

Daniela Rotkiewicz, Iwona Konopka, Małgorzata Tańska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych

Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych oraz ich funkcje

Carotenoids and chlorophylls in plant oils and their functions

Słowa kluczowe: karotenoidy, chlorofile i ich pochodne, oleje roślinne, utlenianie fotosensybilizowane

Key words: carotenoids, chlorophylls and their derivatives, plant oils, photosensitized oxidation

Praca jest monografią dotyczącą karotenoidów i chlorofili, które jako związki barwne olejów roślinnych, poprzez wpływ na proces utlenienia, determinują ich trwałość. Przedstawiono zawartość barwników w nasionach i oleju, zmiany ilościowe i jakościowe w procesach przetwórstwa oraz ich funkcje technologiczne. Omówiono oddziaływanie barwników w procesie fotoutleniania i autooksydacji, wskazując na proutleniającą aktywność chlorofili oraz na warunkowaną różnymi czynnikami, aktywność pro- lub przeciwutleniającą karotenoidów w różnych układach modelowych. Pracę kończy omówienie wpływu barwników chlorofilowych na proces uwodorniania oraz funkcji żywieniowych karotenoidów.

The paper is a monograph of carotenoids and chlorophylls, which as plant oils dyes, through the influence on oxidation, determine their stability. The content of dyes in seeds and oils, quantitative and qualitative changes in industrial processes and their technological functions are presented. Influence of dyes on photo- and autoxidation of oils is described in detail, showing on chlorophylls prooxidation activity and on conditioned by different factors, pro- and antioxidation activity of carotenoids in different models. The discussion of chlorophylls influence on hydrogenation process and nutritional function of carotenoids finishes the work.

Wstęp

Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe zawarte są we wszystkich olejach roślinnych, w ilościach zależnych od gatunku i dojrzałości surowców oraz od technologii wydobywania i rafinacji. Zainteresowanie barwnikami olejów wynika z ich funkcji żywieniowej oraz technologicznej, w której największe znaczenie ma aktywność pro- lub antyoksydacyjna.

Budowa i charakterystyka barwników

Spośród współcześnie rozpoznanych blisko 600 karotenoidów większość występuje w świecie roślinnym (Beutner i in. 2001). Karotenoidy (Wilska-Jeszka 1994) są związkami polienowymi zbudowanymi z jednostek izoprenoidowych. Wszystkie pochodzą od acyklicznego układu $C_{40}H_{56}$ zawierającego długi centralny łańcuch sprzężonych wiązań podwójnych, nadających im właściwości chromoforów. Poszczególne karotenoidy różnią się stopniem uwodornienia, występowaniem i strukturą form cyklicznych na końcach łańcucha oraz ewentualną obecnością funkcyjnych grup tlenowych. Do karotenoidów zalicza się także te produkty ich degradacji oksydacyjnej, które mają zachowany centralny fragment szkieletu węglowego, np. biksynę, główny składnik preparatu barwiącego annato (Wilska-Jeszka 1994).

Karotenoidy są rozpuszczalne w tłuszczach i ich rozpuszczalnikach, a tlenowe pochodne karotenoidów (ksantofile) również w alkoholach. Do najpowszechniej występujących w świecie roślinnym karotenów zalicza się β -karoten (β,β -karoten), likopen (ψ,ψ -karoten), γ -karoten (β,ψ -karoten) oraz α -karoten (β,ϵ -karoten), a z ksantofili zeaksantynę i luteinę — z grupami $-OH$ oraz kapsantynę i kantaksantynę — z grupami $-CO$ (Wilska-Jeszka 1994).

Chlorofile to druga grupa barwników lipidowych. Ich nazwa pochodzi od greckiego słowa „chloros”, co znaczy żółtozielony (Internet 1). W roślinach występują dwie główne formy chlorofili: *a* (niebieskozielone) i *b* (zielonożółte). Chlorofile należą do typowych związków metaloporfirynowych. Ich cząsteczka składa się z czterech pierścieni pirolowych z centralnie umieszczonym atomem Mg^{2+} . Wiązania podwójne mają charakter sprzężony, a elektrony są zdelokalizowane wzdłuż pierścienia (Internet 2). Obie formy chlorofilu absorbują światło najsilniej w czerwonej i fioletowej części widma, a znacznie słabiej w jego części zielonej (Internet 2).

W komórkach nasiennych zarówno karotenoidy, jak i chlorofile występują w tylakoidach stanowiących lipidowo-białkowe struktury wewnętrznej błony chloroplastów (Kączkowski 1987). Barwniki te uczestniczą w transporcie energii świetlnej do centrów reakcyjnych procesów fotosyntezy. Karotenoidy chronią jednocześnie komórki i tkanki roślinne przed uszkodzeniami świetlnymi, zamieniając nadmiar energii świetlnej w ciepło (Internet 3).

Zawartość barwników w olejach

Podczas wydobywania tłuszczu z nasion i/lub owoców chlorofile i karotenoidy przechodzą do oleju w ilości zależnej od gatunku surowca olejarskiego i stopnia jego dojrzałości oraz od technologii wydobywania. Najwyższą zawar-

tością karotenoidów, wynoszącą 500–700 ppm, charakteryzuje się olej palmowy (May 1994). Surowy olej canola, według Prior i in. (1991), zawiera 126–216 ppm karotenoidów, a według Swern (cyt. przez Koseoglu i Lusas 1990) 25–50 ppm karotenoidów oraz 5–25 ppm chlorofili. Płatek i Węgrowski (2001) w próbach oleju rzepakowego wydobywanego przez krajowy przemysł tłuszczowy stwierdzili średnio 49 ppm barwników chlorofilowych, wyrażonych jako feofityna *a*. Inne oleje surowe, takie jak sojowy, kukurydziany, bawełniany i z nasion dyni, zawierają 16–128 ppm karotenoidów (Toro-Vazquez 1991). Zawartość β -karotenu w oleju tłoczonym z oliwki zielonej wynosi średnio 5,2 ppm, a z oliwki czarnej 1,0 ppm (Rahmani i Csallany 1991). Olej z oliwki zielonej charakteryzuje się ponadto wyższą zawartością barwników chlorofilowych, wśród których dominuje feofityna *a* (ok. 35 ppm), natomiast ilości feofityny *b* oraz chlorofilu *a* są kilkunastokrotnie niższe. Olej z owoców oliwki czarnej zawiera tylko feofitynę *a* w ilości ok. 7 ppm (Rahmani i Csallany 1991).

Różnice w podawanych zawartościach barwników chlorofilowych w oleju mogą wynikać m.in. z różnych technik ich analizy, z których najczęściej stosowane to:

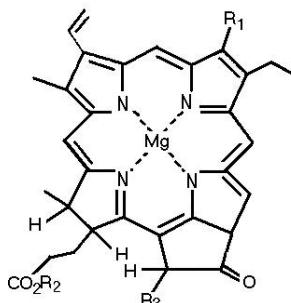
- pomiar absorbancji mierzonej przy $\lambda=668$ (heksan) lub 666 nm (czterochlorek węgla) (PN-A-86934:95)
- pomiar absorbancji ($\lambda=625,5$; 665,5 i 705,5 nm dla prób w izooktanie z etanolem lub $\lambda=630$, 665 i 710 nm dla heptanu z etanolem) (AOCS Method CC 13d-55) (Daun i Thorsteinson 1989).

