



# **ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΜΕ ΠΛΗΘΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**

**STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GREEK DAIRY  
PRODUCTS WITH MOLECULAR TESTS**

**ΒΡΕΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΙΩΑΝΝΑ**

**Φαρμακοποιός**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΙΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**



#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) Χαρουτουνιάν Σέρκο : Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος , Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2) Βεσκούκης Αριστείδης : Μεταδιδακτορικός Ερευνητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3) Κουρέτας Δημήτριος : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2018-2019. Μου δόθηκε η ευκαιρία να πραγματοποιήσω τα πειράματά μου μέσα σε ένα εργαστήριο υψηλών προδιαγραφών καθώς και να βρεθώ ανάμεσα σε ανθρώπους καταξιωμένους στο χώρο των βιοεπιστημών. Καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων ο καθηγητής και υπεύθυνος του εργαστηρίου κος. Κουρέτας Δ. μας ενθάρρυνε, μας οργάνωνε και μας ενημέρωνε για όλες τις τρέχουσες εξελίξεις στο χώρο της επιστήμης μας μέσα από εβδομαδιαίες παρουσιάσεις εντός του εργαστηρίου. Ακόμα μας ενθάρρυνε για συμμετοχή μας και παρουσίαση της έρευνάς μας σε συνέδρια και εκδηλώσεις με φιλανθρωπικό χαρακτήρα. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρέτα Δ. για την ευκαιρία που μου έδωσε να βρεθώ στην ομάδα του. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κύριο Βεσκούκη Α. που υπήρξε συνοδοιπόρος μου σ' αυτό το ταξίδι. Με υπομονή και διάθεση, από την αρχή έως το τέλος ήταν πάντα εκεί για όποια απορία δημιουργούνταν έτοιμος να βοηθήσει. Η εμπειρία του, οι γνώσεις του, η θέλησή του και η αυξημένη κρίση του, εκτός του ότι με βοήθησαν στην πειραματική διαδικασία, μου ενίσχυαν την όρεξη για έρευνα και μελέτη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου που με χαμόγελο ήταν έτοιμοι πάντα να βοηθήσουν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Την τελευταία δεκαετία ο αριθμός των εργασιών που σχετίζονται με το βιολογικό ρόλο των ελευθέρων ριζών έχει αυξηθεί σημαντικά. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην παθολογία αρκετών ασθενειών ενώ εξουδετερώνονται είτε από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού είτε από τα αντιοξειδωτικά μόρια που λαμβάνονται μέσω της τροφής. Κύρια διατροφικά προϊόντα που ενισχύουν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είναι τα γαλακτοκομικά. Τα κύρια γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το γάλα και το γιαούρτι, των οποίων η βιολογική δράση ποικίλλει ανάλογα με το είδος των ζώων από τα οποία λαμβάνονται, τον τρόπο επεξεργασίας τους και τη σύστασή τους. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να εκτιμηθεί η βιολογική αξία ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, με τα οποία τρέφονται κατά κύριο λόγο οι Έλληνες καταναλωτές. Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική και αναγωγική ικανότητα των κυριότερων δειγμάτων γάλακτος (7) και γιαουρτιού (2) της Ελληνικής αγοράς με τη βοήθεια 4 *in vitro* δοκιμασιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αγελαδινό γάλα έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH<sup>•</sup> και ανιόν σουπεροξειδίου καθώς και την ισχυρότερη αναγωγική δράση απέναντι στον τρισθενή σίδηρο (reducing power) ενώ το becel έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Επίσης, το αγελαδινό γιαούρτι παρουσίασε χαμηλότερο IC50 για τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> και το reducing power, το κατσικίσιο για τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> ενώ η δράση τους ήταν πανομοιότυπη στο reducing power. Συμπερασματικά, όλα τα δείγματα παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που υποδεικνύει τόσο ότι είναι διατροφικά συστατικά ύψιστης σημασίας όσο και ότι ορισμένα μεμονωμένα συστατικά τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή αντιοξειδωτικών μορίων.

**Λέξεις-Κλειδιά.** αγελαδινό, κατσικίσιο, καζεΐνη, γάλα αμυγδάλου, παστερίωση.

Εξώφυλλο	1
Τριμελής επιτροπή	2
Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Περιεχόμενα	5
Περιεχόμενα Πινάκων	8
Περιεχόμενα Σχημάτων	9
Περιεχόμενα Εικόνων	9
1.Εισαγωγή	10
1.1 Ιστορική Αναδρομή	10
1.2 Ελεύθερες ρίζες	10
1.2.1 Ορισμός	10
1.2.2 Προέλευση των ελευθέρων ριζών	11
1.2.3 Είδη δραστικών μορφών	12
1.2.4 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	13
1.2.4.1 Θετικές	13
1.2.4.2 Αρνητικές	14
1.3 Αντιοξειδωτικά	14
1.3.1 Ορισμός	14
1.3.2 Προέλευση Αντιοξειδωτικών	15
1.3.3 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	15
1.3.4 Επίπεδα δράσης αντιοξειδωτικών	16
1.3.5 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών	17
1.3.5.1 Αντιοξειδωτικά ενζυμικής προέλευσης	17
1.3.5.2 Μη ενζυμικής προέλευσης	19
1.3.6 Οξειδωτικό Στρες	22
1.4 Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ως πηγές αντιοξειδωτικών	23
1.4.1 Τα σημαντικότερα γαλακτοκομικά προϊόντα	23
1.4.1.1 Γάλα	23

1.4.1.2 Γιαούρτι	24
1.4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών	24
1.5 Σκοπός της εργασίας	27
2. Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1 Υλικά	28
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	28
2.1.2 Δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη	28
2.1.2.1 Δείγματα γάλακτος	28
2.1.2.2 Δείγματα γιαουρτιού	29
2.1.3 Αναλυτική σύσταση των δειγμάτων	29
2.1.4 Χαρακτηριστικά των δειγμάτων που μελετήθηκαν	32
2.1.4.1 Αγελαδινό γάλα και γιαούρτι	32
2.1.4.2 Ρόφημα αμυγδάλου Alpro χωρίς ζάχαρη	33
2.1.4.3 Becel pro active, 1,8% περιεκτικότητα σε λιπαρά	33
2.1.4.4 Κατσικίσιο γάλα και γιαούρτι	34
2.1.4.5 Παστεριωμένο ασπράδι αυγού Eggpro Muscles με γεύση φράουλα	35
2.2 Ανασκόπηση Μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν	35
2.2.1 Μέθοδος DPPH <sup>•</sup>	35
2.2.2 Μέθοδος ABTS <sup>+</sup>	36
2.2.3 Μέθοδος μέτρησης της αναγωγικής ισχύος (Reducing Power)	36
2.2.4 Μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου	36
2.3 Πρωτόκολλα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν	37
2.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας	

μέσω αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH <sup>•</sup>	37
2.3.1.1 Αρχή της μεθόδου	37
2.3.1.2 Πειραματική διαδικασία	38
2.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αναγωγής της ελεύθερης ρίζας ABTS <sup>+•</sup>	39
2.3.2.1 Αρχή της μεθόδου	39
2.3.2.2 Πειραματική διαδικασία	40
2.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω μέτρησης της αναγωγικής ισχύος (Reducing power)	42
2.3.3.1 Αρχή της μεθόδου	42
2.3.3.2 Πειραματική διαδικασία	43
2.3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου	44
2.3.4.1 Αρχή της μεθόδου	44
2.3.4.2 Πειραματική διαδικασία	45
2.4 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής Ικανότητας	47
3. Αποτελέσματα	48
3.1 Εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τη ρίζα DPPH <sup>•</sup>	48
3.1.1 Δείγματα γάλακτος	48
3.1.2 Δείγματα γιαουρτιού	49
3.2 Εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τη ρίζα ABTS <sup>+•</sup>	50
3.3 Εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων (Reducing power)	52
3.4 Εκτίμηση της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου	54
3.5 Συνολικά αποτελέσματα	56
3.5.1 Δείγματα γάλακτος	56
3.5.2 Δείγματα γιαουρτιού	56
4. Συζήτηση	58
4.1 Εφαρμογές από τη μελέτη της βιολογικής δράσης	

των γαλακτοκομικών προϊόντων	62
Συμπεράσματα	63
Βιβλιογραφία	65

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

## ΣΕΛΙΔΑ

Πίνακας 1: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο DPPH (παρουσία DPPH)	39
Πίνακας 2: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο DPPH (απουσία DPPH)	39
Πίνακας 3: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο ABTS (παρουσία HRP)	41
Πίνακας 4: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο ABTS (απουσία HRP)	41
Πίνακας 5: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο εκτίμησης της αναγωγικής ισχύς (παρουσία Σιδηροκυανιούχου Καλίου)	44
Πίνακας 6: Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο εκτίμησης της αναγωγικής ισχύος (απουσία Σιδηροκυανιούχου καλίου)	44
Πίνακας 7: Προσθήκη των διαλυμάτων (παρουσία PMS)	46
Πίνακας 8: Προσθήκη των διαλυμάτων (απουσία PMS)	46
Πίνακας 9: Συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των 7 δειγμάτων γάλακτος και των 2 δειγμάτων γιαουρτιού στις 4 δοκιμασίες (DPPH, ABTS, αναγωγική ισχύς, ρίζα σουπεροξειδίου)	56
Πίνακας 10: Συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των 2 δειγμάτων γιαουρτιού στις 4 δοκιμασίες (DPPH, ABTS, αναγωγική ισχύς, ρίζα σουπεροξειδίου)	57



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

## ΣΕΛΙΔΑ

Σχήμα 1. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα DPPH από τα δείγματα γάλακτος	48
Σχήμα 2. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα DPPH από τα δείγματα γιαουρτιού	49
Σχήμα 3. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα ABTS <sup>+</sup> από τα δείγματα γάλακτος	50
Σχήμα 4. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα ABTS <sup>+</sup> από τα δείγματα γιαουρτιού	51
Σχήμα 15. Τα αποτελέσματα της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων γάλακτος	52
Σχήμα 6. Τα αποτελέσματα της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων γιαουρτιού.	53
Σχήμα 7. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου από τα δείγματα γάλακτος	54
Σχήμα 8. Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου από τα δείγματα γιαουρτιού	55

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

## ΣΕΛΙΔΑ

Εικόνα 1 :Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων	11
Εικόνα 2 :Σχηματισμός Ελεύθερων ριζών	12
Εικόνα 3:ROS-ασθένειες	14
Εικόνα 4 :Αντιοξειδωτική Δράση (Δότης Ηλεκτρονίου)	15
Εικόνα 5:Αντιοξειδωτικοί ενζυμικοί μηχανισμοί	19
Εικόνα 6 :Οξειδωτικό Στρες	22
Εικόνα 7:Το γάλα	23
Εικόνα 8:Το γιαούρτι	24
Εικόνα 9 :Ποσοστά συστατικών γαλακτοκομικών προϊόντων διαφορετικών ειδών ζώων και ανθρώπου	27
Εικόνα 10: Αναγωγή της τεχνητής ρίζας DPPH	37
Εικόνα 11: Ενεργοποίηση και Αναγωγή/Αποχρωματισμός του ABTS <sup>+</sup>	40
Εικόνα 12: Αναγωγική ισχύ – Αλλαγή χρώματος	42
Εικόνα 13 : Μετατροπή του NBT <sup>2+</sup> σε φορμαζάνη με την βοήθεια των ριζών σουπεροξειδίου	45
Εικόνα 14 : Σύσταση κατσικίσιου γάλακτος ανάλογα με το είδος και την χώρα προέλευσης τους	60

## **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

Αν και οι πρώτες συζητήσεις για τις ελεύθερες ρίζες ξεκίνησαν νωρίς, τη δεκαετία του 1940, μόλις το 1969 η επιστημονική κοινότητα στρέφει έντονα το βλέμμα της σε αυτά τα μόρια (Pham-Huy et al. 2008). Οι επιστήμονες McCord και Fridovich (1969) συμβάλλουν αποφασιστικά στην ανάπτυξη του πεδίου της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας καθώς ανακαλύπτουν την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης με ρόλο την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Το ενδογενές αυτό ένζυμο ονομάστηκε υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) γιατί εξουδετέρωνε τη ρίζα του σουπεροξειδίου. Έτσι, ανοίγει ο δρόμος για τη μελέτη της δράσης των ελευθέρων ριζών με την εμφάνιση πλήθους επιστημονικών μελετών. Η αναγκαιότητά τους, η χρησιμότητά τους, τα οφέλη τους αλλά και οι πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις τους στην υγεία αποτελούν θεματικές ενότητες αρκετών ερευνών (Halliwell and Gutteridge 2015).

### **1.2 Ελεύθερες Ρίζες**

#### **1.2.1 Ορισμός**

Ως ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε άτομο ή μόριο με ένα ή/και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα (Jenkins 1988). Το χαρακτηριστικό αυτό κάνει αυτά τα μόρια αρκετά ασταθή αλλά και δραστικά σε σχέση με εκείνα που έχουν συμπληρωμένη την εξωτερική τους στιβάδα. Η τάση αυτών των μορίων να αντιδρούν με άλλες ενώσεις με στόχο την απόσπαση ηλεκτρονίων οφείλεται ειδικά στην ύπαρξη αυτού του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα (Sen 2001).

