossido linoleico. Le aldeidi 2- e 3- nonenale sono invece rilevate a livelli molto bassi (Sjövall et al., 2000; Heiniö et al., 2001). All'esanale è in genere attribuito un ruolo nel determinare l'alterazione dell'aroma degli alimenti vegetali durante lo stoccaggio (Yamamoto et al., 1980).

CONCLUSIONI

Lo sviluppo della rancidità con la risultante perdita di qualità e accettabilità, può verificarsi negli alimenti di origine vegetali a seguito di processi di degradazione della quota lipidica che si instaurano nelle diverse fasi della raccolta, dello stoccaggio e della lavorazione.

In questo studio la rancidità è intesa come un fattore che influenza negativamente la qualità, derivante direttamente o indirettamente dalle reazioni dei lipidi endogeni, che causano sapori, odori e proprietà funzionali indesiderabili o inaccettabili.

In tutti gli alimenti vegetali, i lipidi contengono una importante quota di acidi grassi polinsaturi che notoriamente sono suscettibili a fenomeni di tipo idrolitico ed ossidativo. Tali processi degradativi assumono entità differenti a seconda delle condizioni di stoccaggio e di lavorazione adottate.

Fra gli agenti che portano all'irrancidimento dei grassi è stato valutato il ruolo svolto dagli enzimi lipasi e lipossigenasi nonché dal fenomeno ossidativo non enzimatico.

Gli enzimi lipasi e lipossigenasi sono presenti in misura variabile negli alimenti vegetali a seconda della specie di appartenenza e la loro attività è condizionata dall'umidità, dalla temperatura e dal pH del mezzo nonché dai processi di lavorazione che consentono il contatto fra l'enzima e il substrato lipidico così come dalla presenza di fattori ad azione attivante ed inibente.

In particolare, i fattori che sono in grado di favorire i processi ossidativi possono essere così riassunti:

- *qualità delle materie prime*: sementi sottoposte a clima umido prima della raccolta, contaminate con microrganismi lipolitici (quali ad esempio i funghi), o danneggiate

fisicamente risultano ovviamente scarsamente stabili ai fini della conservazione;

- condizioni di stoccaggio - temperatura: oltre ad agire sulla cinetica molecolare comportando una riduzione della stabilità dei composti, temperature elevate facilitano la diffusione degli oli incrementando così i processi lipolitici enzimatici; - attività dell'acqua: l'enzima lipasi agisce anche ad umidità inferiori al 5%, non necessitando praticamente di acqua libera per svolgere attività idrolitica. La lipossigenasi è in grado di determinare il processo ossidativo a bassissima attività dell'acqua (0,25); - atmosfera: i processi ossidativi sono pressochè annullati solo a concentrazioni di ossigeno inferiori all'1% (molto costose da ottenere e mantenere), mentre l'irrancidimento idrolitico non viene arrestato nemmeno dallo stoccaggio in gas inerti;

- processi di lavorazione: trattamenti termici: generalmente l'inattivazione degli enzimi responsabili dell'irrancidimento avviene attraverso il calore. Lo stesso dovrebbe tuttavia essere applicato in modo tale da annullare l'azione degli enzimi senza eliminare gli antiossidanti in grado di prevenire il processo di ossidazione non enzimatica. Se il calore porta ad una redistribuzione dei lipidi e ad una parziale distruzione degli antiossidanti, la frantumazione determina un incremento della superficie esposta all'azione dell'ossigeno. Macinazione: - dimensioni delle particelle: particelle di dimensioni ridotte sono più soggette ad irrancidimento idrolitico ed ossidativo sia per una maggiore superficie esposta all'aria che per un maggior contatto fra enzimi e lipidi ridistribuiti. Miscelazione: ingredienti miscelati si degradano più rapidamente dei singoli ingredienti, in quanto frequentemente uno apporta il substrato e l'altro il catalizzatore; esempi sono dati dalla commistione di crusca e germe, miscele fra prodotti ricchi di oli e fonti di lipasi, materiali contenenti acidi grassi liberi e fonti di lipossigenasi, oppure materie contenenti catalizzatori della ossidazione non enzimatica (es. Fe, Cu). Aggiunta di inibitori: non esistono inibitori della lipasi idonei ad essere introdotti negli alimenti. L'utilizzo di appropriati antiossidanti, siano essi sintetici (es. BHA) o naturali (es. vanillina) durante le lavorazioni con impiego di calore può eventualmente ritardare il progredire dell'irrancidimento ossidativo.