Metody spektrofotometryczne wskazane są tylko przy zawartości barwników chlorofilowych powyżej 3 mg/kg oleju. Źródłem błędów w spektrofotometrycznym pomiarze chlorofilu może być kalibrowanie metody tylko dla konkretnego typu barwnika, najczęściej chlorofilu *a* (Ward i in. 1994b). Chociaż maksima absorpcji chlorofilu *a* i feofityny *a* występują przy tej samej długości fali, to molowy współczynnik absorpcji dla feofityny *a* wynosi 44500, a dla chlorofilu *a* przyjmuje wartość 75000 (Endo i in. 1992).

- techniki HPLC: suma ilości poszczególnych barwników chlorofilowych oznaczonych tą techniką daje ich łączną zawartość ok. 1,4-krotnie wyższą od zawartości oznaczonej spektrofotometrycznie (Ward i in. 1994b).

Chlorofile ulegają licznym przemianom, które można monitorować rejestrując zmiany barwy. Szczegółowe badania produktów przemian chlorofili w nasionach i oleju rzepakowym są przedmiotem nielicznych prac (Endo i in. 1992, Ward i in. 1994a, b, c). Chlorofile w środowisku kwaśnym tracą jon Mg^{2+} i przechodzą w oliwkowo-brązowe feofityny, które następnie przekształcają się w brązowe feoforbidy. Obecny w roślinach enzym chlorofilaza katalizuje rozpad chlorofilu do fitolu oraz zielono zabarwionych chlorofilidów (Ward i in. 1994c). Produkty utleniania chlorofilu i chlorofilidów są bezbarwne (Ward i in. 1994c). Canjura i in. (1991) wykazali, że formy *a* chlorofilu i chlorofilidu ulegają szybszej degradacji termicznej niż formy *b*. Pod wpływem wysokiej temperatury, w wyniku oderwania

od feofityny grupy $-\text{COOCH}_3$, mogą tworzyć się pirofeofityny (Wilska-Jeszka 1994). Różnice w strukturze chlorofili i ich pochodnych zawartych w oleju rzepakowym przedstawiono na schemacie 1 i w tabeli 1.



Schemat 1. Struktura chlorofilu (Endo i in. 1992)

Tabela 1

Struktura barwników chlorofilowych oleju rzepakowego
Structure of chlorophyll dyes of rapeseed oil

Nazwa	Skrót	X	R ₁	R ₂	R ₃
Chlorofil a — <i>Chlorophyll a</i>	chl a	Mg	CH ₃	C ₂₀ H ₃₉	CO ₂ CH ₃
Feoforbida a — <i>Pheoforbida a</i>	pho a	H ₂	CH ₃	H	CO ₂ CH ₃
Metylofeoforbida a — <i>Methylpheoforbida a</i>	mepho a	H ₂	CH ₃	CH ₃	–
Feofityna a — <i>Pheophytin a</i>	phy a	H ₂	CH ₃	C ₂₀ H ₃₉	CO ₂ CH ₃
Pirofeofityna a — <i>Pyropheophytin a</i>	pyr a	H ₂	CH ₃	C ₂₀ H ₃₉	H
Chlorofil b — <i>Chlorophyll b</i>	chl b	Mg	CHO	C ₂₀ H ₃₉	CO ₂ CH ₃
Feoforbida b — <i>Pheoforbida b</i>	pho b	H ₂	CHO	H	CO ₂ CH ₃
Feofityna b — <i>Pheophytin b</i>	phy b	H ₂	CHO	C ₂₀ H ₃₉	CO ₂ CH ₃
Pirofeofityna b — <i>Pyropheophytin b</i>	pyr b	H ₂	CHO	C ₂₀ H ₃₉	H

Endo i in. (1992)

Zawartość i proporcje poszczególnych barwników chlorofilowych w nasionach rzepaku są związane z ich dojrzałością. Nasiona niedojrzałe zawierają 962–1166 ppm chlorofili i feofityn łącznie, natomiast w pełni dojrzałe tylko chlorofile w ilości 1–2 ppm (Ward i in. 1994c). Inne barwniki chlorofilowe (feoforbida a, metylofeoforbida a i pirofeofityna a) występują sporadycznie i zanikają w miarę dojrzewania. Wraz ze wzrostem stopnia dojrzałości nasion rośnie

w nich udział barwników typu *a* z 44 do 87%, a stosunek chlorofilu *a* do *b*, wynoszący w nasionach niedojrzałych ok. 1:1, w dojrzałych ustala się na poziomie od 2:1 do 4:1 (Ward i in. 1994c, Endo i in. 1992).

Podczas tradycyjnej, wysokotemperaturowej technologii przetwórstwa nasion rzepaku chlorofile ulegają całkowitemu przekształceniu w pochodne, które w większości przenikają do oleju, w śrucie natomiast pozostaje ich niewiele (tab. 2).

Suzuki i Nishioka (1993) wykazali, że przemysłowe oleje ekstrakcyjne mogą zawierać nawet o 1/3 więcej barwników chlorofilowych niż tłoczone. Ward i in. (1994a) stwierdzili natomiast, że metoda wydobywania oleju nie ma istotnego wpływu na zawartość w olejach pochodnych typu *a*.

Tabela 2

Barwniki chlorofilowe nasion rzepaku i produktów ich przerobu
Chlorophyll dyes of rapeseed and products of their processing

Rodzaj próby <i>Kind od sample</i>	Barwniki chlorofilowe (ppm) — <i>Chlorophyll dyes (ppm)</i>							
	chl a	chl b	phy a	phy b	pho a	mepho a	pyr a	ogółem
Nasiona — <i>Seeds</i>	9,0–23,7	2,5–8,3	0,1–1,0	–	0,0–0,1	0,0–0,1	–	11,3–33,2
Śruta — <i>Meal</i>	–	–	0,7–2,4	0,1–0,5	0,1–0,4	0,0–0,1	0,4–2,1	1,2–5,3
Olej ekstrakcyjny <i>Extracted oil</i>	–	–	13,4–35,2	2,0–5,8	0,3–1,0	0,4–2,0	1,2–6,7	20,7–50,7
Olej odśluzowany <i>Degummed oil</i>	–	–	6,8–9,0	0,2–3,0	–	0,3–0,5	6,1–30,9	15,6–43,2

Endo i in. 1992

Głównymi barwnikami surowego oleju rzepakowego są pochodne typu *a* stanowiące 81–100% ich ogółu, przy czym dominują feofityna *a* (9-krotnie więcej niż formy *b*) oraz pirofeofityna *a* (Ward i in. 1994a). Poziom feofityn w oleju rzepakowym rośnie po przerobie nasion porażonych grzybami pleśniowymi, zagranych oraz przemarzniętych. Ich średnia zawartość kształtuje się zwykle na poziomie 15–30 ppm (Taurus i Low 1993).