## 1.2.2. Προέλευση των ελευθέρων ριζών

### Ενδογενείς πηγές

Οι πηγές των ελευθέρων ριζών μπορούν να είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς. Συγκεκριμένα, η ενδογενής παραγωγή των ελευθέρων ριζών γίνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση όπου κατά την παραγωγή του ATP είναι αρκετά πιθανό να απομακρυνθούν ηλεκτρόνια από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 1). Οι φλεγμονώδεις καταστάσεις και η οξείδωση της ξανθίνης αποτελούν, ομοίως, ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών. Επίσης, ενδογενείς πηγές αποτελούν τα όργανα και τα υποκυτταρικά οργανίδια που έχουν ως κύριο ρόλο την καταστροφή, την απενεργοποίηση, τη βιομετατροπή και την απομάκρυνση των βλαβερών για τον οργανισμό ουσιών, όπως συμβαίνει στο ήπαρ κατά το στάδιο του μεταβολισμού και στα υπεροξειδιοσώματα (Halliwell 1999).

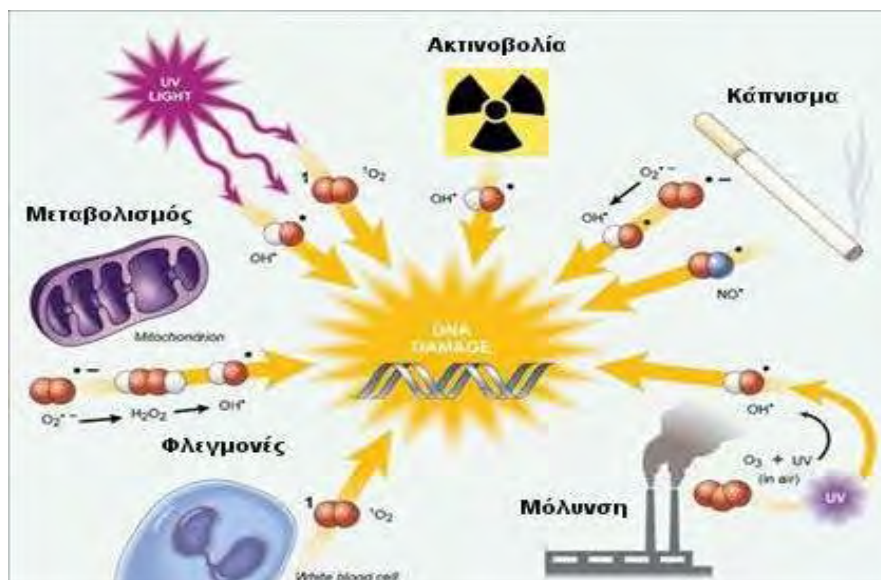


**Εικόνα 1.** Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων που αποτελεί ενδογενή πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών.

### Εξωγενείς πηγές

Αρκετές πηγές του περιβάλλοντος χώρου μπορούν να αποτελέσουν ερεθίσματα για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών εντός του ανθρώπινου σώματος (Εικόνα 2). Η

υπεριώδης ακτινοβολία, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, η κακή διατροφή, η λήψη φαρμάκων και η έκθεση σε φυτοφάρμακα και βιομηχανικά απόβλητα κρίνονται ως σημαντικές πηγές προέλευσης ελευθέρων ριζών (Ioannou et al. 2014).



**Εικόνα 2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών**

### 1.2.3 Δραστικές μορφές

Ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες:

1. ROS: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
2. RNS: Δραστικές Μορφές Αζώτου
3. RSS: Δραστικές Μορφές Θείου
4. RCS: Δραστικές Μορφές Χλωρίου

Οι ROS με κεντρικό άτομο το οξυγόνο αποτελούν την κύρια πηγή των υπολοίπων αφού μπορούν να αποτελέσουν βάση για την παραγωγή τους (Veskoukis et al. 2011).

Το οξυγόνο, αν και αποτελεί κύριο χημικό στοιχείο για την επιβίωση των οργανισμών, μπορεί να οδηγήσει υπό κάποιες συνθήκες σε ανεπιθύμητες ενέργειες όπως είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Όπως ειπώθηκε παραπάνω, κατά την

παραγωγή ATP διαφεύγουν ηλεκτρόνια από την αναπνευστική αλυσίδα και παράγονται ελεύθερες ρίζες. Καθώς το οξυγόνο αποτελεί κύριο αντιδρών αυτής της αντίδρασης, οι περισσότερες εξ αυτών είναι ROS. Οι δραστικές μορφές μπορεί να είναι ρίζες ή μη ανάλογα με τη χημική δομή τους. Παραδείγματα αποτελούν οι ρίζες του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), αντίστοιχα (Pham-Huy et al. 2008). Η  $O_2^{\cdot-}$  είναι η πρώτη ρίζα που προκύπτει από το οξυγόνο μετά από τη μερική αναγωγή του από ένα ηλεκτρόνιο, ενώ η ρίζα του υδροξυλίου είναι η πιο βλαβερή λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής της (Halliwell and Gutteridge 2015).

## **1.2.4 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών**

### *1.2.4.1 Θετικές*

Σε κατάλληλες συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες ασκούν θετική επίδραση στον οργανισμό συμμετέχοντας σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, παράγονται και ασκούν τη δράση τους έναντι παθογόνων μολυσματικών παραγόντων που είναι επιβλαβή για τον οργανισμό (Lobo et al. 2010). Ακόμα, οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν σηματοδοτικά μόρια διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία (Winterbourn 2015). Επιπλέον, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), στην αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al. 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτικότητας των μυών ενώ η αύξησή τους επιτείνει τη δύναμη συστολής των ινών (Reid 2001).

#### 1.2.4.2 Αρνητικές

Η υπέρμετρη παραγωγή των ελευθέρων ριζών ή η ανικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τις αδρανοποιήσουν μπορούν να επιφέρουν βλαβερές συνέπειες για τον οργανισμό οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και κυτταρικό θάνατο (Jones 2006). Επίσης, πολλές ασθένειες και καταστάσεις όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, η αθηροσκλήρωση, οι διάφορες μορφές καρκίνου, ο διαβήτης και η γήρανση έχουν συσχετιστεί με τη δράση των ελευθέρων ριζών (Liguori et al. 2018) (Εικόνα 3). Η επιβλαβής δράση τους έγκειται στην οξείδωση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA τροποποιώντας τη φυσιολογική λειτουργία των μακρομορίων αυτών (Halliwell 1999).



**Εικόνα 3.** Η συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με διάφορες ασθένειες.

### 1.3 Αντιοξειδωτικά

#### 1.3.1 Ορισμός

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιοδήποτε μόριο το οποίο όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell and Gutteridge 2015) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Ο τρόπος δράσης των περισσότερων αντιοξειδωτικών.

### 1.3.2 Προέλευση των αντιοξειδωτικών

Οι ελεύθερες ρίζες συνήθως παράγονται ενδογενώς και εξουδετερώνονται από τους φυσικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Ωστόσο, κάποιες από αυτές δραπέτευουν από τους φυσικούς αυτούς φραγμούς προκαλώντας βλάβες στον οργανισμό. Η διατροφή αποτελεί τη μεγαλύτερη πηγή αντιοξειδωτικών και συγκεκριμένα των πολυφαινολών (π.χ. φλαβονοειδή, στυλβένια) και των καροτενοειδών (β-καροτένιο που μετατρέπεται σε βιταμίνη Α, λυκοπένιο) (Fang et al. 2002).

### 1.3.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους έναντι των ελευθέρων ριζών. Χωρίζονται, έτσι, είτε σε δότες υδρογόνου είτε σε δότες ηλεκτρονίων. Ακόμα, έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων με μέταλλα όπως  $\text{Fe}^{2+}$  και  $\text{Cu}^{2+}$  που ευνοούν το σχηματισμό των

ελεύθερων ριζών. Τέλος, μπορούν να αναστείλουν τη δράση ενζύμων που εμπλέκονται στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών αλλά και να ασκήσουν δράση μέσω της συνέργειάς τους με άλλο αντιοξειδωτικό (Lobo et al. 2010).

#### *1.3.4 Επίπεδα δράσης αντιοξειδωτικών*

Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να χωριστεί στα επίπεδα της πρόληψης, της εξουδετέρωσης ριζών, της επιδιόρθωσης και στο επίπεδο της προσαρμογής.

- Επίπεδο πρόληψης: Η μετατροπή των υδροξυπεροξειδίων και των υπεροξειδίων σε αλκοόλες και H<sub>2</sub>O πριν την παραγωγή ελευθέρων ριζών καθώς και η μετατροπή των ROS σε σταθερότερα μόρια (π.χ. ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, GPx).
- Επίπεδο εξουδετέρωσης ριζών: Η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών από υδρόφιλα (αλβουμίνη, βιταμίνη C) ή/και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, ουβικινολόλη) όπως και η χηλική σύζευξη με μεταβατικά μέταλλα (Co, Fe) που έχουν προοξειδωτική δράση.
- Επίπεδο επιδιόρθωσης: Η επιδιόρθωση και η απομάκρυνση των τροποποιημένων πρωτεϊνών από το πρωτεόσωμα, τις πεπτιδάσες και τις πρωτεϊνάσες πριν τη συσσώρευσή τους. Επίσης, οι γλυκοζυλάσες και οι νουκλεάσες επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA που έχουν προκληθεί από ελεύθερες ρίζες.
- Ένα τέταρτο επίπεδο αντιοξειδωτικής άμυνας θεωρείται η ικανότητα προσαρμογής, μέσω της ενεργοποίησης και μεταφοράς ειδικών αντιοξειδωτικών στο σημείο δράσης. Η επιλογή των αντιοξειδωτικών αφορά το σήμα εκπομπής των ελευθέρων ριζών που παράχθηκαν (Lobo et al. 2010).



### 1.3.5 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν ανάλογα:

- με τη δράση τους, σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Τα ενζυμικής προέλευσης μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε πιο αδρανή μόρια και H<sub>2</sub>O με τη βοήθεια των Cu, Zn, Mg (π.χ. το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου). Από την άλλη τα μη ενζυμικής προέλευσης, όπως η βιταμίνη C διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής των ελευθέρων ριζών.
- με τη διαλυτότητά τους στο νερό, σε λιπόφιλα (βιταμίνη E, καροτενοειδή) και υδρόφιλα (βιταμίνη C). Τα λιπόφιλα συνήθως βρίσκονται στις μεμβράνες ενώ τα υδρόφιλα στο κυτταρόπλασμα.
- με το μέγεθός τους, σε μεγάλα αντιοξειδωτικά μόρια όπως η καταλάση και σε μικρά όπως η γλουταθειόνη που δρουν με ποικίλους τρόπους (Nimse & Pa 2014).

#### 1.3.5.1 Αντιοξειδωτικά ενζυμικής προέλευσης

Τα κύρια ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 5).

- Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) καταλύει την αντίδραση:



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αν και δεν είναι ιδιαίτερα ενεργό μπορεί να αντιδράσει με μεταβατικά μέταλλα όπως ο Fe<sup>2+</sup> και να δώσει την ιδιαίτερα δραστική OH· (Ahsan et al. 2003). Υπάρχει σε τρεις μορφές και εντοπίζεται τόσο ενδοκυτταρικά (κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια) όσο και εξωκυτταρικά. Οι μορφές διαχωρίζονται ανάλογα με τον μεταλλικό συμπάραγοντα (Cu, Zn - SOD, Mn, Fe - SOD, Ni - SOD (Johnson & Giulivi 2005).

- Η καταλάση (CAT) καταλύει την αντίδραση:



Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα αρκετά δραστικό μεταβολικό παραπροϊόν που συμμετέχει στην οξειδωτική βλάβη των κυττάρων. Η καταλάση το μετατρέπει σε λιγότερο δραστικές μορφές. Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο ήπαρ (Lobo et al. 2010).

- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



Ομοίως με την καταλάση, μετατρέπει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε λιγότερο δραστικές μορφές.

Χρησιμοποιείται η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης που οξειδώνεται τελικά

(Antunes 2002). Οι διαφορές με την καταλάση αφορούν την αφθονία τους στον

εκάστοτε ιστό δράσης καθώς και τη συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Στον εγκέφαλο είναι

υψηλή η συγκέντρωση της GPx συγκριτικά με την CAT ενώ στο ήπαρ υπάρχουν σε

παρόμοιες συγκεντρώσεις (Γιαννακοπούλου 2009).

- Η αναγωγή της γλουταθειόνης που φροντίζει για τη διατήρηση του λόγου GSH/GSSG σε φυσιολογικά επίπεδα καθώς η γλουταθειόνη είναι το κύριο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο. Καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



Η Gr δρα με την βοήθεια του ενζύμου FAD, το οποίο ανάγεται από το NADPH και

μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια στη δισουλφιδική γέφυρα που ενώνει τα δύο οξειδωμένα

μόρια γλουταθειόνης. Έτσι δυο νέα μόρια γλουταθειόνης δημιουργούνται.