RIASSUNTO

L'elevato contenuto in acidi grassi insaturi rende i lipidi vegetali particolarmente suscettibili ai fenomeni degradativi. Tali processi, che hanno luogo principalmente durante lo stoccaggio e la lavorazione degli alimenti di origine vegetale, sono rappresentati da idrolisi ed ossidazione. La via idrolitica è sostenuta dall'enzima lipasi, che può essere di origine endogena od esogena se derivante da muffe e batteri. L'azione dell'enzima si estrinseca nella formazione di acidi grassi liberi. La via ossidativa può essere di tipo enzimatico o non enzimatico. Nel primo caso è sostenuta dall'enzima lipossigenasi, particolarmente attivo nei semi delle leguminose; nel secondo caso, il processo ossidativo viene definito "autossidazione" e risulta accentuato dalla presenza di ossigeno, di molecole radicaliche, di ioni metallici, di elevate temperature e di energia luminosa. I principali prodotti della ossidazione sono gli idroperossidi, i quali sono soggetti ad ulteriore degradazione per azione enzimatica o per influenza di fattori fisico-chimici. L'insieme dei processi determina una perdita del valore nutritivo

degli alimenti e la neo formazione di diverse molecole, anche volatili, che si rendono responsabili del così detto irrancidimento della componente lipidica degli alimenti vegetali. Questi fenomeni, deleteri per la qualità dei medesimi, possono essere considerevolmente ridotti attraverso una valutazione oculata delle materie prime, delle condizioni di stoccaggio e delle tecniche di lavorazione.

Parole chiave: alimenti vegetali, lipidi vegetali, lipasi endogena ed esogena, lipossigenasi, autossidazione, rancidità.

SUMMARY

The high unsaturated free fatty acid content makes vegetal lipids particularly susceptible to degradation process. These processes, which take place mainly during storage and the processing of vegetal feeds, are represented by hydrolysis and oxidation. The hydrolysis is carried by lipase enzyme, which can be of endogenous origin or exogenous if derived from mould or bacteria. The enzyme action determines free fatty acid formation. The oxidative way can be enzymatic or non enzymatic. In the first case it is carried by lipoxygenase, active especially in legume seeds; in the second case, the oxidative process is defined "autoxidation" and is increased by the presence of oxygen, radicalic molecules, metal ion, high temperature and light energy. The main products of oxidation are hydroperoxides, that are susceptible to further degradation by enzymatic action or under the influence of physical or chemical factors. The whole process determines a loss of nutritional value of feeds and the formation of different molecules, also volatile, which are responsible for the "rancidity" of fat in vegetal feed. These processes, detrimental for their quality, can be notably reduced by a careful evaluation of the raw materials, of the storage condition and of the processing techniques.

Keywords: vegetal feed, vegetal fat, endogenous and exogenous lipase, lipoxygenase, autoxidation, rancidity.

BIBLIOGRAFIA

- Adlercreutz D., Budde H. and Wehtje E., 2002. Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology And Bioengineering*, 78(4), 403-411.
- Aizono Y., Funatsu M., Hayashi K., Inamasu M., Yamaguchi M., 1971. Biochemical studies of rice bran lipasi. Part II. Chemical properties. *Agricultural Biological Chemistry*, 35(12), 1973-1979.
- Andre E., Hou K.W., 1932. C.R. Académie des Sciences, p.645 (1932) et C.R. Académie des Sciences, 172.
- Bahri S., 2000. Lipase activity in germinating sunflower seedlings. *Biochemical Society Transaction*, 28(6), 771-773.