Usuwanie barwników z olejów

Usuwanie barwników z olejów jest niezbędne z powodu:

- tworzenia nie akceptowalnej barwy,
- obniżania stabilności oksydacyjnej oraz
- utrudniania uwodornienia.

Barwniki są usuwane z oleju w procesie bielenia adsorpcyjnego. Jako adsorbenty stosuje się głównie aktywowane kwasami (HCL, H₂SO₄) ziemie bielące, zwłaszcza montmorylonity (Niewiadomski 1993, Mag 1990). Taylor i in. (1989) stwierdzili, że efektywność usuwania chlorofilu i karotenoidów przez ziemie bielące jest

funkcją zarówno chemicznego typu ziemi, jak i warunków jej aktywacji, tj. dodatku kwasu, temperatury i czasu działania oraz stopnia wymycia kwasu. W cytowanych badaniach karotenoidy były najefektywniej adsorbowane przez montmorylonity: naturalny (substytuowany Ca) oraz syntetyczny (substytuowany Fe), aktywowane w temperaturze 100°C odpowiednio przez 1,5 i 0,42 godz. w 200% nadmiarze kwasu siarkowego. Barwniki chlorofilowe najefektywniej były usuwane przez ziemie bielące oraz montmorylonity syntetyczne o niskiej proporcji Si/Al oraz substytuowane Ni. Do odbarwiania próbowano stosować także żel krzemionkowy (Niewiadomski 1993) oraz krzemionkę bezpostaciową (Toeneboehn i Welsh 1991).

Kolejność usuwania pochodnych chlorofilowych przy zastosowaniu ziemi bielącej jest następująca: $phy\ a > pyr\ a \gg phy\ b > pyr\ b$, a przy zastosowaniu węgla aktywnego: $pyr\ b > phy\ b > phy\ a > pyr\ a$; a więc oleje zawierające większe ilości pochodnych typu *a* łatwiej jest odbarwiać za pomocą ziemi bielącej, natomiast węgiel aktywny skuteczniej usuwa pochodne typu *b* (Suzuki i Nishioka 1993). Płatek i Węgrowski (2001) badając zawartość barwników chlorofilowych w rafinowanym standardowo oleju rzepakowym stwierdzili, że z 49 mg/kg chlorofili w oleju surowym po odszlamieniu i odkwaszeniu pozostało 41, a po odbarwieniu i odwonieniu odpowiednio 0,13 oraz 0,11 mg/kg. Pełny cykl rafinacyjny usuwa do 98,8% chlorofili i ich pochodnych (Płatek i in. 1999). Według Mag (1990) dobrze odbarwiony w rafinacji alkalicznej olej canola zawiera poniżej 0,05 ppm barwników chlorofilowych. Rafinacja fizyczna może obniżyć ilość barwników chlorofilowych do poziomu 0,0251–2,12 ppm, rafinacja chemiczna natomiast do 0,0115–0,0891 ppm (Abraham i deMan 1986). W prawidłowo odbarwionym oleju dopuszcza się jedynie śladowe ilości barwników chlorofilowych, absorbujących światło przy długości fali 671 nm (pochodne *a*) i 657 nm (pochodne *b*) (Suzuki i Nishioka 1993).

Węgiel aktywny, pomimo że jest tani i posiada szerokie spektrum możliwości adsorpcyjnych, stosowany jest sporadycznie (Toro-Vazquez 1991). Zastosowanie tego adsorbenta ograniczone jest do niewielkiego, poniżej 20% dodatku do ziemi bielącej (Niewiadomski 1993). Toro-Vazquez (1991) wykazał, że skuteczność adsorpcji karotenoidów z olejów sojowego, kukurydzianego, bawełnianego i z nasion dyni na węglu aktywnym mieści się w zakresie 15–71%.

Alternatywną metodą usuwania barwników chlorofilowych z oleju może być wykorzystanie chlorofilazy (EC. 3.1.1.4.). Enzym ten, odrywając łańcuch fitolowy, hydrolizuje chlorofile i feofityny do chlorofilidów i feoforbidów, które usuwa się wodą (Levadoux i in. 1987).

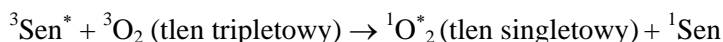
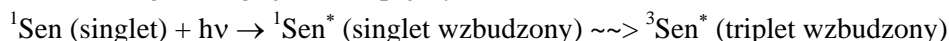
Usuwanie karotenoidów z oleju rzepakowego nie poświęca się większej uwagi. W procesach rafinacyjnych usuwane są one wraz z barwnikami chlorofilowymi, a ponadto w procesie odwaniania ulegają rozkładowi termicznemu i oddestylowaniu z parą wodną (Niewiadomski 1983).

Rola barwników w procesach utleniania lipidów

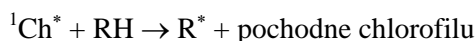
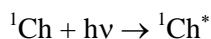
Rola barwników chlorofilowych

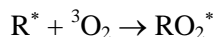
Bezpośrednia reakcja cząsteczki tlenu podstawowego, zwanego ze względu na wypadkowy spin elektronów walencyjnych tripletowym, z nienasyconym kwasem tłuszczowym występującym w stanie singletowym, jest mało prawdopodobna, a ponadto wymaga dostarczenia energii w ilości 64 kcal/mol (Rawls i van Santen 1970). Związki zwane fotosensybilizatorami umożliwiają energetyczną przemianę tlenu $^3\text{O}_2$ do postaci singletowej, „toksycznej” dla nienasyconych lipidów. Proces tworzenia tlenu singletowego, zwany wzbudzeniem, może prowadzić do powstania dwóch jego form, tlenu Δ o energii wyższej o 94 kJ/mol oraz tlenu Σ o energii wyższej o 157 kJ/mol (Bartosz 1995). Ze względu na fakt, że tlen Σ ma bardzo krótki czas półtrwania (130 ns w CCl_4), przyjęto nazwą tlen singletowy określać tylko jego formę Δ (Wilkinson i in. 1995). Według Rawls i van Santen (1970) stała szybkości reakcji tego tlenu z nienasyconym kwasem tłuszczowym jest ponad 1450-krotnie wyższa niż tlenu tripletowego, można więc sądzić, że utlenianie lipidów tlenem singletowym jest mechanizmem dominującym.