**Εικόνα 5.** Οι κυριότεροι ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.

### 1.3.5.2 Αντιοξειδωτικά μη ενζυμικής προέλευσης

#### Γλουταθειόνη

Ανάγει τις ελεύθερες ρίζες και επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν ενώ συμβάλει και στην ανακύκλωση των αντιοξειδωτικών μορίων όπως η βιταμίνη C. Βρίσκεται σε 2 κύριες μορφές την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG) με την πρώτη να κυριαρχεί σε ποσοστό 95% σε φυσιολογικές συνθήκες. Ανεξάρτητα της αντιοξειδωτικής της δράσης συμμετέχει σε διαδικασίες αποτοξίνωσης, στο μεταβολισμό προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, στη μεταφορά αμινοξέων και στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών στο λεπτό έντερο (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

#### Πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα

Αποτελούν βασικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό του πλάσματος και των ιστών. Η ικανότητά τους να δεσμεύουν μέταλλα όπως ο  $Fe^{2+}$  μειώνει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών καθώς τα μέταλλα αυτά αντιδρούν με  $H_2O_2$  και παράγουν άλλες πιο

δραστικές ελεύθερες ρίζες μέσω της αντίδρασης Fenton (Mironczuk-Chodakowska 2016).

### *Αλβουμίνη*

Ρυθμίζει την οσμωτική πίεση και κατανέμει τα υγρά στα διάφορα διαμερίσματα του οργανισμού. Αποτελεί το κύριο εξωκυττάριο αντιοξειδωτικό μόριο. Είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του πλάσματος. Αρκετές ασθένειες, όπως η στεφανιαία νόσος και το εγκεφαλικό συνδέονται με τη μειωμένη συγκέντρωση της αλβουμίνης του πλάσματος (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

### *Σερουλοπλασμίνη*

Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που εμποδίζει το σχηματισμό των ριζών υδροξυλίου. Μεταφέρει το 95% του χαλκού στο αίμα και μετατρέπει τα ιόντα σιδηρούχων σε ιόντα σιδήρου. Μειωμένη συγκέντρωση της σερουλοπλασμίνης συνδέεται με αρκετές παθήσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως είναι η νόσος Alzheimer (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

### *Φεριτίνη*

Αποτελεί την κύρια αποθήκη σιδήρου. Προστατεύει τα κύτταρα από οξείδωση δεσμεύοντας ιόντα σιδήρου. Στη λευχαιμία τα κύτταρα που προσβάλλονται φαίνεται να έχουν μειωμένη συγκέντρωση φεριτίνης σε σχέση με τα υγιή (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

### *Λακτοφερίνη*

Παράγεται από τα ουδετερόφιλα και εντοπίζεται κυρίως στις σωματικές εκκρίσεις και ιδιαίτερα στο μητρικό γάλα. Εμφανίζει αντικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Στο μητρικό γάλα η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στην δέσμευση του  $Fe^{2+}$  αποτρέποντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

### *Βιταμίνη C*

Το υδρόφιλο αυτό μόριο αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό καθώς εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες μέσω αναγωγής τους είτε μέσω αναγωγής των μεταβατικών μετάλλων που αντιδρώντας κατάλληλα μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Padayatty S. 2016).

### *Βιταμίνη E*

Συγκεκριμένα, η α-τοκοφερόλη θεωρείται ένα ισχυρό και ευρέως εντοπισμένο *in vivo* αντιοξειδωτικό αφού ο λιποφιλικός της χαρακτήρας της επιτρέπει την είσοδο και δράση της στις λιποπρωτεΐνες και στις μεμβράνες (Sethi 2016). Εκεί βρίσκονται αρκετά πολυακόρεστα λιπίδια οπότε η αντιοξειδωτική της δράση έγκειται στην αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Niki 2015).

### *Ουρικό οξύ*

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά του οργανισμού και ιδιαίτερα του πλάσματος του αίματος. Προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από υπεροξειδωση και λύση όπως και την αιμοσφαιρίνη από οξειδωση (Ames et al. 1981).

## Συνένζυμο Q10

Ενισχύει τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Συμμετέχει στην μεταφορά e- τόσο στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων όσο και εκτός. Οι μειωμένες συγκεντρώσεις του σχετίζονται με τη γήρανση και με παθήσεις όπως η υπέρταση, ο διαβήτης και οι καρδιοπάθειες (Mironczuk-Chodakowska et al. 2016).

### 1.3.6 Οξειδωτικό στρες

Η ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών έχει οριστεί ως οξειδωτικό στρες (Εικόνα 6) (Sies 1985). Ωστόσο, σήμερα ο ορισμός αυτός έχει αλλάξει καθώς οξειδωτικό στρες θεωρείται η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Jones 1006). Το οξειδωτικό στρες προκαλεί δομικές και λειτουργικές βλάβες σε αρκετά ενδογενή μόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA αλλά και συμμετέχει στην πρόκληση αρκετών ασθενειών όπως ο καρκίνος (Halliwell & Gutteridge 2015). Ακόμα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει σε περιπτώσεις τραυματισμού λόγω υπερέκκρισης δραστικών μορφών οξυγόνου. Τέλος, κατά τη διάρκεια χημειοθεραπειών, οι ανεπιθύμητες ενέργειες της ακτινοβολίας μπορούν να οδηγήσουν σε τέτοιου είδους βλάβες και οξειδωτικό στρες (Lobo et al. 2010).



Εικόνα 6. Οξειδωτικό στρες.

#### **1.4 Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ως πηγές αντιοξειδωτικών**

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα λόγω του πλήθους των πρωτεϊνών που περιέχουν και κυρίως της καζεΐνης, των πρωτεϊνών ορού και των θειολών χαμηλού μοριακού βάρους (ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλη, ρετινόλη, καροτενοειδή) αποτελούν πηγή ισχυρών αντιοξειδωτικών μορίων. Η αντιοξειδωτική δράση των γαλακτοκομικών προϊόντων ποικίλει ανάλογα με (Cloetens 2013):

- την προέλευσή τους (αγελαδινό, κατσικίσιο ή πρόβειο προϊόν)
- την περιεκτικότητά τους σε λιπαρά (πλήρες ή ελαφρύ προϊόν)
- τη διαδικασία παραγωγής τους (π.χ. παστερίωση)
- τη σύστασή τους (π.χ. παρουσία ζάχαρης, γλουτένης κτλ).

#### **1.4.1 Τα σημαντικότερα γαλακτοκομικά προϊόντα**

##### *1.4.1.1 Το γάλα*

Σύμφωνα με το άρθρο 80 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1987) το γάλα (Εικόνα 7) είναι το προϊόν που προέρχεται από την αγελάδα, είναι νωπό, πλήρες, δεν έχει υποβληθεί σε αφυδάτωση ή συμπύκνωση και δεν έχουν προστεθεί σε αυτό άλλες εξωγενείς ύλες. Μπορεί, επίσης, να προέρχεται και από άλλα ζώα πέρα από την αγελάδα (π.χ. πρόβατο) ενώ αν δεν είναι νωπό μπορεί να είναι παστεριωμένο ή υψηλής θερμικής επεξεργασίας (έως 40°C). Τέλος, στην περίπτωση που δεν είναι πλήρες μπορεί να είναι αποβουτυρωμένο, ημί ή μερικά αποβουτυρωμένο.



**Εικόνα 7.** Το γάλα ως κύριο γαλακτοκομικό προϊόν

#### 1.4.1.2 Το γιαούρτι

Σύμφωνα με το άρθρο 82 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1987), το γιαούρτι (Εικόνα 8) ορίζεται ως το γαλακτοκομικό προϊόν που προέρχεται από την ζύμωση και την πήξη του γάλακτος με τη χρήση των μικροοργανισμών *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Lactobacillus acidophilus*. Παρόμοια με το γάλα, το γιαούρτι διακρίνεται στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.



**Εικόνα 8.** Το γιαούρτι ως κύριο γαλακτοκομικό προϊόν

#### 1.4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν λιπόφιλα (συζευγμένο λινελαϊκό οξύ, α-τοκοφερόλη, φωσφολιπίδια, συνένζυμο Q 10) και υδρόφιλα (βιταμίνη C, πεπτίδια, ιχνοστοιχεία) αντιοξειδωτικά μόρια (Grazyna et al 2017). Η αντιοξειδωτική δράση του γάλακτος και του γιαουρτιού οφείλεται κυρίως στις καζεΐνες (Zulueta 2009). Οι πρωτεΐνες αυτές προωθούν την αυτοοξειδωση του σιδήρου αποτρέποντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Cervato et al 1999). Επιπλέον, το ουρικό οξύ, ένα χαμηλού μοριακού βάρους μόριο, έχει αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα όπως ειπώθηκε και παραπάνω. Η αντιοξειδωτική δράση της καζεΐνης οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητά της σε αμινοξέα ενώ έχει βρεθεί ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού αποδίδεται κυρίως στην αλβουμίνη (Zulueta et al. 2009) και στις



ελεύθερες ομάδες θειολών της λακτοσφαιρίνης (Cloetens et al. 2013). Ακόμα, η αντιοξειδωτική ικανότητα του αποπρωτεϊνωμένου γάλακτος είναι αρκετά χαμηλή και οφείλεται στο ασκορβικό οξύ και στο ουρικό οξύ (Zulueta et al. 2009). Επιπρόσθετα, οι συνθήκες επεξεργασίας (πχ θέρμανση) επηρεάζουν την τελική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η παστερίωση και η υψηλή θερμική επεξεργασία (UHT) δεν επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του ολικού προϊόντος αλλά η UHT μειώνει το σχηματισμό των μελανοειδών που αποτελούν αντιοξειδωτικά μόρια. Ακόμα, σε συνθήκες παστερίωσης και υψηλής θερμικής η αλβουμίνη που συμβάλει στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού επηρεάζεται από την υψηλή θέρμανση (Zulueta 2009). Στην περίπτωση των αποβουτυρωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων η θέρμανση αυξάνει τη δραστηριότητα των μορίων με σουλφυδρικές ομάδες (πχ β-λακτοσφαιρίνη) αλλά η τελική αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του pH (Taylor & Richardson 1980). Επιπλέον, η προσθήκη φυτικών συστατικών όπως η σόγια καθυστερεί την οξείδωση, αυξάνει τη μακροζωία του γάλακτος και προσφέρει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με τα αντίστοιχα συνθετικά πρόσθετα. Ωστόσο, η προσθήκη πρόσθετων αντιοξειδωτικών στα γαλακτοκομικά αρκετές φορές κρίνεται ως μη επιθυμητή καθώς η ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των μη κορεσμένων λιπαρών προσδίδει στο γιαούρτι μια αύξηση της βιωσιμότητας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κατά την αποθήκευση με αποτέλεσμα την αλλοίωση του προϊόντος (Alenisan et al. 2017).

Τα γαλακτοκομικά περιέχουν και ενζυμικής προέλευσης αντιοξειδωτικά μόρια. Συγκεκριμένα, περιέχουν SOD παραπλήσια με αυτή που βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα. Επιπρόσθετα τα γαλακτοκομικά περιέχουν CAT. Αυτή, στο κέντρο έχει δεσμευμένο σίδηρο και καταλύει την αντίδραση μετατροπής των υπεροξειδίων του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Ομοίως, καταλύοντας την ίδια αντίδραση

υπάρχει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (σε μικρό ποσοστό). Αυτά τα ένζυμα βρίσκονται κυρίως στα λιποσφαιρίδια. Η λακτοπεροξειδάση είναι ένα ακόμα ένζυμο των γαλακτοκομικών. Καταλύει αντιδράσεις οξείδωσης αρκετών μορίων με βασικό προϊόν το  $H_2O_2$ . Είναι γαστροανθεκτική και ασκεί βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση λόγω οξείδωσης των θειοκυανιούχων αλάτων του γάλακτος (Grazyna et al. 2017).

Ακόμα, η διαφορετική πηγή προέλευσης των γαλακτοκομικών (π.χ. αγελαδινή ή κατσικίσια) επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές δράσεις των τελικών προϊόντων. Ακόμα, ανάμεσα στα ομοειδής προέλευσης προϊόντα υπάρχουν διαφορές που αποδίδονται στους διαφορετικούς βοσκότοπους, τον τρόπο σίτισης των ζώων και την εποχή παραγωγής των προϊόντων. Το αγελαδινό γάλα είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και ασβέστιο, στοιχεία απαραίτητα για την υγεία των οστών. Διαθέτει κορεσμένα λίπη, τα οποία όμως δεν επηρεάζουν τόσο το ποσοστό κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Επίσης, εμφανίζει αλλεργικά συμπτώματα και δεν είναι αρκετά εύπεπτο λόγω της περιεκτικότητας του σε λακτόζη (σε ομάδες πληθυσμών με ευαισθησία). Από την άλλη, τα κατσικίσια γαλακτοκομικά προϊόντα είναι υπό προϋποθέσεις κατάλληλα στη βρεφική ηλικία (Οδηγία 2006/141 ΕΚ) εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, μέταλλα και φυλλικό οξύ. Ωστόσο, η μειωμένη περιεκτικότητά τους σε λακτόζη τα κάνει πιο εύπεπτα (Turck 2013). Σχετικά με τις αντιοξειδωτικές ικανότητες και στα δυο είδη η περιεκτικότητα σε λίπη καθώς και η παρεμπόδιση που προκαλούν στις μετρήσεις επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα (Cloetens et al. 2013). Τα κατσικίσια γαλακτοκομικά προϊόντα από την άλλη είναι πιο εύπεπτα, έχουν υψηλότερη αλκαλικότητα, ρυθμιστικές ιδιότητες και θεραπευτικές/φαρμακευτικές σε σχέση με τα αγελαδινά. Επίσης, έχουν μικρότερη αλλεργιογόνο δράση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα προϊόντα διαφέρουν ανάλογα με τη φυλή, τη διατροφή, τις συνθήκες και το στάδιο της γαλουχίας των ζώων. Αν και τα περισσότερα συστατικά

ανάμεσα στα δυο είδη γαλακτοκομικών είναι ίδια διαφέρουν ως προς τους γενετικούς πολυμορφισμούς, τη συχνότητα και τα διάφορα χαρακτηριστικά (Εικόνα 9). Η δομή, το μέγεθος, η σύνθεση των μικκυλίων καζεΐνης, η αναλογία των πρωτεϊνών και των ανόργανων ενώσεων (υψηλότερη) και ιχνοστοιχείων είναι διαφορετικές στο γάλα κατσίκας σε σχέση με το αγελαδινό (Yangilar F. 2013).