- Barnes P. and Galliard T., 1991. Rancidity in cereal products. *Lipid Technology*, 3:23-28.
- Baxter E.D., 1984. Recognition of two lipases from barley and green malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(4), 277-281.
- Berry H., Debat H., Larreta-Garde V., 1997. Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent. *FEBS Letters*, 408, 324-326.
- Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D.V., Attwool P. and Graille J., 2002. Plant lipases: biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(6), 693-703.
- Chow M.C. and Ho C.C., 2002. Chemical composition of oil droplets from palm oil mill sludge. *Journal of Palm Research*, 14 (1), 25-34.
- Dapron R., 1983. Characteristics of lipolytic activity in cereal products. *Proc. 7th World Cereal Bread Congr.* J. Holas, ed. Elsevier: Amsterdam.
- Dragoni I. e Cantoni C., Vallone L., Papa A., 1997. Condizioni generali di sviluppo delle muffe. In *Muffe Alimenti e Micotossicosi*. Città Studi Edizioni.
- Edlin D.A.N, Kille P., Sauders C.M., Jones H.D. and Harwood J.L., 2002. Study of wheat transformed with sense and anti-sense lipase genes. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases with primary accession number Q8L5T0.
- Ekstrand B., Gangby I. and Akesson G., 1992. Lipase activity in oat – distribution, pH dependence and heat inactivation. *Cereal Chemistry*, 69, 379-381.
- Farmer E.H., 1942. *J.Am.Chem.*, 500, 121.
- Feussner I. and Wasternack C., 1998. Lipoxygenase catalysed oxygenation of lipids. *Lipid-Fett*, 100(4-5), 146-152.
- Frankel E.N., 1982. Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22,1.
- Frankel E.N., 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 61 (12): 1908-1916.
- Fretzdorff B. and Jördens A., 1986. Vergleichende Untersuchungen zur Substratspezifität, Aktivierung und Inaktivierung von Lipoxygenasen in Getreideextrakten. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 19, 437-442.

- Frey K.J. and Hammond E.G., 1975. Genetics, characteristics, and utilization of oil in caryopses of oat species. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 358-362.
- Lehtinen P., Kaukovirta-Norja A. and Laakso S., 2000. Variation in lipid oxidation rates in cereals - a result of lipoxygenase enzyme activity or lipid availability? In 2nd European Symposium on Enzymes in grain Processing. Ed Simoinen T. and Tenkanen M., VTT Biotechnology, Espoo, 257-260.
- Galliard T., 1983. Enzymic degradation of cereal lipids. Pages 111-147 in: *Lipids in Cereal Technology*. P.J. Barnes, ed. Academic press: London.
- Galliard T., 1986. Oxygen consumption of aqueous suspensions of wheat wholemeal, bran and germ: Involvement of lipase and lipoxygenase. *J. Cereal Sci.*, 4, 33-50.
- Galliard T. Rancidity in cereal products. In: Allen JC, Hamilton RJ, eds. *Rancidity in foods*. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1989, 141-5.
- Gallie D.R. and Young T.E., 1994. The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplast. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions of expression. *Plant Physiology*, 106(3), 929-939.
- Gardner H.W., 1979. Lipid enzymes: lipases, lipoxygenase and "hydroperoxidases". In *Autooxidation in Food and Biological Systems*. Simis M.G. and M.Karel (eds). Plenum Press. New York and London, 447-504.
- Gardner H.W., 1988. Lipoxygenase pathway in cereals. In *Advances in Cereal Sciences and Technology*, Pomeranz Y., ed. Volume IX, American Association of Cereal Chemists, St.Paul, MN. 161-215.
- Guss P.L., Richardson T., Stahmann M.A., 1967. *Cereal Chem.*, 607.
- Guillamin R., 1982. The metabolism of lipids -enzimatic and non-enzymatic autoxidation -. In *PRESERVATION AND STORAGE OF GRAINS, SEED AND THEIR BY-PRODUCTS*. Cereals, oilseeds, pulses and animal feed. Lavoisier Publishing Inc.
- Hamberg M., Samuelson B., 1967. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J.Biol.Chem.*, 242, 5329.
- Heiniö R.L., Lehtinen P., Oksman-Caldentey K.M. and Poutanen K., 2002. Differences between sensory profiles and development of rancidity during long-term storage of native and processed oat. *Cereal Chemistry*, 79, 367-375.
- Heiniö R.L., Oksman-Caldentey K.M., Latva-Kala K., Lehtinen P and Poutanen K., 2001. Effect of drying treatment conditions on sensory profile of germinated oat. *Ce-*

real Chemistry, 78(6), 707-714.