W warunkach przechowywania olejów najważniejszym źródłem tlenu singletowego są reakcje fotochemiczne z udziałem związków światłoczułych (Bartosz 1995, Rawls i van Santen 1970), do których należą m.in. barwniki chlorofilowe. Oznaczając związek światłoczuły symbolem Sen (sensybilizator), mechanizm tworzenia tlenu singletowego jest następujący (Rawls i van Santen 1970, Lee i in. 1997):



Chlorofil będący głównym sensybilizatorem olejów roślinnych może inicjować dwa typy reakcji fotosensybilizowanych. Według I typu $^3\text{Chl}^*$ ($^3\text{Sen}^*$) reaguje bezpośrednio z $^3\text{O}_2$ generując wysoce reaktywny $^1\text{O}_2$. Lee i in. (1997) podają za Suzuki i in., że już nawet śladowe ilości barwników chlorofilowych (0,065–1,33 ppm) promują tworzenie tlenu singletowego. Reakcje II typu, rzadziej obserwowane, są spowodowane tym, że energia światła widzialnego prowadzi do wzbudzenia elektronów grupy karbonylowej chlorofilu do stanu π^* . Chlorofil w tej postaci ($^1\text{Ch}^*$) bierze udział w utlenianiu tlenem tripletowym według następującego mechanizmu (Rawls i van Santen 1970):





Potwierdzeniem słuszności tego modelu utleniania jest stwierdzane praktycznie stopniowe odbarwianie chlorofili, a więc ich rozpad do pochodnych niskocząsteczkowych. Produkty rozkładu chlorofili działają jednak również jako prooksydanty (Ramamurthi i Low 1995, cyt. za Endo i in. oraz Usuki i in.). Tautorus i Low (1994) badali stabilność nasyconego triacyloglicerolu (trikapryloglicerol) „zanieczyszczonego” doświadczalnie feofityną, a następnie bielonego różnymi technikami. Stwierdzili, że nie dające się usunąć w procesie bielenia produkty rozkładu feofityny, występujące w ilości poniżej 0,1 ppm „akceptowanej” przez konsumentów, są promotorami utleniania. Autorom pracy nie udało się jednak wyizolować związków odpowiedzialnych za to oddziaływanie. Są to prawdopodobnie niskocząsteczkowe związki, które „przeżywają” kolejne etapy procesu rafinacji olejów (Ramamurthi i Low 1995). Według Brown i in. (cyt. za Ramamurthi i Low 1995) są to produkty daleko posuniętego rozpadu chlorofilu, polegającego na rozerwaniu makrocyklicznego pierścienia, a następnie dalszej degradacji do mniejszych węglowych i/lub azotowych fragmentów. Wiedza na temat produktów tego typu rozpadu jest obecnie niewystarczająca, choć sądzi się, że mogą być one podobne do produktów rozkładu chlorofilu *a* utlenianego w obecności kwasu chromowego (Ramamurthi i Low 1995, cyt. za Brown i in.). W takich warunkach tworzą się bezbarwne związki, takie jak etylometylo-maleimid, kwas hematynowy i kwas *trans*-dihydrohematynowy.

Ramamurthi i Low (1995) badali stabilność oleju canola w obecności trzech zbliżonych strukturą do powyższych związków (maleimidu, dimetylopirrolu i trimetylopirrolu) oraz oceniali zdolność do ich usuwania podczas odśluzowania, odkwaszania, bielenia i odwaniania oleju. Wykazali, że każdy z tych związków działa prooksydacyjnie, zarówno oddzielnie jak i w kombinacjach, już przy stężeniu 0,05 ppm oraz że poszczególne etapy rafinacji mają określoną skuteczność usuwania poszczególnych produktów rozkładu chlorofili za wyjątkiem dimetylopirrolu. Według tych autorów najlepsze efekty daje zastosowanie odkwaszania alkalicznego z bieleniem (3% ziemi bielącej, 105°C, podciśnienie 20 mm Hg przez 0,5 godz.).

Rola barwników karotenoidowych

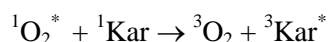
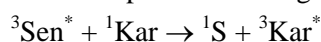
Występowanie w strukturze karotenoidów sprzężonych wiązań podwójnych, w których π -elektrony są zdelokalizowane na całej długości łańcucha polienowego (Britton 1995, Minguez-Mosquera i Jaren-Galan 1995) warunkuje według Handelman (cyt. przez Haila 1999) ich funkcje antyoksydacyjne, gdyż:

- 1) małe zróżnicowanie energetyczne stanu wzbudzonego i podstawowego karotenoidów pozwala na rozpraszanie energii w postaci ciepła,

- 2) karotenoidy mają minimalną skłonność do wzbudzania innych cząsteczek,
- 3) rezonans elektronów we wzbudzonych karotenoidach delokalizuje miejsca wzbudzenia i stabilizuje stan wzbudzony,
- 4) delokalizacja miejsca wzbudzenia pozwala na zwiększenie ilości potencjalnych miejsc oddziaływania z tlenem singletowym.

Fizyczne wygaszanie tlenu singletowego i stanów wzbudzonych sensybilizatorów

Karotenoidy są uznawane za związki najbardziej skuteczne w hamowaniu utleniania fotosensybilizowanego. Aby związek mógł fizycznie wygaszać tlen singletowy energia jego stanu tripletowego musi być niższa niż 94 kJ/mol (Wilkinson i in. 1995). Wykazano, że wartość ta np. dla *all-trans* β -karotenu wynosi ok. 88 kJ/mol (Beutner i in. 2001), a więc proces jest termodynamicznie możliwy. Podczas fizycznego wygaszania $^1\text{O}_2$ i stanów wzbudzonych sensybilizatorów struktura karotenoidów (Kar) nie ulega degradacji, a proces ten prowadzi głównie do rozproszenia energii w postaci ciepła (Foote i Denny 1968):



Stałe szybkości wygaszania (k_q) tlenu singletowego, będące kinetycznymi determinantami pojemności antyoksydacyjnej, są dla karotenoidów bardzo wysokie i dochodzą do wartości $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Beutner i in. 2001), podczas gdy stała ta dla α -tokoferolu wynosi $2,7 \times 10^7$ (Jung, Min 1991), a dla flawonoidów i fenoli ok. 10^6 – $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Beutner i in. 2001).

Chemiczne wygaszanie tlenu singletowego

Ten typ oddziaływania karotenoidów z tlenem singletowym prowadzi do ich degradacji. Jak wykazali Gagarina i in. (cyt. za Goldman i in. 1983) jeden mol β -karotenu może reagować aż z 8 molami tlenu, ulegając przy tym całkowitemu odbarwieniu. Beutner i in. (2001) wykazali, że reakjom odbarwiania (rozpadu) z jednoczesnym ochronnym działaniem na lipidy ulegają karotenoidy, takie jak likopen i β -karoten. Do grupy tzw. „wspaniałych” przeciwutleniaczy autorzy ci zaliczyli m.in. asta-, zeo- i kantaksantynę, a więc karotenoidy z funkcyjnymi grupami tlenowymi, które dodatkowo delokalizują elektrony π .

Produktami degradacji karotenoidów są różnorodne związki, zależne głównie od typu barwnika oraz od stopnia jego rozpadu. Fotodegradacja (Pesek, Warthesen 1988) oraz degradacja termiczna (Henry i in. 1998) *trans*- β -karotenu prowadzą do tworzenia głównie *cis* pochodnych, przy czym ich zawartość zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury oraz czasu naświetlania. Pochodne *cis* β -karotenu są mało stabilne energetycznie i ulegają konwersji do form *trans* lub dalszej degradacji (Pesek, Warthesen 1988, cyt. za Zechmeister). Wśród produktów degradacji *trans*-

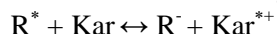
β -karotenu wymienia się m.in.: karotenale, karotenony, epoksydy, endonadtlenki oraz diole (Henry i in. 2000; Marty, Berset 1988).