Composition	Goat	Sheepa	Cow	Human
Fat (%)	3.8	7.9	3.6	4.0
Solids-non-fat (%)	8.9	12.0	9.0	8.9
Lactose (%)	4.1	4.9	4.7	6.9
Protein (%)	3.4	6.2	3.2	1.2
Casein (%)	2.4	4.2	2.6	0.4
Albumin, globulin (%)	0.6	1.0	0.6	0.7
Non-protein N (%)	0.4	0.8	0.2	0.5
Ash (%)	0.8	0.9	0.7	0.3
Calories/100 ml	70	105	69	68

**Εικόνα 9.** Ποσοστά συστατικών γαλακτοκομικών προϊόντων διαφορετικών ειδών ζώων και ανθρώπου.

### 1.5 Σκοπός πειράματος

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασική πηγή θρεπτικών συστατικών για τον άνθρωπο από τη βρεφική ακόμα ηλικία. Επίσης, αποτελούν βασικό συστατικό της Ελληνικής διατροφής. Τα κύρια γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το γάλα και το γιαούρτι, των οποίων η βιολογική δράση ποικίλλει ανάλογα με το είδος των ζώων από τα οποία λαμβάνονται, τον τρόπο επεξεργασίας τους και τη σύστασή τους. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να εκτιμηθεί η βιολογική, αντιοξειδωτική αξία ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, με τα οποία τρέφονται κατά κύριο λόγο οι Έλληνες καταναλωτές. Επομένως, στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική και αναγωγική ικανότητα των κυριότερων δειγμάτων γάλακτος και γιαουρτιού της Ελληνικής αγοράς με τη βοήθεια μοριακών *in vitro* δοκιμασιών.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

- DPPH
- Μεθανόλη
- ABTS
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- HRP (περοξειδάση)
- C<sub>6</sub>N<sub>6</sub>FeK<sub>3</sub> (σιδηροκυανιούχο κάλιο)
- FeCl<sub>3</sub> (τρισθενής σίδηρος)
- TCA (τριχλωροξικό οξύ)
- Ρυθμιστικά διαλύματα
- Tris-Hcl buffer
- NBT (nitroblue tetrazolium)
- NADH
- PMS (phenazine methosulfate)

#### 2.1.2. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

##### 2.1.2.1 Δείγματα γάλακτος

- Αγελαδινό γάλα Τρίκη, 3,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Αγελαδινό γάλα Τρίκη, 1,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Ρόφημα αμυγδάλου Alpro, χωρίς ζάχαρη
- Becel pro active, 1,8% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Κατσικίσιο γάλα Ροδόπη, 3,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Κατσικίσιο γάλα Ροδόπη, 1,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Παστεριωμένο ασπράδι αυγού Eggpro Muscles, με γεύση φράουλα

### 2.1.2.2 Δείγματα γιαουρτιού

- Αγελαδινό γιαούρτι Νότας, 4% περιεκτικότητα σε λιπαρά
- Κατσικίσιο γιαούρτι Όλυμπος, 4% περιεκτικότητα σε λιπαρά

### 2.1.3 Αναλυτική σύσταση των δειγμάτων

Αγελαδινό γάλα Τρίκη, 3,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά (ανά 100 ml)

Ενέργεια	264 kJ / 63 Kcal
Λιπαρά	3,5 gr / 2 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	3,2 gr
Υδατάνθρακες	4,7 gr
Αλάτι	0,11 gr
Ανόργανα συστατικά	120 mg

Αγελαδινό γάλα Τρίκη, 1,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά (ανά 100 ml)

Ενέργεια	171 kJ / 41 Kcal
Λιπαρά	1 gr / 0,7 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	3,2 gr
Υδατάνθρακες	4,7 gr
Αλάτι	0,11 gr
Ανόργανα συστατικά	120 mg

Ρόφημα αμυγδάλου Αίρο, χωρίς ζάχαρη (ανά 100 ml)

Ενέργεια	52 kJ / 13 Kcal
Λιπαρά	1,1 gr /0,1 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	0,4 gr
Υδατάνθρακες	0 gr
Αλάτι	0,13 gr
Ανόργανα συστατικά	Ca: 120 mg
Βιταμίνες	D: 0,75 μg, B2: 0,21 μg, B12: 0,38 μg, E: 1,8 μg

Becel pro active, 1,8% περιεκτικότητα σε λιπαρά (ανά 100 ml)

Ενέργεια	199 kJ / 47 Kcal
Λιπαρά	1,8 gr / 1 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	3,2 gr
Υδατάνθρακες	4,7 gr
Αλάτι	0,14 gr
Ανόργανα συστατικά	120mg

Κατσικίσιο γάλα Ροδόπη, 3,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά (ανά 100 ml)

Ενέργεια	269 kJ / 64 Kcal
Λιπαρά	3,5 gr / 2,2 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	3,7 gr
Υδατάνθρακες	4,5 gr
Αλάτι	0,08 gr
Ανόργανα συστατικά	Ca: 165 mg , P: 135 mg

Κατσικίσιο γάλα Ροδόπη, 1,5% περιεκτικότητα σε λιπαρά (ανά 100 ml)

Ενέργεια	195 kJ / 46 Kcal
Λιπαρά	1,5 gr / 0,9 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	3,7 gr
Υδατάνθρακες	4,5 gr
Αλάτι	0,08 gr
Ανόργανα συστατικά	Ca: 165 mg , P: 135 mg

Παστεριωμένο ασπράδι αυγού Eggpro Muscles, με γεύση φράουλα (ανά 100 ml)

Ενέργεια	238 kJ / 56 Kcal
Λιπαρά	1,5 gr / 0,9 gr κορεσμένα
Πρωτεΐνες	11,2 gr
Υδατάνθρακες	2,8 gr
Αλάτι	0,05 gr

Αγελαδινό γιαούρτι Νότας, 4% περιεκτικότητα σε λιπαρά (100 gr)

Ενέργεια	554 kJ / 132 kcal
Λιπαρά	4 gr / 2.6 gr κορεσμένα
Υδατάνθρακες	7,5 gr
Αλάτι	0 gr
Πρωτεΐνες	4,5 gr

Κατσικίσιο γιαούρτι Όλυμπος, 4% περιεκτικότητα σε λιπαρά (100 gr)

Ενέργεια	289 kJ / 69 kcal
Λιπαρά	4 gr / 2.5 gr κορεσμένα
Υδατάνθρακες	4,5 gr
Αλάτι	0,18 gr
Πρωτεΐνες	3,8 gr

## **2.1.4 Χαρακτηριστικά των δειγμάτων που μελετήθηκαν**

### *2.1.4.1 Αγελαδινό γάλα και γιαούρτι*

Συμπληρωματικά με αυτά που αναφέρθηκαν πιο πάνω το λίπος τους περιέχει ένα από τα πιο ισχυρά λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, το συζευγμένο λινολεϊκό ή λινελαϊκό οξύ (ΣΛΟ). Είναι ένα φυσικό trans λιπαρό οξύ που σε αντίθεση με τα αντίστοιχα βιομηχανικά είναι ωφέλιμο στον άνθρωπο ιδιαίτερα ως αντιοξειδωτικό. Εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες και ευθύνονται για την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η διαφορά των δύο ειδών



αγελαδινού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν έγκειται στην περιεκτικότητά τους σε λίπος. Επιπλέον, το αγελαδινό περιέχει αρκετά κορεσμένα ζωικά λίπη που είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία καθώς ενοχοποιούνται για την πρόκληση καρδιακών προβλημάτων (Newmark 2017).

#### *2.1.4.2 Ρόφημα αμυγδάλου Alpro χωρίς ζάχαρη*

Το αμύγδαλο είναι ένα φυτικό προϊόν που σχετίζεται με τον περιορισμό της συγκέντρωσης των λιπιδίων στο αίμα και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ δρα και ως καθαρτικό. Δεν περιέχει λακτόζη και γλουτένη οπότε είναι ιδανικό για ομάδες ατόμων με ευαισθησία σε αυτά τα μόρια. Επίσης, περιέχει λιγότερα λιπαρά σε σχέση με αρκετά προϊόντα ζωικής προέλευσης κι έτσι είναι ιδανικό για την προστασία της υγείας της καρδιάς (Arnarson 2017). Επιπλέον, περιέχει ιχνοστοιχεία όπως Mg, Zn, P και Cu καθώς και βιταμίνες, όπως η βιταμίνη E που έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η κατεργασία του κάτω από υψηλή πίεση και θερμοκρασία μειώνει το ποσοστό των περιεχόμενων σε αυτό πρωτεϊνών και άρα την αντιοξειδωτική δράση του (Sethi et al. 2016).

#### *2.1.4.3 Becel pro active, 1,8% περιεκτικότητα σε λιπαρά*

Είναι ένα ημιαποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα, το οποίο περιέχει φυτικές στερόλες σε ποσοστό 0,5%. Η απαιτούμενη καθημερινή ποσότητα λήψης των στερολών είναι 2 gr την οποία μπορεί εύκολα να λάβει κάποιος από την κατανάλωση τροφών εμπλουτισμένων σε αυτές. Οι στερόλες μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης των τροφών με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδά της στο αίμα και την προστασία από καρδιαγγειακά και άλλα συναφή νοσήματα (Fergusson 2007). Η β-σιτοστερόλη αναστέλλει τη δράση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6, η οποία εμπλέκεται σε αρκετές παθήσεις και η συγκέντρωσή της αυξάνεται σε καταστάσεις οξειδωτικού

στρες. Επίσης, ευνοεί την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 που δρα κατά της αθηροσκλήρυνσης (Fergusson 2007).

#### *2.1.4.4 Κατσικίσιο γάλα και γιαούρτι*

Η μειωμένη περιεκτικότητα των κατσικίσιων γαλακτοκομικών προϊόντων σε λακτόζη όπως, επίσης, και το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιριδίων που περιέχουν τα κάνουν πιο εύπεπτα ευνοώντας άτομα με σχετικά προβλήματα. Επιπλέον, περιέχουν αρκετά μικρής ή μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα (καπροϊκό οξύ, καπριλικό οξύ) που μειώνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης (LDL) στους ιστούς μειώνοντας την αποθήκευσή της και ενεργοποιώντας την κινητικότητά της. Ακόμα, οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα ως πιο εύπεπτα απορροφώνται περισσότερο. Επιπλέον, μελέτες πέψης με πεψίνης σε χωριστά κλάσματα ορού γάλακτος (πρωτεΐνες ορού: λακτοσφαιρίνη, αλβουμίνη, β-λακτογλουβίνη, α-λακταλβουμίνη) και σε καζεΐνη (α,β,κ) παράγουν αντιοξειδωτικά πεπτίδια. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τις βιομηχανίες τροφίμων και τις φαρμακευτικές εταιρείες για την πρόληψη ή/και την αποτελεσματική αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (Ahmed et al 2015). Ακόμα, η εύκολη προσαρμογή της κατσίκας στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και η υγιεινή διατροφή της, καθώς καταναλώνει λιγότερο λίπος από την αγελάδα έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, η οποία μπορεί επίσης να οφείλεται στην αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων όπως ο Zn στο κατσικίσιο γάλα και γιαούρτι (Alyagoubi et al. 2014; Diaz-Castro et al. 2012). Τα κατσικίσια προϊόντα αυξάνουν την πρόσληψη σιδήρου βοηθώντας τα άτομα με προβλήματα αναιμίας. Επίσης, ενισχύουν την ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα με αποτέλεσμα να προστατεύουν τα μακρομόρια από την οξείδωση σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα αντίστοιχα αγελαδινά προϊόντα (Diaz-Castro et al 2012).

#### *2.1.4.5 Παστεριωμένο ασπράδι αυγού Eggpro Muscles, με γεύση φράουλα*

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη αυγού (28 gr), το προϊόν αυτό συμβάλλει στη δόμηση και αύξηση του μυϊκού ιστού πριν ή μετά την άσκηση. Το 58,5% της διατροφικής αξίας του αυγού της κότας βρίσκεται στο ασπράδι καθώς περιέχει θρεπτικά συστατικά όπως το σελήνιο, η α-τοκοφερόλη, η ρετινόλη και ο Zn. (Nimalaratne & Wu 2015). Ακόμα, στο ασπράδι βρίσκεται η λεκιθίνη, ένα δομικό και λειτουργικό λιπίδιο των βιολογικών μεμβρανών που ενεργοποιεί αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η SOD. (Miranda et al. 2015). Η παστερίωση μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης τυφοειδούς πυρετού λόγω καταστροφής του βακτηρίου *Salmonella typhimurium*. Ωστόσο, επιταχύνει τις αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων από το μοριακό οξυγόνο με συνέπεια την απώλεια αρκετών θρεπτικών στοιχείων (Miranda et al. 2015). Τέλος, περιέχει αλλεργιογόνα συστατικά, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται σωστά για την αποφυγή τέτοιων κινδύνων (Nimalaratne & Wu 2015).