- Huang A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosin in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43, 177-200.

- Hugues M., Boivin P., Gaillard F., Nicolas J., Thiry J.M. and Richard-Forget F., 1994. Two lipoxigenases from germinated barley-heat and kilning stability. *Journal of Food Science*, 59(4), 885-889.

- Hutchinson J., Martin H. and Moran T., 1951. Location and destruction of lipase in oats. *Nature*, 167, 758-759.

- Kaukovirta-Norja A., Kotiranta P., Aurola A.M., Reinikainen P., Olkku J., and Laakso S., 1998. Influence of water processing on the composition, behavior, and oxidizability of barley and malt lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1556-1562.

- Laidman D.L. and Tavener R.J.A., 1971. Triglyceride mobilization in germinating wheat grain. *Biochemical Journal*, 124(2), 4-5.

- Lehtinen P., 2003. Reactivity of lipids during cereal processing. *Applied Biochemistry and Microbiology Report I/2003*.

- Liukkonen K.H., Montfoort A. and Laakso S., 1992. Water-induced lipid changes in oat processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 126-130.

- Liukkonen K., Kaukovirta N. and Laakso S., 1993. Elimination of lipid hydrolysis in aqueous suspension of oat flour. *Journal of Cereal Science*, 17, 255-265.

- Loury M., 1967. Journée d'étude sur l'altération oxidative des corps gras. *ITERG, Marseille*, 11.

- Ma L., Persson M., Adlercreutz P., 2002. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 1024-1029.

- Mäkinen M. and Hopia A., 2000. Effects of α -tocopherol and ascorbyl palmitate on the isomerization and decomposition of methyl linoileate hydroperoxides. *Lipids*, 35(11), 1215-1223.

- Mäkinen M., Kamal-Eldin A., Lampi A.M. and Hopia A., 2001. α -, γ - and δ -Tocopherols as inhibitors of isomerization and decomposition of *cis,trans* methyl linoleate hydroperoxides, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(5), 286-291.

- Malekian F., Rao R.M., Prinyawiwatkul W., Marshall W.E., Windhauser M., Ahmedna M., 2000. Lipase and Lipoxigenase Activity, Functionality, And Nutrient Losses in Rice Bran During Storage. LSU AgCenter Research & Extension, Bulletin Number 870.
- McClements D.J. and Decker E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
- Naudet M., 1967. Journée d'étude sur l'altération oxydative des corps gras. ITERG, Marseille, 25.
- Neff W.E., Frankel E.N. and Fujimoto K., 1988. Autoxidative dimerization of methyl linoleate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(4), 616-623.
- Nicolas J., Dapron R., 1977. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, p. 284.
Nicolas J., 1981. Etude des effets d'enzymes d'oxydoréduction en panification. Thesis, Paris.
- Nishiike T., Ichikawa J., Kikugawa N., Takamura H., Matoba T., 1999. Effects of amino acids, sugars, and ascorbic acid on the stability of linoleic acid hydroperoxide in the water phase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(11), 1997-2000.
- O'Connor T.P. and O'Brien N.M., 1991. Significance of lipoxygenase in fruits and vegetables. In *Food Enzymology*. Fox P.F. (ed). Elsevier Science Publishing Co., Inc.N.Y., 338-364.
- O'Connor J., Perry H.J. and Harwood J.L., 1989. Solubilization and studies of cereal lipases. *Biochemical Society Transaction*, 17(4), 687-688.
- O'Connor J., Perry H.J. and Harwood J.L., 1992. A comparison of lipase activity in various cereal grains. *Journal of Cereal Science*, 16, 153-163.
- Ottaviani P., 1977. Etude de quelques produits d'altération, thermooxydative des corps gras. Thesis, Marseille.
- Outinen M., 1999. Effect of malting on oat lipids. M.Sc Thesis, TKK.
- Pehowich D.J., Gomes A.V. Barnes J.A., 2000. Fatty acid composition and possible health effects of coconut constituents. *West Indian Med. J.*, 49(2), 128-133.
- Peterson D.M., 1999. Lipase activity and lipid metabolism during oat malting. *Cereal Chemistry*, 76(1), 159-163.