Interakcje z wolnymi rodnikami

Mechanizm reakcji karotenoidów z wolnymi rodnikami zależy od ich potencjałów redox, czasu półtrwania i stężeń (Bartosz 1995, Edge i in. 1997) oraz od natury rodnika utleniającego (Mortensen i in. 1997). Stała szybkości zmiatania przez β -karoten rodnika ROO^* wynosi poniżej 10^6 (Mortensen i Skibsted 1998), a rodnika tokoferylowego $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Böhm i in. 1997). Reakcje zmiatania rodników mogą mieć następujący przebieg (Edge i in. 1997, Beutner i in. 2001):

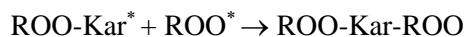
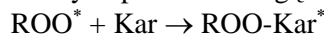
1) oddanie elektronu:

Utleniające rodniki z wysokim potencjałem redox, np. sulfonylowy (RSO_2^*), dwutlenku azotu (NO_2^*) lub kation rodnika tokoferylowego (TO^{*+}) mogą odbierać elektron z cząsteczki karotenoidu dając rodnik kationowy Kar^{*+} :



2) reakcje addycji:

Reakcje addycji tworzą rodnikowe addukty karotenoidowe, które w wyniku dalszych przemian mogą tworzyć formy nierodnikowe, np:



3) oddanie wodoru:

W wyniku oddania wodoru powstają neutralne rodniki karotenoidowe, KAR^* , $\text{R}^* + \text{Kar}(\text{H}) \rightarrow \text{RH} + \text{Kar}^*$

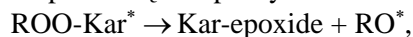
Energia dysocjacji wiązania labilnego wodoru w β -karotenie wynosi 309 kJ/mol (Luo i Holmes 1994), natomiast energia dysocjacji wiązania ROOH jest wyższa i wynosi ok. 370–380 kJ/mol, a więc transfer wodoru z β -karotenu do ROO^* jest termodynamicznie bardziej prawdopodobny (Mortensen i Skibsted 1998).

Britton (1995) wskazuje również na możliwość:

4) przyłączenia elektronu do cząsteczki karotenoidu, co daje rodnik anionowy $\text{Kar} + \text{e}^- \rightarrow \text{Kar}^{*-}$.

Delokalizacja niesparowanego elektronu stabilizuje rodniki karotenoidowe i pozwala na ich kolejne reakcje, np. addycji, mogące zachodzić w wielu miejscach cząsteczki karotenoidu. Wykazano (Liebler, Mc Clure 1996, Mortensen, Skibsted 1998), że reakcje pomiędzy β -karotenem, a rodnikami lipidowymi, takimi jak: R^* , RO^* , ROO^* polegają na oddaniu wodoru i/lub tworzeniu adduktów. Produkty reakcji addycji rodników lipidowych z karotenoidami mogą natomiast alternatywnie (Haila 1999, cyt. za Liebler):

1) rozpadać się do epoksydów:



- 2) reagować dalej do formy *bis*-adduktu, np. ROO-Kar-ROO (rozkład tego adduktu może dawać produkty karbonylowe i dwa RO*, jak również nierodnikowe związki polarne),
- 3) reagować bezpośrednio z $^3\text{O}_2$:
 $\text{ROO-Kar}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow \text{ROO-Kar-OO}^*$

Produkty reakcji addycji mogą więc promować tworzenie nowych rodników i inicjować nowe ścieżki reakcji wolnorodnikowych. W warunkach wysokiego ciśnienia parcjalnego tlenu rodnik karotenoidowy Kar* może reagować bezpośrednio z tlenem tripletowym, wytwarzając karotenoidowy rodnik nadtlenkowy: $\text{Kar}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow \text{KAR-OO}^*$. Reakcja ta ma charakter autooksydacyjny, a powstały produkt może promować utlenianie nienasyconego lipidu (RH) (Britton 1995): $\text{Kar-OO}^* + \text{RH} \rightarrow \text{Kar-OOH} + \text{R}^*$.

Głównymi produktami oksydacji β -karotenu tworzonymi w reakcjach wolnorodnikowych są produkty karbonylowe (np. β -apo-13-karoten, β -apo-15-karotenal oraz β -apo-14-karotenal (Handelman i in. 1991)), epoksydy oraz produkty polimeryczne (Tsuchihashi i in. 1995 oraz Haila 1999, cyt. za Kigoshi i Niki). Handelman i in. (1991) wykazali ponadto, że charakter produktów rozkładu β -karotenu jest mało zależny od warunków utleniania, gdyż produkty rozkładu, tworzone zarówno podczas autooksydacji w toluenie w obecności tlenu, w temperaturze 60°C jak i podczas oksydacji inicjowanej przez AIBN, w temperaturze 37°C w powietrzu, są identyczne.

Czynniki warunkujące oddziaływanie pro- lub przeciwutleniające karotenoidów

W wielu badaniach prowadzonych zarówno w układach *in vivo* jak i *in vitro* stwierdzano zarówno pro-, jak i antyoksydacyjne oddziaływanie karotenoidów. Wydaje się, że kierunek ich oddziaływania zależy od:

1. Stężenia tlenu:
Burton i Ingold (1984) wykazali, że przy ciśnieniu tlenu powyżej 150 torr (ok. 200 hPa) β -karoten jest prooksydantem dla linolenianu metylu. Według Goldman i in. (1983) wzrost stężenia tlenu z 1 do 20,9% ponad 5-krotnie skraca czas półtrwania β -karotenu w warunkach braku naświetlania. Jeszcze szybszy rozpad karotenoidów obserwuje się w warunkach ich ekspozycji na ozon, przy czym degradacja likopenu jest 7-krotnie szybsza niż *all-trans* β -karotenu (Henry i in. 2000).
2. Stężenia karotenoidów:
Wraz ze wzrostem stężenia od 1 do 5×10^{-5} M β -karoten i kantaksantyna (Jung, Min 1991) oraz rosnące dawki β -karotenu w zakresie 5–20 ppm (Lee, Min 1988), wykazują coraz wyższą skuteczność hamowania utleniania fotosensybilizowanego. β -karoten staje się natomiast prooksydantem dla linolenianu metylu przy stężeniu powyżej 5×10^{-4} M (Burton, Ingold 1984) lub po

przekroczeniu stężenia 0,1% (Haila 1999, cyt. za Kigoshi i Niki). Jeszcze niższe wartości stężeń β -karotenu (0,45–20 ppm) promujących tworzenie heksanalu i 2-heptanalu stwierdzili Heinonen i in. (1997). Według Haila i in. (1996) również likopen i luteina w dawkach 5–40 ppm są prooksydantami. Te same ilości annato mają natomiast korzystne oddziaływanie, co autorzy pracy tłumaczą występowaniem w tym barwniku niezidentyfikowanych związków eluujących się w czasie rozdziału chromatograficznego razem z tokoferolami.