## **2.2. Ανασκόπηση δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη**

### *2.2.1 Δοκιμασία DPPH\**

Το DPPH\* (1,1 διφαινυλ – 2 πικρυλυδραζίλιο) είναι μία σταθερή, τεχνητή ελεύθερη ρίζα που έχει το N ως κεντρικό άτομο και έχει χρησιμοποιηθεί από το 1969 σε περισσότερες από 850 έρευνες. Η μέθοδος αυτή ευνοεί τη μέτρηση λιπόφιλων κυρίως μορίων, είναι αυτοματοποιημένη, εύκολη, γρήγορη και οικονομική (Ioannou et al. 2014). Η χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη ευνοεί την διαδικασία της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μίας ευρείας κλίμακας φυσικών και βιολογικών προϊόντων (π.χ., γαλακτοκομικά, φυτικά εκχυλίσματα, αίμα). Επίσης, ευνοεί την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μορίων όπως τα συζευγμένα λινελαϊκά οξέα, η α-τοκοφερόλη, η γλουταθειόνη και άλλα μόρια που βρίσκονται στα λαχανικά και στους

κόκκους σιταριού. Τέλος, τα μικρά μόρια ευνοούνται ενώ μόρια όπως τα καρετονοειδή μπορούν σε ένα βαθμό να παρεμποδίσουν τις μετρήσεις (Ioannou et al. 2014).

#### 2.2.2 Δοκιμασία ABTS<sup>++</sup>

Η σχετικά σταθερή ρίζα ABTS<sup>++</sup> [2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] αφού πρώτα παραχθεί κατά τη διάρκεια της μέτρησης, έχει ένα ευρύ φάσμα χρήσης καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων μορίων (Tirzitis & Bartosz 2010). Η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων σε ένα εύρος τιμών pH καθώς αυτό δεν επηρεάζει τις μετρήσεις. Τέλος, η μέτρηση αλκοολικών δειγμάτων με αυτή τη μέθοδο ευνοείται (Shalaby & Sanab 2012).

#### 2.2.3 Δοκιμασία μέτρησης της αναγωγικής ισχύος (*Reducing Power*)

Είναι μία δοκιμασία που βασίζεται στην αναγωγή ενός συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή, το οποίο τελικά αποκτά ένα έντονο πράσινο μπλε χρώμα με μέγιστη απορρόφηση στα 593 nm (Benzie & Strain 1996). Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη, απλή και έχει ευαισθησία τόσο στα υδρόφιλα όσο και στα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά μόρια (Ioannou et al. 2014).

#### 2.2.4 Δοκιμασία μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου

Η ρίζα σουπεροξειδίου αναφορά αποτελεί μία από τις κυρίαρχες δραστικές μορφές οξυγόνου. Το κύριο μόριο που την εξουδετερώνει μετατρέποντάς την σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και νερό είναι το ένζυμο SOD (Ahsan et al. 2003). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν τέτοιου είδους ένζυμα κυρίως στα λιποσφαιρίδια τους (Grazyna et al. 2017).

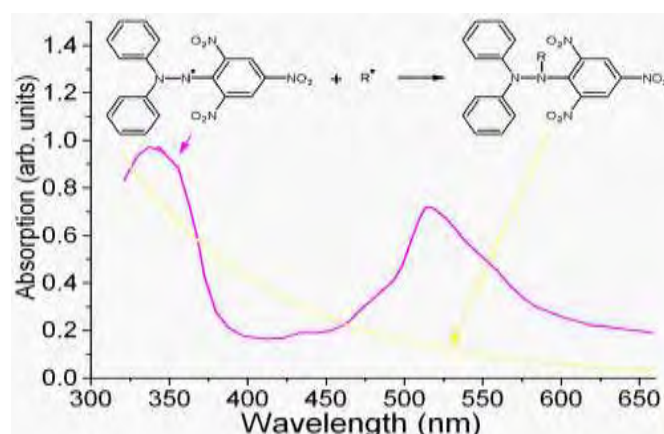
## 2.3 Πρωτόκολλα των δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν

Η αντιοξειδωτική και αναγωγική ισχύς των δειγμάτων εκτιμήθηκε με τις 4 προαναφερθείσες *in vitro* δοκιμασίες. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η ποσότητα των δειγμάτων που απαιτείται για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> και O<sub>2</sub><sup>•-</sup> κατά 50% (δηλαδή το IC50) και για την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή σε ποσοστό 50%.

### 2.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup>.

#### 2.3.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1958 (Blois) ενώ οι μετρήσεις στην παρούσα μελέτη έγιναν με βάση το πρωτόκολλο των Brand-Williams et al. 1995. Η ρίζα διαλύεται σε μεθανόλη, έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 520 nm. Η αναγωγή της ρίζας (Εικόνα 10) από κάποιο αντιοξειδωτικό με προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στη μείωση της οπτικής απορρόφησης λόγω του σχηματισμού της αντίστοιχης υδραζίνης η οποία έχει χρώμα κίτρινο (Kedare & Singh 2011).



Εικόνα 10. Αναγωγή της τεχνητής ρίζας DPPH<sup>•</sup>

### 2.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα του DPPH με τον οργανικό διαλύτη. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο οπότε το ποτήρι ζέσεως καλύπτεται με αλουμινόχαρτο. Συγκεκριμένα, σε 25,4 ml μεθανόλης προστίθενται 20 mg DPPH και αναδεύονται. Το διάλυμα διατηρείται στον πάγο έως ότου χρησιμοποιηθεί και σε περίπτωση περίσσειας μπορεί να συντηρηθεί στο ψυγείο (+4°C) για 3 ημέρες. Τα δείγματα του γάλακτος και του γιαουρτιού μετά από φυγοκέντρηση αραιώθηκαν με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις τους να είναι αυτές που φαίνονται στους πίνακες 1 και 2. Οι τελικές συγκεντρώσεις 1/100, 1/50 και 1/20 προέκυψαν από ήδη αραιωμένα δείγματα 1/10, 1/5 και 1/2, αντίστοιχα, ώστε διαλύοντας 100 μl από το κάθε δείγμα σε 900 μl dH<sub>2</sub>O να υποδεκαπλασιαστούν. Για τις 1/5, 1/4 και 1/3,3 μεταβλήθηκε η ποσότητα της μεθανόλης χωρίς αυτό να επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Σε όλα τα τελικά δείγματα ο τελικός όγκος ήταν 1000 μl. Σε eppendorf του 1,5 ml προστέθηκε το δείγμα, η μεθανόλη, και τελικά το DPPH. Έγινε ανάδευση σε vortex και επώαση στο σκοτάδι για 20 λεπτά ώστε να λάβουν μέρος οι προσδοκώμενες αντιδράσεις. Πριν τη φωτομέτρηση φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα και των δύο πινάκων στα 4830 g για 5 λεπτά, εκτός των γιαουρτιών, και στα 10.000 g για 10 λεπτά το παστεριωμένο ασπράδι αυγού. Η φυγοκέντρηση έγινε για να απομακρυνθούν τα συστατικά που αφενός δεν αντέδρασαν και αφετέρου παρεμπόδιζαν τις μετρήσεις. Το δείγμα ελέγχου περιείχε μόνο μεθανόλη και DPPH και είχε τη μέγιστη απορρόφηση. Το τυφλό περιείχε μόνο μεθανόλη. Για τον πίνακα 2 μετρήθηκε η απορρόφηση των μιγμάτων που περιέχουν μόνο το εκχύλισμα και την μεθανόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις με τον πίνακα 1. Αυτές αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες του πίνακα 1 ώστε η τελική μείωση της απορρόφησης να οφείλεται μόνο στην εξουδετέρωση του DPPH και όχι στα συστατικά των δειγμάτων τα οποία μπορεί

να απορροφούν στα 520 nm. Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίστηκε από τον τύπο: % αναστολή της ρίζας =  $(A_c - A_d / A_c) * 100$

Ο υπολογισμός γίνεται στο IC50 (η c του δείγματος), δηλαδή στο 50% αναστολής της ρίζας ή στο 50% μείωσης της απορρόφησης σε σχέση με την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (control)

	Τυφλό	Δείγμα ελέγχου	Αραιώσεις δειγμάτων						
			1/100	1/50	1/20	1/10	1/5	¼	1/3,3
Δείγμα (μl)			100	100	100	100	200	250	300
Μεθανόλη (μl)	1000	950	850	850	850	850	750	700	650
DPPH (μl)		50	50	50	50	50	50	50	50
Υτελ (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

**Πίνακας 1.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο DPPH (παρουσία DPPH).

	Αραιώσεις δειγμάτων						
	1/100	1/50	1/20	1/10	1/5	¼	1/3,3
Δείγμα (μl)	100	100	100	100	200	250	300
Μεθανόλη (μl)	900	900	900	900	800	750	700
Υτελ (μl)	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

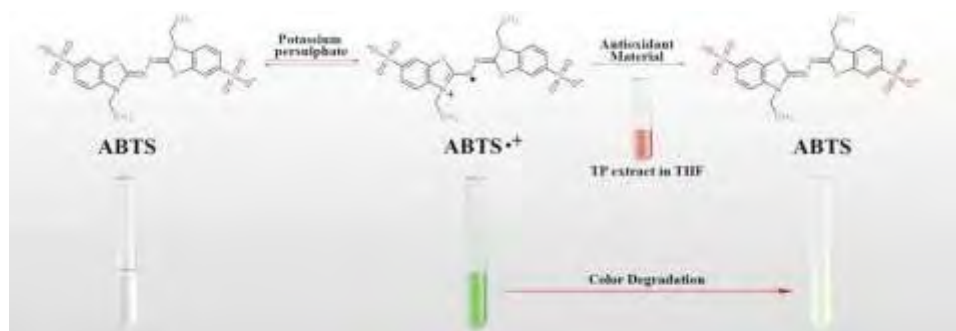
**Πίνακας 2.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο DPPH (απουσία DPPH)

### 2.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αναγωγής της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>+</sup>

#### 2.3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή εμφανίστηκε το 1993 από τους Miller et al. και χρησιμοποιείται ευρέως με αρκετές παραλλαγές. (Aparak R. et al 2018) Παρόμοια με την DPPH, η μέθοδος στηρίζεται στην ενεργοποίηση και αναγωγή της ρίζας ABTS<sup>+</sup> είτε μέσω προσθήκης ατόμων υδρογόνου (HAT) είτε μέσω προσθήκης ηλεκτρονίων (SET) και αποχρωματισμό του δείγματος με αποτέλεσμα τη μειωμένη οπτική απορρόφηση. (Shalaby & Shanab 2012). Η διαφορά με την πρώτη έγκειται στην αρχική

ενεργοποίηση της ρίζας μέσω οξείδωσης της από το  $H_2O_2$  παρουσία του ενζύμου horseradish peroxidase (HRP) (Apak R. et al 2018). Αφού ενεργοποιηθεί αποκτά ένα κυανό πράσινο χρώμα που απορροφά στα 730 nm. Εν συνεχεία, προστίθεται το προς μέτρηση δείγμα (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11.** Ενεργοποίηση και Αναγωγή/Αποχρωματισμός του  $ABTS^{•+}$ .

### 2.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Την ημέρα του πειράματος παρασκευάζονται τα διαλύματα. Είναι φωτοευαίσθητα οπότε τυλίγουμε τα ποτήρια ζέσεως με αλουμινόχαρτο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα διαλύματα παραμένουν στον πάγο.

Παρασκευές:

- ABTS (1 mM): για 20 ml δ/τος ζυγίζω 21,94 mg ABTS και τα διαλύω σε  $dH_2O$ .
- $H_2O_2$ : αρχικά διαλύω 100  $\mu$ l σε 9.900  $\mu$ l  $dH_2O$  (διάλυμα 1). Αφού γίνει ανάδευση παίρνω 68  $\mu$ l από το (1) και τα διαλύω σε 9860  $\mu$ l  $dH_2O$ .
- HRP: Διαλύω 1 mg σε 10 ml  $dH_2O$ . Προσθήκη σε περίπου 20 eppendorfs των 1,5 ml τα οποία έχω καλύψει προηγουμένως με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο και διατήρηση στους  $+4^\circ C$  για 2 μήνες ή στους  $-80^\circ C$ . Το ένζυμο πριν χρησιμοποιηθεί αραιώνεται 20 φορές (π.χ. 50  $\mu$ l σε 950  $\mu$ l  $dH_2O$ ). Σε eppendorf



των 1,5 ml προστίθενται με την σειρά το dH<sub>2</sub>O, το ABTS, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το HRP. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων με vortex και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά ώστε να γίνει η οξείδωση και η δημιουργία της ρίζας (το control πάλι θα έχει τη μέγιστη απορρόφηση). Τα δείγματα προπαρασκευάζονται ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 1/10 των αρχικών (Πίνακας 3). Ομοίως με τη μέθοδο DPPH παρασκευάζεται και ο δεύτερος πίνακας. (Πίνακας 4). Πριν τη μέτρηση τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 10.000 g για 15 λεπτά και η απορρόφηση μετράται στα 730 nm.