- Prevot A., 1971. Journée d'Etude sur quelques aspects analytiques des problèmes d'autoxydation. ITERG, Marseille, 26.
- Richardson T. and Hyslop, 1985. Enzymes. In Food Chemistry. Fennema, O.R. (ed). Marcel Dekker Inc., NY 2nd ed., p 447.
- Royo J., Vancanney T.G., Perez A.G., Sanz C., Stormann K., Rosahl S. and Sanchez-Serrano J.J., 1996. Characterization of three potato lipoxygenase with distinct activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. Journal of Biological Chemistry, 271(35), 21012-21019.
- Saunders, R.M., 1985. Rice bran: composition and potential food sources. Food Review International. 1(3): 465-495.
- Schmitt N.F. and Van Mechelen J.R., 1997. Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. Plant Science, 128(2), 141-150.
- Shiiba K., Negishi Y., Okada K. And Nagao S., 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ. Cereal Chemistry, 68(1991) 115-122.
- Shukla V.K.S. and Perkins E.G., 1991. The presence of oxidative polymeric materials in encapsulated fish oils. Lipids, 26(1), 23-26.
- Sjövall O., Virtalaine T., Lapveteläinen A. and Kallio H., 2000. Development of rancidity in wheat germ analyzed by headspace gas chromatography and sensory analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3522-3527.
- Smouse T.H., Chang S.S., 1967. J.Am.Oil Chem. Soc., 509.
- Svensson I., Wehtje E., Adlercreutz P. and Mattiasson B., 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymic esterifications. Biotechnology and Bioengineering, 44(5), 549-556.
- Takano K., 1993. Mechanism of lipid hydrolysis in rice bran. Cereal Foods World. 38(9), 695-698.
- Tappel A.L., 1961. Biocatalysts: lipoxygenase and hematin compounds. In : Lundberg W.O. (Ed). Autoxidation and Antioxidants, Vol.1, 325.
- Tappel A.L., 1963. Lipoxygenase. In Enzymes. Boyer P.D., Lardy H., Myrback K. (eds); 2nd ed. Academic Press: NY. Vol B., 275.
- Tavener R.J.A. and Laidman D.L., 1969. Induction of lipase activity in the starchy endosperm of germinating wheat grains. Biochemical Journal, 113(3), 32.

- Tzen J.T.C. and Huang A.H.C. 1992. *J. Cell Biol.* 117, 327-335.
- Urquhart A., Altosaar I., and Matlashewski G., 1983. Localization of lipase activity in oat grains and milled oat fractions. *Cereal Chemistry*, 60, 181-183.
- Van Mechelen J.R., Schuurink R.C., Smits M., Graner A., Douma A.C., Sedee N.J.A., Schmitt N.F. and Valk B.E., 1999. Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Molecular Biology*, 39(6), 1283-1298.
- Van der Stelt M., Noordermeer M.A., Kiss T., Van Zadelhoff G., Merghart B., Veldink G. A. and Vliegthart J. F. G. (2000) - Formation of a new class of oxylipins from *N*-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway. *Eur. J. Biochem.* 267, 2000-2007.
- Vertucci C.W. and Roos E.E. (1990) - Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*, 94, 1019-1023.
- Wang X., 2001. Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 211-231.
- Wehtje E. and Adlercreutz P., 1997. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 798-806.
- Yamamoto A., Fujii Y., Yasumoto K. And Mitsuda H., 1980. Partial purification and study of some rice germ lipoxygenase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(8), 1169-1177.
- Yasuhide O., Toshio M. and Aki O., 1997. Positional specificity and stereoselectivity of a lipase preparation from oat seeds acting on 1,2,3-trioxanoylglycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 166-167.