3. Naświetlania:

Większość badań (Warner i Frankel 1987, Heinonen i in. 1997, Haila i in. 1996, Suzuki i in., cyt. za Haila 1999) wskazuje na prooksydacyjne oddziaływanie karotenoidów przy braku światła. Jednakże prace Suzuki i in. (cyt. za Haila 1999) oraz Haila i in. (1996) wskazują na antyoksydacyjne oddziaływanie β -karotenu w wymienionych warunkach. Różnice wynikają m.in. ze stosowanych matryc lipidowych i ich „czystości”, np. niewielkie ilości chlorofili lub tokoferoli mogą zmienić kierunek oddziaływania karotenoidów (tab. 3).

4. Barwy karotenoidu:

Syntetyczne karotenoidy zabarwione na kolor purpurowy, karmazynowy (magenta) oraz niebieski są najlepszymi wygaszaczami tlenu singletowego (Beutner i in. 2001).

5. Struktury chemicznej:

Wyższa skuteczność wygaszania tlenu singletowego jest związana głównie z:

- a) obecnością grup funkcyjnych (Edge i in. 1997, Nielsen i in. 1996), a zwłaszcza karbonylowych (Beutner i in. 2001),
- b) ilością wiązań sprzężonych, przy czym maksimum ochrony wykazują barwniki mające ich 9 lub więcej (Lee i Min 1990, Edge i in. 1997, Nielsen i in. 1996, Hirayama i in. 1994),
- c) strukturą acykliczną łańcuchów (Hirayama i in. 1994).

6. Synergizmu z tokoferolami:

Na synergistyczne oddziaływanie tokoferoli i karotenoidów w przeciwdziałaniu utleniania wskazują m.in. prace Haila i in. (1996), Heinonen i in. (1997) oraz Nogali-Kałuckiej i in. (2000). Według Mortensen i Skibsted (1997) zdolne do redukcji kationu Kar^{*+} są tylko α -, β - oraz γ -tokoferole, natomiast rodnik δ -TO* może być redukowany przez likopen i β -karoten. Bohm i in. (1997) stwierdzili natomiast, że zdolne do regeneracji tokoferoli są m.in. luteina, kantaksantyna, β -karoten, septapreno- β -karoten, likopen, 7,7'-dihydro- β -karoten i zeaksantyna. Haila i in. (1996) oraz Heinonen i in. (1997) wykazali, że ochronny wpływ na karotenoidy wywierają α - i γ -tokoferole już w dawce powyżej 1,5 ppm.

7. Modelu matrycy lipidowej:

Szereg dowodów wskazuje na ochronne działanie karotenoidów na lipidy mikro- i liposomowe, takie jak mikrosomy wątroby szczura, mitochondria wątroby szczura, mikrosomy skóry szczura oraz liposomy żółtka jaja (Haila 1999, cyt. za Palozza i Krinsky oraz Vile i Winterbourn, Stahl i in. 1998). W przeciwieństwie do tych wyników, ostatnie prace Liebler i in. (1997) wskazują, że β -karoten jest stosunkowo nieefektywnym antyoksydantem w membranach biologicznych.

W tabeli 3 przedstawiono niektóre z wyników badań nad oddziaływaniem karotenoidów na utlenianie lipidów w różnych układach modelowych.

Funkcje barwników chlorofilowych w procesie uwodorniania

Chlorofile i ich pochodne zatrzymują katalizator niklowy stosowany w procesie uwodorniania oleju, co zakłóca jego przebieg. Abraham i deMan (1986) stwierdzili, że wzrost stężenia chlorofili w poddanym uwodornieniu oleju canola hamuje ubytek kwasu linolowego oraz zmienia zawartość fazy stałej. W oleju uwodornionym w warunkach nieselektywnych do liczby jodowej około 80 i 70 jednostek, zawartość fazy stałej obniżała się wraz ze wzrostem zawartości chlorofili, natomiast w oleju uwodornionym do liczby jodowej około 90 jednostek, zwiększała się. Chlorofile, zwłaszcza w warunkach nieselektywnego uwodorniania, obniżają ilość tworzonych izomerów *trans*. Zjawisko to tłumaczy się adhezją barwników chlorofilowych na powierzchni katalizatora i blokowaniem jego centrów aktywnych, czego skutkiem jest ograniczona możliwość tworzenia konfiguracji przestrzennych typu *trans* (Abraham i deMan 1986). Wyższy poziom barwników chlorofilowych i ich pochodnych w oleju wiąże się zatem z koniecznością zwiększenia stężenia kontaktu i wydłużenia czasu reakcji.

Funkcje żywieniowe barwników

Żywieniowe funkcje barwników, zwłaszcza karotenoidowych, znajdują się od kilku lat w centrum uwagi. Karotenoidy uznawane są za witaminy antyoksydacyjne (Block, Langseth 1994). Zwiększone podawanie karotenoidów w diecie obniża zawartość nadtlenków lipidów w osoczu krwi (Robak, Zachwieja 1998, za Vise i in), chroniąc tym samym przed chorobami wywoływanymi reaktywnymi formami tlenu. Karotenoidy obniżają ryzyko zawału serca, udaru mózgu, choroby niedokrwiennej serca, zaćmy, starczego zwyrodnienia plamki ocznej, choroby Alzheimera, chorób nowotworowych i innych degeneracyjnych chorób wieku starczego (Robak, Zachwieja 1998, cyt. za Street i in., Ziemiańskim i in., Gillman

Tabela 3

Wpływ karotenoidów na utlenianie lipidów — *The effect of carotenoids on lipid oxidation*

Rodzaj matrycy lipidowej <i>Kind of lipid matrix</i>	Rodzaj i dawka karotenoidu <i>Kind and dose of carotenoid</i>	Warunki eksperymentu <i>Conditions of experiment</i>	Źródło <i>Referee</i>
Efekt proutleniający — <i>Prooxidation effect</i>			
Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	β -karoten (1–20 ppm)	60°C, brak światła <i>dark</i>	Warner i Frankel 1987
Linolenian metylu <i>Methyl linoleate</i>	β -karoten (1–5000 ppm)	30°C, brak światła <i>dark</i>	*Suzuki i in. 1989
Kwas linolowy <i>Linoleic acid</i>	(β -karoten)	40°C, UV 315–380 nm	*Faria i Mukai 1983
10% emulsja triacylogliceroli sojowych w wodzie <i>10% emulsion of soybean oil triacylglycerols</i>	β -karoten (0,45–20 ppm)	25°C, brak światła <i>dark</i>	Heinonen i in. 1997
Triacyloglicerole oleju rzepakowego „00” <i>Triacylglycerols of canola oil</i>	luteina 5–40 ppm, likopen 20 ppm, β -karoten 20 ppm	40°C, brak światła i naświetlanie <i>dark and light</i> 10000 lux, 25°C; γ -tokoferol < 1 ppm	Haila i in. 1996
Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	produkty termicznej degradacji β -karotenu i likopenu (50 ppm) <i>products of thermal degradation of β-carotene and licopene</i>	60°C, naświetlanie <i>light</i> 1650 lumenów	Steenson i Min 2000
Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	produkty termicznej degradacji β -karotenu (50 ppm) <i>products of thermal degradation of β-carotene</i>	60°C, naświetlanie <i>light</i> 1650 lumenów	Steenson i Min 2000