**Πίνακας 3.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο ABTS (παρουσία HRP).

	Τυφλό	Δείγμα Ελέγχου	Αραιώσεις Δειγμάτων									
			1/10	1/20	1/30	1/40	1/50	1/60	1/80	1/100	1/200	1/300
dH <sub>2</sub> O (μl)	450	400	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
ABTS (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
HRP (μl)	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Δείγμα (μl)	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Υτελ.(μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

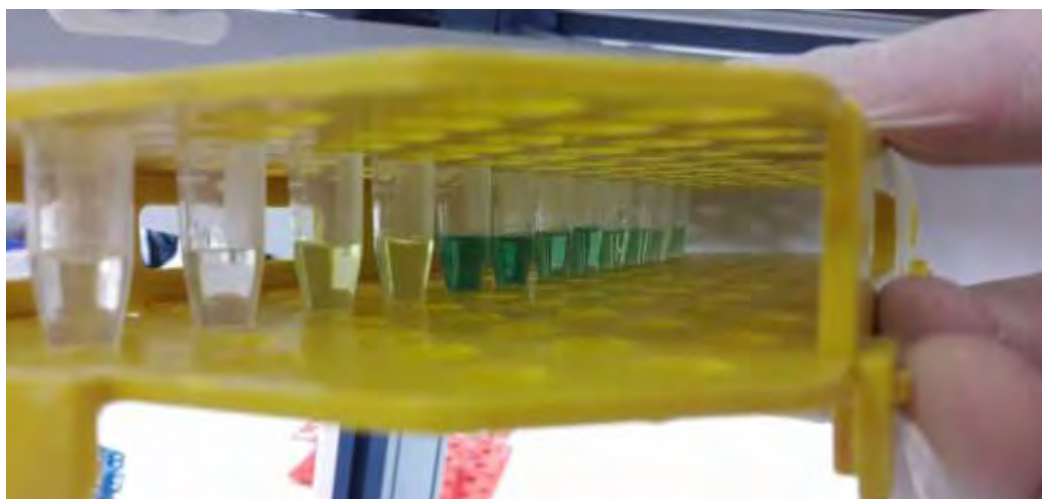
**Πίνακας 4.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο ABTS (απουσία HRP).

	Τυφλό	Αραιώσεις Δειγμάτων									
		1/10	1/20	1/30	1/40	1/50	1/60	1/80	1/100	1/200	1/300
dH <sub>2</sub> O (μl)	450	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350
ABTS (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Δείγμα (μl)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Υτελ.(μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

### 2.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω μέτρησης της αναγωγικής ισχύος (*reducing power*)

#### 2.3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Αναγωγικό (ή αντιοξειδωτικό) θεωρείται ένα μόριο που δίνοντας 1 e ή άτομο υδρογόνου (1p,1e) μπορεί και ανάγει τα οξειδωμένα μόρια. Η αναγωγική ισχύς υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen και Duh (1994). Το πείραμα βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου ( $\text{Fe}^{3+}$ /σιδηροκυανιούχο κάλιο) που έχει κίτρινο χρώμα και συγκεκριμένα του  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$  λόγω της παρουσίας του αναγωγικού μέσου, δηλαδή των προς μέτρηση δειγμάτων. Στη συνέχεια, το ανηγμένο σύμπλοκο αντιδρά με τον  $\text{FeCl}_3$  (πράσινο-μπλέ χρώμα) και απορροφά στα 700 nm (Εικόνα 12). Όσο αυξάνεται η απορρόφηση τόσο ισχυρότερο αναγωγικό μέσο είναι το δείγμα.



**Εικόνα 12.** Αναγωγική ισχύς - Αλλαγή χρώματος

### 2.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

1) Παρασκευή ενός buffer με φωσφορικά και νάτριο 0,2M και Ph=6

α) 13,9 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  σε 500 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  }  
β) 26,825  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  σε 500 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  } 62,5 ml (α) + 37,5 ml (β) σε τελικό

όγκο  $\text{dH}_2\text{O}$  200ml και το ρυθμίζουμε σε τελικό pH 6

2)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{FeK}_3$ : 0,1 gr σε 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  (φωτοευαίσθητο)

3)  $\text{FeCl}_3$ : 0,01 gr σε 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  (φωτοευαίσθητο)

4) TCA10%: 10 ml TCA σε 90 ml  $\text{dH}_2\text{O}$

Τα δείγματα (σε αραιώσεις 1/2, 1/2,5, 1/5, 1/10) προστέθηκαν απευθείας χωρίς αραιώση από το αρχικό δείγμα ενώ για τα 1/20 και 1/50 προετοιμάστηκαν αρχικά τα 1/2 και 1/5 τα οποία αραιώθηκαν 10 φορές (100 μl σε 900  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Τα δείγματα προστέθηκαν με τη σειρά που φαίνεται στον πίνακα 5 και επώαστηκαν στους 50°C για 20 λεπτά στο υδατόλουτρο ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια και αφού κρύωσαν προστέθηκε το TCA, το οποίο κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες ώστε στη φυγοκέντρηση (3000 rpm, 10 λεπτά) που ακολουθεί να γίνει η καθίζηση όποιου συστατικού δεν αντέδρασε. Μετά τη φυγοκέντρηση μεταφέρθηκαν 250 μl του υπερκείμενου σε νέα φιαλίδια erpendorf. Εκεί προστέθηκαν 250 μl  $\text{dH}_2\text{O}$  και 50 μl  $\text{FeCl}_3$  ώστε να αντιδράσει με το ανηγμένο πια σύμπλοκο και να δώσει απορρόφηση στα 700nm. Παρόμοια με τον πίνακα 5 κατασκευάζεται και ο πίνακας 6 στα δείγματα του οποίου δεν προστέθηκε σιδηροκυανιούχο κάλιο.

**Πίνακας 5.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο εκτίμησης της αναγωγικής ισχύος (παρουσία Σιδηροκυανιούχου καλίου).

Διαλύματα	Αραιώσεις Δειγμάτων							
	Τυφλό	Control	1/2	1 / 2,5	1/5	1/10	1/20	1/50
Δείγμα (μl)			500	400	200	100	100	100
Ρυθμιστικό δ/μα (μl)	500	250	100	100	300	400	400	400
Σιδηροκυανιούχο κάλιο( μl)		250	200	250	250	250	250	250
TCA (μl)	250	250	200	250	250	250	250	250

**Πίνακας 6.** Προσθήκη αντιδραστηρίων για την μέθοδο εκτίμησης της αναγωγικής ισχύος (απουσία Σιδηροκυανιούχου καλίου).

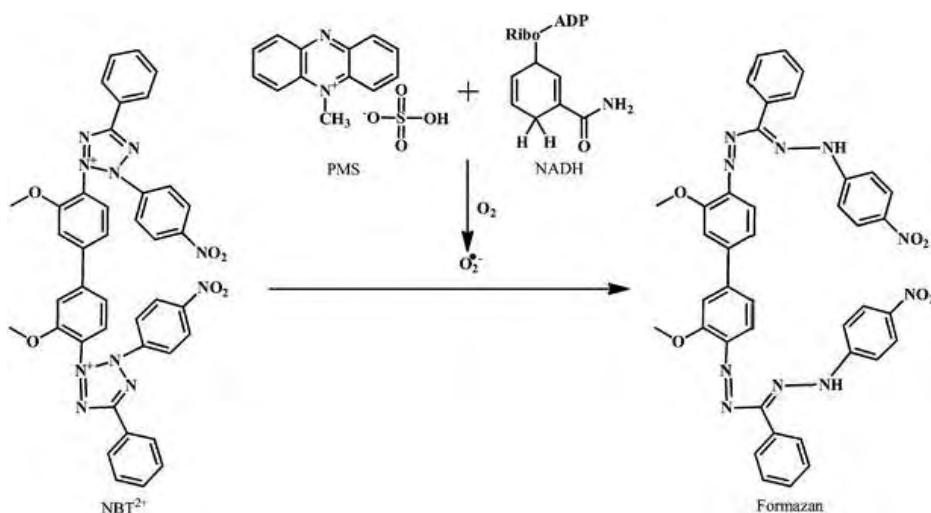
Διαλύματα	Αραιώσεις δειγμάτων					
	1 / 2	1 / 2,5	1/5	1/10	1/20	1/50
Δείγμα (μl)	500	400	200	100	100	100
Ρυθμιστικό δ/μα (μl)	300	350	550	650	650	650
TCA (μl)	200	250	250	250	250	250

2.3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου

2.3.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα σουπεροξειδίου προκύπτει από την αναγωγή του  $O_2$  από  $1 e^-$  (Pham-Huy et al. 2008). Από αυτό προκύπτουν οι περισσότερες ROS. Η μέθοδος στηρίζεται στην *in vitro* παραγωγή  $O_2^{\cdot -}$  μέσω του συστήματος PMS-NADH και ειδικά μέσω της οξείδωσης του NADH. Το  $O_2^{\cdot -}$  ανάγει το  $NBT^{2+}$  σε NBT, μία μπλε φορμαζάνη που απορροφά στα 560 nm. Η προσθήκη των αντιοξειδωτικών προκαλεί εξουδετέρωση

του  $O_2^-$ , αναστολή σχηματισμού του NBT και άρα μειωμένη απορρόφηση (Εικόνα 13) (Gülçin et al. 2004).



**Εικόνα 13.** Μετατροπή του  $NBT^{2+}$  σε φορμαζίνη με την βοήθεια των ριζών σουπεροξειδίου.

#### 2.3.4.2 Πειραματική διαδικασία

1) tris-HCl buffer (16 mM, pH=8). Φτιάχνω δ/μα 1 M (25 ml)

1000 ml	1*121.4 g	} pH (HCl) =8
25ml	x= 3.0285 g	

Στη συνέχεια παίρνω 2.4 ml από το αρχικό 1M και αραιώνω σε 147,6 ml  $dH_2O$ .

2) NBT(nitrobluetetrazolium) (300 $\mu$ M), MW=817.7

Για 100 ml δ/τος προσθέτω 24,513 mg NBT

3)PMS (phenazinemethosulfate) (60 $\mu$ M), MW=306.34

Για να φτιάξουμε 20ml δ/τος ζυγίζουμε 0,368mgPMS.

4) NADH (468 $\mu$ M), MW=709.4

Για να φτιάξουμε 40ml ζυγίζουμε 13,28 mg

Αρχικά, προστέθηκε το tris, μετά το NBT, το NADH, το δείγμα και τέλος το PMS (πίνακας 7). Μετά την τελευταία προσθήκη, ξεκινάει η αντίδραση. Τα δείγματα επωάστηκαν για 5 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Ο πίνακας 8 είναι χωρίς PMS.

Για τις συγκεντρώσεις C6,C7,C8

C6: 200/800(1/5)

C7:100/900(1/10)  προστέθηκαν 100 μl σε 900 μl dH<sub>2</sub>O

C8:50/950 (1/50)

	Τυφλό	Δείγμα Ελέγχου	Αραιώσεις Δειγμάτων							
			1/2	1/3	1/4	1/5	1/10	1/50	1/100	1/200
Δείγμα (μl)	-	-	500	333	250	200	100	100	100	100
dH <sub>2</sub> O (μl)	-	50								
TRIS-HCl (μl)	750	575	125	292	375	425	525	525	525	525
NBT (μl)	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
NADH (μl)	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
PMS (μl)		125	125	125	125	125	125	125	125	125

**Πίνακας 7.** Προσθήκη των διαλυμάτων (παρουσία PMS).

	Αραιώσεις Δειγμάτων							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Δείγμα (μl)	500	333	250	200	100	100	100	100
dH <sub>2</sub> O (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-
Tris (μl)	250	417	500	550	650	650	650	650
NBT (μl)	125	125	125	125	125	125	125	125
NADH (μl)	125	125	125	125	125	125	125	125

**Πίνακας 8.** Προσθήκη των διαλυμάτων (απουσία PMS).

## 2.4 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για τις μεθόδους DPPH, ABTS και superoxide scavenging activity η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται μέσω του κλάσματος:

$$\frac{A_0 - A_\delta}{A_0} * 100$$

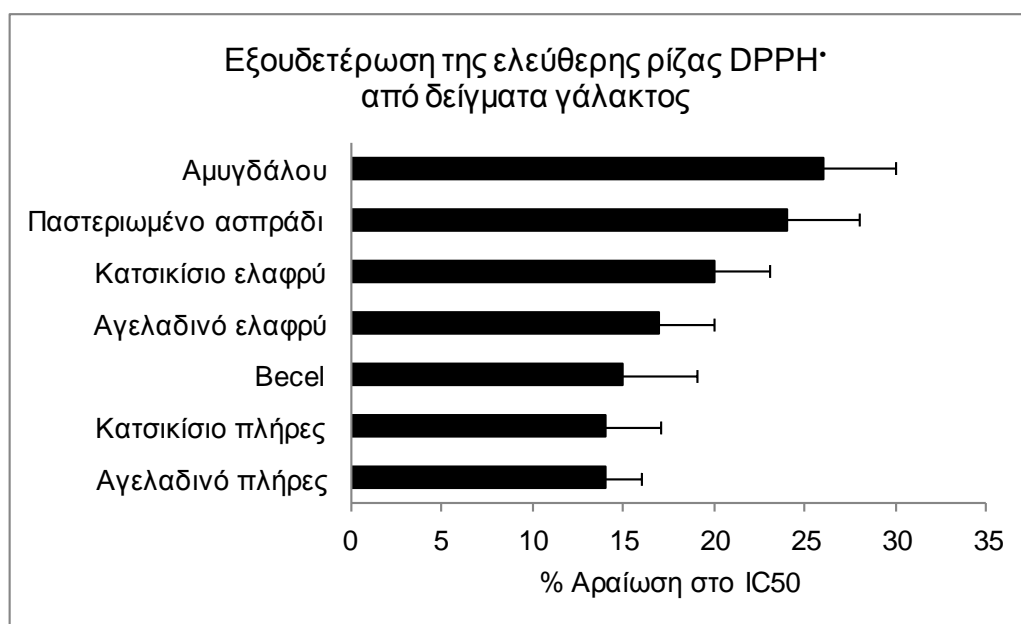
Όπου  $A_0$  η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (control) και  $A_\delta$  η απορρόφηση του δείγματος. Ο υπολογισμός αφορά την % εξουδετέρωση των ριζών από τα αντιοξειδωτικά μόρια των δειγμάτων. Επίσης, υπολογίστηκε το IC50 (η συγκέντρωση αναστολής) για κάθε δείγμα. Όσο μικρότερη η συγκέντρωση και η ποσότητα που προκαλεί την 50% μείωση της ρίζας τόσο πιο ισχυρό είναι το δείγμα. Για τον υπολογισμό της αναγωγικής ισχύος όπου η αυξημένη απορρόφηση υποδεικνύει και αυξημένη αναγωγική ισχύ βρέθηκε η συγκέντρωση που προκαλεί αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου κατά 50% και ισοδυναμεί με τιμή απορρόφησης ίση με 0,5.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τη ρίζα DPPH'

##### 3.1.1 Δείγματα γάλακτος

Το πλήρες αγελαδινό γάλα εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50% (IC50) (Σχήμα 1).

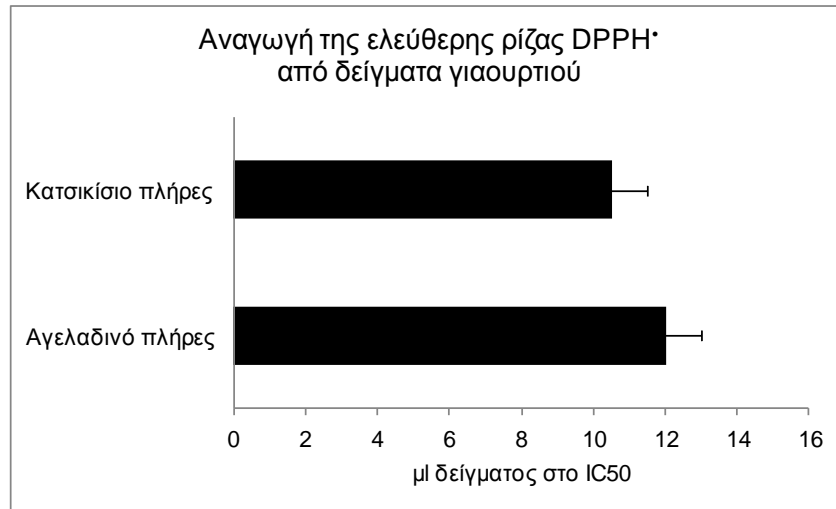


**Σχήμα 1.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH' από τα δείγματα γάλακτος.



### 3.1.2 Δείγματα γιαουρτιού

Το κατσικίσιο γιαούρτι εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50% (IC50) (Σχήμα 2).

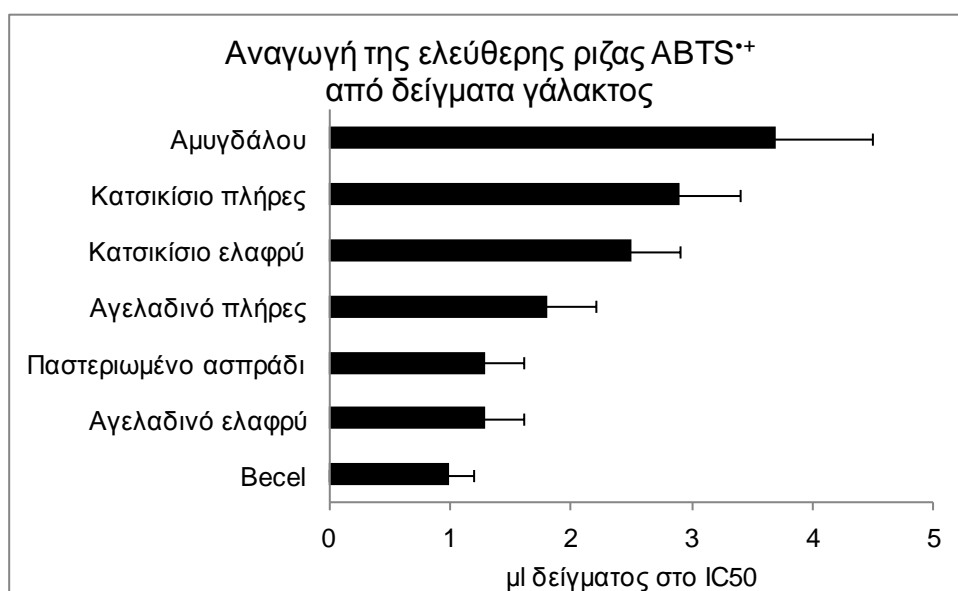


**Σχήμα 2.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα DPPH\* από τα δείγματα γιαουρτιού.

### 3.2 Εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τη ρίζα ABTS<sup>+</sup>

#### Δείγματα γάλακτος

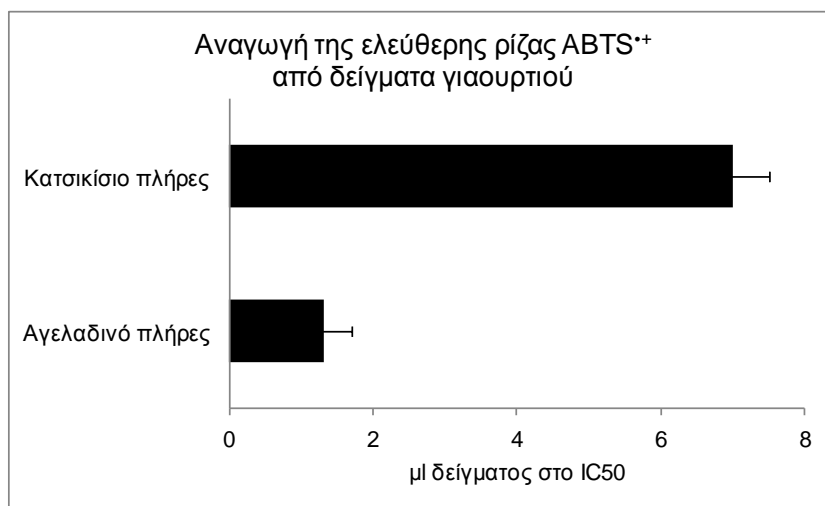
Το becel pro active εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50% (IC50) (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>+</sup> από τα δείγματα γάλακτος.

### Δείγματα γιαουρτιού

Το αγελαδινό γιαούρτι εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> κατά 50% (IC<sub>50</sub>) (Σχήμα 4).

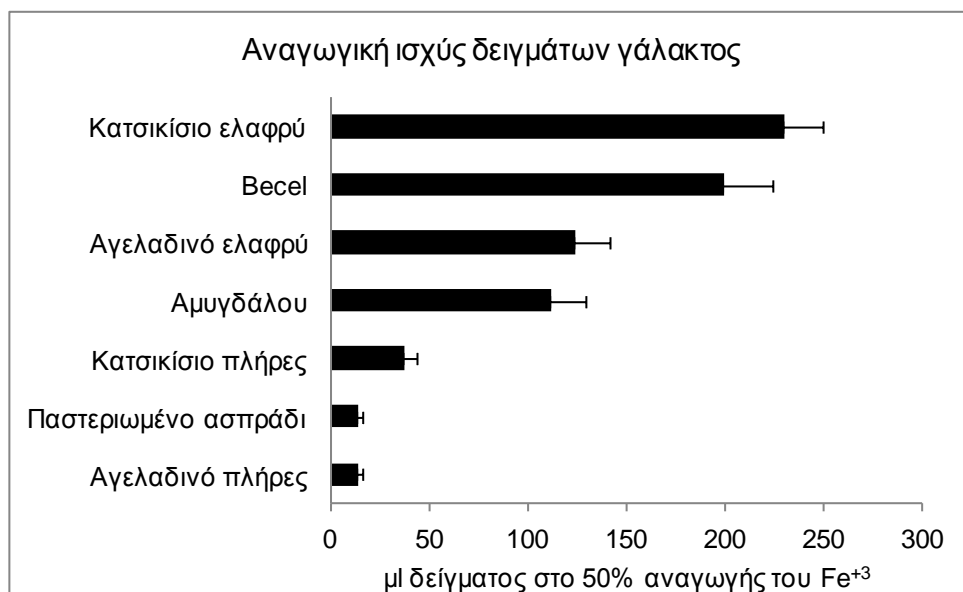


**Σχήμα 4.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζα ABTS<sup>•+</sup> από τα δείγματα γιαουρτιού.

### 3.3 Εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων (reducing power)

#### Δείγματα γάλακτος

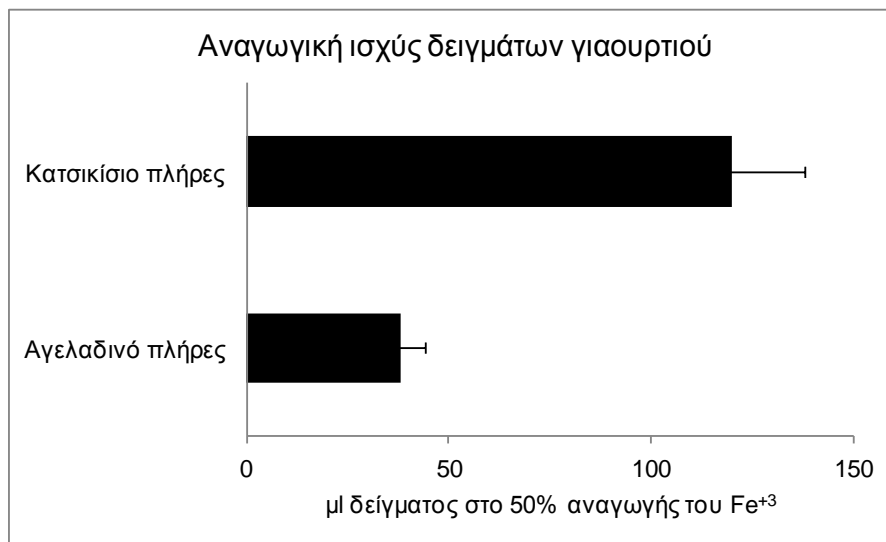
Το πλήρες αγελαδινό γάλα είχε την ισχυρότερη αναγωγική ισχύ καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την αναγωγή του  $\text{Fe}^{+3}$  σε  $\text{Fe}^{+2}$  κατά 50% (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Τα αποτελέσματα της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων γάλακτος.

### Δείγματα γιαουρτιού

Το αγελαδινό γιαούρτι είχε την ισχυρότερη αναγωγική ισχύ καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την αναγωγή του  $\text{Fe}^{+3}$  σε  $\text{Fe}^{+2}$  κατά 50% (Σχήμα 6).

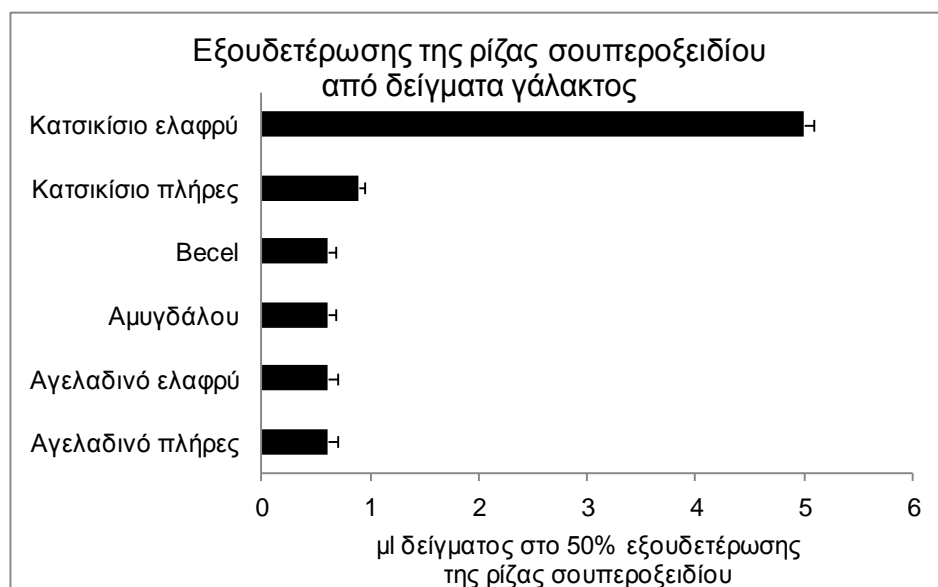


**Σχήμα 6.** Τα αποτελέσματα της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων γιαουρτιού.

### 3.4 Εκτίμηση της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου από τα δείγματα γάλακτος

#### **Δείγματα γάλακτος**

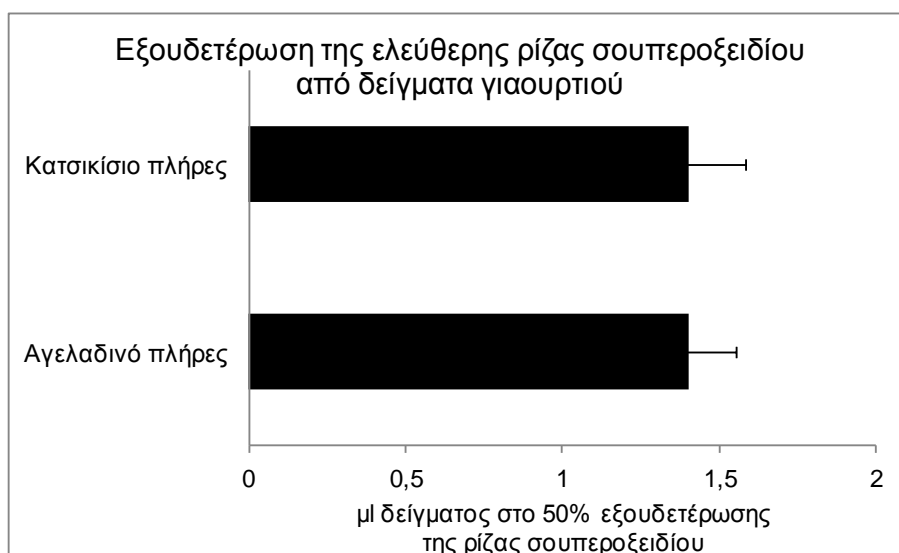
Το πλήρες αγελαδινό γάλα εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η μικρότερη ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου κατά 50% (IC50) (Σχήμα 7).