ciąg dalszy tabeli 3

Efekt przeciwutleniający — <i>Antioxidation effect</i>			
Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	β -karoten (1–20 ppm)	25°C, naświetlanie <i>light</i> 7535 lux	Warner i Frankel 1987
Triacyloglicerole oleju oliwkowego <i>Triacylglycerols of olive oil</i>	β -karoten (5–20 ppm)	25°C, naświetlanie — <i>light</i> 4000 lux, 2–4 ppm chlorofilu — <i>chlorophyll</i>	Fakourelis i in. 1987
Linolenian metylu <i>Methyl linoleate</i>	β -karoten (1–5000 ppm)	30°C, naświetlanie <i>light</i>	*Suzuki i in. 1989
Triacyloglicerole oleju sojowego <i>Triacylglycerols of soybean oil</i>	β -karoten (100 ppm)	30°C, brak światła <i>dark</i>	*Suzuki i in. 1989
Olej rzepakowy rafinowany <i>Refined rapeseed oil</i>	β -karoten (10 ppm)	30°C, naświetlanie <i>light</i> 4,5 W/m ²	*Suzuki i in. 1989
Olej rzepakowy rafinowany <i>Refined rapeseed oil</i>	β -karoten (5 ppm)	30°C, brak światła <i>dark</i>	*Suzuki i in. 1989
Triacyloglicerole oleju rzepakowego „00” <i>Triacylglycerols of canola oil</i>	annato (30 ppm)	40°C, brak światła i naświetlanie <i>dark and light</i> 10000 lux, 25°C; γ -tokoferol < 1 ppm	Haila i in. 1996
Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	produkty termicznej degradacji likopenu (50 ppm) <i>products of thermal degradation of lycopene</i>	60°C, naświetlanie <i>light</i> 1650 lumenów	Stenson i Min 2000
Olej sojowy w chlorku metylenu <i>Soybean oil in chloride methylene</i>	β -karoten (5–20 ppm)	naświetlanie — <i>light</i> 4000 lux 4 ppm chlorofilu — <i>chlorophyll</i>	Lee i Min 1988
Dziewiczy olej oliwkowy <i>Virgin olive oil</i>	β -karoten (0,54 ppm)	2°C, naświetlanie — <i>light</i> 620–5340 lux, feofityna a — <i>pheophytine a</i>	Rahmani i Csallany 1998

* podano za Haila 1999

i in., Morris i in., Howard i in., Seddon i in., Knekt i in., Lyras i in., Ames i in.). Aczkolwiek większość prac badawczych wskazuje na prozdrowotne oddziaływanie karotenoidów, to są i takie, które wskazują na szkodliwe działanie β -karotenu, zwiększające zachorowalność na raka płuc u palaczy (Robak i Zachwieja 1998, cyt za De Luca i Ross oraz Mayne). Możliwe jest, że to oddziaływanie β -karotenu wywołane jest niedoborem w organizmie palaczy witaminy C, która wspomaga aktywność przeciwutleniającą karotenoidów (Block, Langseth 1994, cyt. za Tribble).

Uznaje się, że idealna, prozdrowotna dieta, powinna dostarczać organizmowi ludzkiemu dziennie około 5,5 mg karotenoidów i równocześnie ok. 220 mg witaminy C oraz około 18 równoważników α -tokoferolu, tymczasem dieta przeciętna dostarcza tych składników 3-4-krotnie mniej (Block i Langseth 1994, cyt. za Block oraz Lachance).

Literatura

- Abraham V., de Man J.M. 1986. Hydrogenation of canola oil as affected by chlorophyll. *JAOCS*, 63(9): 1185-1188.
- Bartosz G. 1995. *Druga twarz tlenu*. PWN Warszawa.
- Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Hernandez Blanco I., Hoffmann T., Martin H-D., Mayer B., Noack P., Ruck Ch., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., Walsh R., 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and idigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *J. Sci. Food Agric.*, 81: 559-568 (online: 2001).
- Block G., Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technology*, 2: 80-84.
- Böhm F., Edge R., Land E.J., McGarvey D.J., Truscott T.G. 1997. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(3): 621-622.
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9: 1551-1558.
- Burton G.W., Ingold K.U. 1984. β -carotene: an usual type of lipid antioxidant. *Science*, 244: 569-573.
- Canjura F.L., Schwartz S.J., Nunes R.V. 1991. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *J. Food Sci.*, 56(6): 1639-1643.
- Daun J.K., Thorsteinson C.T. 1989. Determination of chlorophyll pigments in crude and degummed canola oils by HPLC and spectrophotometry. *JAOCS*, 66(8): 1124-1128.
- Drozdowski B. 1994. Witaminy. Rozdział 12 w „Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności”. WNT Warszawa.
- Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. 1997. The carotenoids as antioxidants – a review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 41: 189-200.
- Endo Y., Thorsteinson C.T., Daun J.K. 1992. Characterization of chlorophyll pigments present in canola seed, meal and oil. *JAOCS*, 69(6): 564-567.
- Fakourelis N., Lee E.C., Min D.B. 1987. Effects of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oil. *J. Food Sci.*, 52(1): 234-235.

- Foote C.S., Denny R.W. 1968. Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by β -carotene. J. Am. Chem. Soc., 40: 6233-6235.
- Goldman M., Horev B., Saguy I. 1983. Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. J. Food Sci., 48: 751-754.
- Haila K. 1999. Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation in vitro. Praca doktorska: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/haila/1.html>
- Haila K.M., Lievonen S.M., Heinonen M.I. 1996. Effects of luteine, lycopene, annatto, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. J. Agric. Food Chem., 44: 2096-2100.
- Handelman G.J., van Kuijk F.J.G.M., Chatterjee A., Krinsky N.I. 1991. Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene. Free Rad. Biol. Med., 10: 427-437.
- Heinonen M., Haila K., Lampi A.-M., Piironen V. 1997. Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β -carotene with α - and γ -tocopherols. JAOCS, 74(9): 1047-1052.
- Henry L.K., Catignani G.L., Schwartz S.J. 1998. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene. JAOCS, 75(7): 823-829.
- Henry L.K., Puspitasari-Nienaber N.L., Jarén-Galán M., van Breemen R.B., Catignani G.L., Schwartz S.J. 2000. Effect of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. J. Agric. Food Chem., 48: 5008-5013.
- Hirayama O., Nakamura K., Hamada S., Kobayasi Y. 1994. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids., 29: 149-150.
- Internet 1. <http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/chel&chlor/chel&chlor.html>
- Internet 2. <http://www.edc.com/~jkimball/BiologyPages/C/Chlorophyll.html>
- Internet 3. <http://utweb.utampa.edu/faculty/kbeach/lightharvesting/sld013.htm>
- Jung M.Y., Min D.B. 1991. Effects of quenching mechanisms of carotenoids on the photosensitized oxidation of soybean oil. JAOCS, 68(9): 653-658.
- Kączkowski H. 1987. Fotosynteza. Rozdział 14 w „Podstawy biochemii”. WNT Warszawa.
- Koseoglu S.S., Lusas E.W. 1990. Hydrogenation of canola oil. Chapter 8 in “Canola and rapeseed”. Ed. by F. Shahidi, published by Van Nostrand Reinhold.
- Lee E.C., Min D.B. 1988. Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. J. Food Sci., 53(6): 1894-1895.
- Lee K.H., Jung M.Y., Kim S.Y. 1997. Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. JAOCS, 74(9): 1053-1057.
- Lee S.-H., Min D.B. 1990. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. J. Agric. Food Chem., 38: 1630-1634.
- Levadoux W.L., Kalmokoff M.L., Pickard M.D., GroofWassink J.W.D. 1987. Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. JAOCS, 64(1): 139-144.
- Liebler D.C., Stratton S.P., Kaysen K.L. 1997. Antioxidant actions of β -carotene in liposomal and microsomal membranes: role of carotenoid-membrane incorporation and alpha-tocopherol. Arch. Biochem. Biophys., 338: 244-250.
- Liebler D.C., Mc Clure T.D. 1996. Antioxidant reactions of β -carotene: Identification of carotenoid-radical adducts. Chem. Res. Toxicol., 9: 8-11.
- Luo Y.-R., Holmes J.L. 1994. The stabilization energies of polyenyl radicals. Chem. Phys. Lett., 228: 329-332.
- Mag T.K. 1990. Further Processing of canola and rapeseed oils. Chapter 15 in “Canola and rapeseed”. Ed by F. Shahidi, published by Van Nostrand Reinhold.

- Marty C., Berset C. 1988. Degradation products of trans- β -carotene produced during extrusion cooking. *J. Food Sci.*, 53 (6): 1880-1886.
- May C.Y. 1994. Palm oil carotenoids. *Food and nutrition bulletin*, 15(2): <http://www.unu.edu/unupress/food/8F152e/8F152E05.html>
- Minguez-Mosquera M.I., Jaren-Galan M. 1995. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J. Sci. Food Agric.*, 67: 153-161.
- Mortensen A., Skibsted L.H. 1997. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Letters*, 417: 261-266.
- Mortensen A., Skibsted L.H. 1998. Reactivity of β -carotene towards peroxy radicals studied by laser flash and steady-state photolysis. *FEBS Letters*, 426: 392-396.
- Mortensen A., Skibsted L.H., Sampson J., Rice-Evans C., Everett S.A. 1997. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Letters*, 418: 91-97.
- Nielsen B.R., Mortensen A., Jørgensen K., Skibsted L.H. 1996. Singlet versus triplet reactivity in photodegradation of C₄₀ carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2106-2113.
- Niewiadomski H. 1983. *Technologia nasion rzepaku*. PWN Warszawa.
- Niewiadomski H. 1993. *Technologia tłuszczów jadalnych*. WNT Warszawa.
- Nogala-Kalućka M., Korczak J., Heć M. 2000. Sterole z kondensatu po dezodoryzacji oleju rzepakowego jako inhibitory w procesie autooksydacji lipidów. *Rośliny Oleiste*, XXI (1): 177-186.
- Pesek C.A., Warthesen J.J. 1988. Characterization of the photodegradation of β -carotene in aqueous model system. *J. Food Sci.*, 53(5): 1517-1520.
- Plątek T., Węgrowski J. 2001. Wpływ procesów rafinacyjnych na cechy jakościowe określające wartość żywieniową i zdrowotną oleju rzepakowego. IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. „Postępy w technologii tłuszczów roślinnych”. Kowno Litwa, 21-24 maja 2001.
- Plątek T., Węgrowski J., Jerzewska M., Krygier K. 1999. Wpływ procesów rafinacyjnych na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego. *Tłuszcze Jadalne*, 1-2: 32-42.
- Prior E.M., Vadke V.S., Sosulski F.W. 1991. Effect of heat treatments on canola press oils. I. Non-triglyceride components. *JAOCS*, 68(6): 401-406.
- Rahmani M., Csallany A.S. 1991. Chlorophyll and β -carotene pigments in Moroccan virgin olive oils measured by high-performance liquid chromatography. *JAOCS*, 68(9): 672-674.
- Rahmani M., Csallany A.S. 1998. Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil. *JAOCS*, 75(7): 837-843.
- Ramamurthi S., Low N.H. 1995. Effect of possible chlorophyll breakdown products on canola oil. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1479-1483.
- Rawls H.R., van Santen P.J. 1970. A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *JAOCS*, 47(4): 121-125.
- Robak J., Zachwieja Z. 1998. Znaczenie karotenoidów w diecie człowieka oraz w leczeniu niektórych schorzeń. *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXXI (4): 295-301.
- Stahl W., Junghans A., de Boer B., Driomina E.S., Briviba K., Sies H. 1998. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Letters*, 427: 305-308.
- Stenson D.F., Min D.B. 2000. Effects of β -carotene and lycopene thermal degradation products on the oxidative stability of soybean oil. *JAOCS*, 77(11): 1153-1160.

- Suzuki K., Nishioka A., 1993. Behaviour of chlorophyll derivatives in canola oil processing. *JAOCS*, 70: 837-841.
- Taurus C.L., Low N.H. 1993. Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. *JAOCS*, 70(9): 843-847.
- Taurus C.L., Low N.H. 1994. Possible causes for decreased stability of canola oil processed from green seeds. *JAOCS*, 71(10): 1123-1128.
- Taylor D.R., Jenkins D.B., Ungermann Ch.B. 1989. Bleaching with alternative layered minerals: a comparison with acid-activated montmorillonite for bleaching soybean oil. *JAOCS*, 66(3): 334-341.
- Toeneboehn G.J., Welsh W.A. 1991. Modified physical refining of canola oil novel adsorptive treatment of canola/rapeseed oil with silica adsorbents. *GC/RS Congress*: 797-801.
- Toro-Vazquez J.F. 1991. Interactions among oil components during adsorption: effects on carotenoids and peroxides. *J. Food Sci.*, 56(6): 1648-1650.
- Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuku M., Niki E. 1995. Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 137-147.
- Ward K., Scarth R., Daun J.K., Thorsteinson C.T. 1994a. Effects of processing and storage on chlorophyll derivatives in commercially extracted canola oil. *JAOCS*, 71(8): 811-815.
- Ward K., Scarth R., Daun J.K., Thorsteinson C.T. 1994b. A comparison of high-performance liquid chromatography and spectrophotometry to measure chlorophyll in canola seed and oil. *JAOCS* 71(9): 931-934.
- Ward K., Scarth R., Daun J.K., Thorsteinson C.T. 1994c. Characterization of chlorophyll pigments in ripening canola seed (*Brassica napus*). *JAOCS* 71(12): 1327-1331.
- Warner K., Frankel E.N. 1987. Effects of β -carotene on light stability of soybean oil. *JAOCS*, 64(2): 213-218.
- Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B. 1995. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref.*, 24: 663-1021, <http://www.rcdc.nd.edu/compilations/SingOx/SingOx.htm>
- Wilska-Jeszka J. 1994. Barwniki. Rozdział 13 w „Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności”. WNT Warszawa.