**Σχήμα 7.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου από τα δείγματα γάλακτος.

### Δείγματα γιαουρτιού

Τα δύο δείγματα γιαουρτιού που εξετάστηκαν εμφάνισαν όμοια αντιοξειδωτική δράση καθώς απαιτείται η ίδια ποσότητα για την εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου κατά 50% (IC50) (Σχήμα 8).



**Σχήμα 8.** Τα αποτελέσματα της εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου από τα δείγματα γιαουρτιού.

### 3.5 Συνολικά αποτελέσματα

#### 3.5.1. Δείγματα γάλακτος

**Πίνακας 9.** Συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των 7 δειγμάτων γάλακτος και των 2 δειγμάτων γιαουρτιού στις 4 δοκιμασίες (DPPH, ABTS, αναγωγική ισχύς, ρίζα σουπεροξειδίου). Τα δείγματα κατατάσσονται από το πιο ισχυρό προς το λιγότερο ισχυρό.

DPPH	ABTS	Αναγωγική ισχύς	Ρίζα σουπεροξειδίου
Αγελαδινό 3,5%	Becel 1,8%	Αγελαδινό 3,5%	Αγελαδινό 3,5%
Κατσικίσιο 3,5%	Αγελαδινό 1,5%	Παστεριωμένο ασπράδι αυγού	Αγελαδινό 1,5%
Becel 1,8%	Παστεριωμένο ασπράδι αυγού	Κατσικίσιο 3,5%	Αμυγδάλου Αlpro
Αγελαδινό 1,5%	Αγελαδινό 3,5%	Αμυγδάλου Αlpro	Becel 1,8%
Κατσικίσιο 1,5%	Κατσικίσιο 1,5%	Αγελαδινό 1,5%	Κατσικίσιο 3,5%
Παστεριωμένο ασπράδι αυγού	Κατσικίσιο 3,5%	Becel 1,8%	
Αμυγδάλου Αlpro	Αμυγδάλου Αlpro	Κατσικίσιο 1,5%	Κατσικίσιο 1,5%

Συνολικά, το πλήρες αγελαδινό γάλα 3,5% εμφανίζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στις 3 από τις 4 δοκιμασίες ενώ το αμυγδάλου Αlpro είναι το λιγότερο ισχυρό μαζί με το ελαφρύ κατσικίσιο 1,5%.

#### 3.5.2. Δείγματα γιαουρτιού

**Πίνακας 10.** Συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των 2 δειγμάτων γιαουρτιού στις 4 δοκιμασίες (DPPH, ABTS, αναγωγική ισχύς, ρίζα



σουπεροξειδίου). Τα δείγματα κατατάσσονται από το πιο ισχυρό προς το λιγότερο ισχυρό.

<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>	<b>Αναγωγική ισχύς</b>	<b>Ρίζα σουπεροξειδίου</b>
Κατσικίσιο	Αγελαδινό (>>)	Αγελαδινό	Αγελαδινό και
Αγελαδινό	Κατσικίσιο	Κατσικίσιο	Κατσικίσιο

Το αγελαδινό γιαούρτι εμφανίζει πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στις 2 από τις 3 δοκιμασίες ενώ και τα 2 δείγματα έχουν όμοια δράση αναφορικά με την εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου.

#### 4. Συζήτηση

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα (δείγματα γάλακτος και γιαουρτιού) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις 4 *in vitro* δοκιμασίες. Συγκεκριμένα, τόσο τα δείγματα γάλακτος όσο και τα δείγματα γιαουρτιού συνέβαλαν στην εξουδετέρωση των εμπορικά διαθέσιμων, σταθερών ελευθέρων ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> καθώς και της ρίζας σουπεροξειδίου, η οποία παράγεται στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, ήταν ικανά να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή καταδεικνύοντας ότι είναι ισχυρά αναγωγικά μόρια. Είναι άξιο αναφοράς ότι η επιθυμητή (IC50) αναγωγική και αντιοξειδωτική δράση των προαναφερθέντων δειγμάτων παρατηρήθηκε κατά κύριο λόγο με τη χρήση μικρής ποσότητας (εκφρασμένης σε μl) από αυτά, γεγονός που αναδεικνύει την υψηλή βιολογική αξία τους. Οι διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στη δράση μεταξύ των δειγμάτων αποδίδεται στα διαφορετικά συστατικά που εμπεριέχονται στο κάθε καθένα, στη διαφορετική προέλευσή τους (αγελαδινή ή κατσικίσια) καθώς και στο διαφορετικό τρόπο παρασκευής τους.

Η ευαισθησία της δοκιμασίας DPPH ως προς τα λιπόφιλα συστατικά ευνοεί τη μέτρηση δειγμάτων που είναι πλούσια σε αυτά όπως είναι το πλήρες αγελαδινό και κατσικίσιο γάλα (με 3,5% λιπαρά) και τα δύο είδη γιαουρτιού (με 4% λιπαρά). Για το λόγο αυτό, τα παραπάνω δείγματα γάλακτος που είναι πλήρη σε λιπαρά επέδειξαν τη μεγαλύτερη ικανότητα να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Στην περίπτωση των γιαουρτιών, το κατσικίσιο γιαούρτι, το οποίο περιέχει 4% λιπαρά εμφανίζει ελαφρώς ισχυρότερη αναγωγική δράση σε σχέση με το αγελαδινό κάτι που οφείλεται και στη διαφορετική του σύσταση αλλά και στο διαφορετικό τρόπο παρασκευής του. Τα κατσικίσια γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν αρκετά μικρού μεγέθους λιποσφαιρίδια και καπριλικά οξέα. Περιέχουν ακόμα λακτόζη σε πολύ μικρό

ποσοστό. Ακόμα, τα ζώα αυτά, λόγω της διατροφής τους και της γρήγορης προσαρμογής τους στις αντίξοες συνθήκες εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό παραγωγής ελευθέρων ριζών. Από την άλλη τα αγελαδινά γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη σε σχέση με τα προηγούμενα όπως και περισσότερα ζωικά λίπη. (Diaz-Castro 2012). Επιπλέον, είναι δυνατή η αξιολόγηση της δράσης των συζευγμένων λινελαϊκών οξέων με αυτή τη μέθοδο με αποτέλεσμα το αγελαδινό γάλα που είναι πλούσιο σε τέτοια μόρια να ευνοείται και να εκτιμάται με μεγαλύτερη ακρίβεια η αντιοξειδωτική του ικανότητα, όπως συνέβη και στην παρούσα μελέτη (Cervato 1999). Είναι άξιο αναφοράς ότι το ρόφημα αμυγδάλου έχει πολύ χαμηλή αντιοξειδωτική δράση καθώς έχει ελάχιστες πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες με δυνητικά σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Η ευαισθησία της δοκιμασίας ABTS τόσο για τα λιπόφιλα όσο και για τα υδρόφιλα μόρια επιτρέπει την ανάλυση αρκετών ουσιών με ποικίλη σύσταση καθιστώντας τη ιδιαίτερα ικανή να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα σχετική με την αναγωγική/αντιοξειδωτική δράση των ουσιών αυτών (Ioannou et al. 2014). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το becel pro active είχε την πιο μεγάλη ικανότητα να ανάγει την ελεύθερη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Αυτό το εύρημα είναι αναμενόμενο διότι είναι ένα αγελαδινό γάλα που περιέχει β-σιτοστερόλη ενώ είναι ημι-αποβουτυρωμένο και περιέχει τα λίπη ενός αγελαδινού γάλακτος. Η β-σιτοστερόλη όπως αναφέρθηκε μειώνει το παράγοντα IL-6 που συνδέεται με το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιεί την δράση του IL-10 που δρα αντιοξειδωτικά (Fergusson 2007). Το γεγονός ότι είναι αποβουτυρωμένο δίνει ένα πλεονέκτημα στις μετρήσεις καθώς αυτά μπορούν να τις παρεμποδίσουν. Η ABTS ευνοεί τις γρήγορες αντιδράσεις οπότε όσο λιγότερες παρεμποδίσεις τόσο πιο ορθό το αποτέλεσμα (Ioannou et al. 2014). Το αγελαδινό γιαούρτι βρέθηκε ότι έχει πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το κατσικίσιο καθώς σημαντικό ρόλο παίζουν και τα ιδιαίτερα συστατικά του. Τα

αγελαδινά γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν αρκετές πρωτεΐνες και λίπη. Όπως είδαμε παραπάνω τα γαλακτοκομικά προϊόντα αν και διαφορετικής προέλευσης περιέχουν παρόμοια μόρια αλλά σε διαφορετική σύσταση [Εικόνα 9:Ποσοστά συστατικών γαλακτοκομικών προϊόντων διαφορετικών ειδών ζώων και ανθρώπου]. Ακόμα και ανάμεσα σε ίδιας προέλευσης υπάρχουν διαφορές όπως δείχνει η Εικόνα 14.

Country	Breed	Total solids (%)	Fat (%)	Proteins (%)	Caseins (%)	Lactose (%)	Ash (%)
United Kingdom	British Saanen	11.6	3.48	2.61	2.30	4.30	0.80
United Kingdom	Nubian	-	4.94	3.60	-	4.51	-
France	Alpine Saanen	-	3.6	3.2	-	-	-
Italy	Sardinian	-	5.1	3.9	-	-	0.71
Greece	Local	14.8	5.63	3.77	3.05	4.76	0.73
Cyprus <sup>b</sup>	Damascus	13.2	4.33	3.75	2.97	-	0.83
Spain	Murciano-Granadina	-	-	4.09	3.21	-	-

<sup>a</sup>Pirisi et al., (2007)

<sup>b</sup>Psathas (2005)

**Εικόνα 14.** Σύσταση κατσικίσιου γάλακτος ανάλογα με το είδος και τη χώρα προέλευσης.

Ομοίως, η δοκιμασία reducing power είναι εξίσου ευαίσθητη σε λιπόφιλα και υδρόφιλα μόρια ενώ σημειώνεται ότι δεν ενδείκνυται για τη μέτρηση ορισμένων αντιοξειδωτικών μορίων όπως είναι οι θειόλες της βλακτοσφαιρίνης (Cloetens et al. 2013). Έτσι, δείγματα γάλακτος με λιγότερα λιπαρά συστατικά που περιέχουν επιπρόσθετα θειόλες λακτογλουβίνης, όπως συμβαίνει με τα ελαφρύ αγελαδινό και κατσικίσιο και το Becel εμφανίζουν τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση με τη δοκιμασία αυτή. Συγκρίνοντας με τα μl δείγματος που απαιτούνται για την αναγωγή του τρισθενούς σε δισθενή σίδηρο, φαίνεται ότι υπάρχει διαφορά στην τάξη μεγέθους σε σχέση με τις προηγούμενες δοκιμασίες καθώς σε αυτή οι τιμές είναι πολύ υψηλές. Επομένως, είναι πιθανό να μη λαμβάνεται υπόψη η δράση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών. Τέλος, το αγελαδινό γιαούρτι εμφανίζει ισχυρότερη αναγωγική δράση σε σχέση με το κατσικίσιο, κάτι που οφείλεται στη διαφορετική τους σύσταση

και επεξεργασία. Όπως βλέπουμε και στην σύσταση του αγελαδινού περιέχονται 4,5 gr πρωτεΐνης ενώ στο κατσικίσιο 3,8 gr πρωτεΐνης. Επιπλέον, αυτά τα δείγματα γάλακτος περιέχουν μικρότερο ποσοστό αντιοξειδωτικών καθώς τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά των γαλακτοκομικών βρίσκονται κυρίως στα λιποσφαιρίδια (Grazyna et al. 2017).

Σχετικά με τη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου είναι αξιοσημείωτο το εύρημα ότι τόσο τα δείγματα γάλακτος μεταξύ τους (με εξαίρεση το ελαφρύ κατσικίσιο) όσο και τα δείγματα γιαουρτιού μεταξύ τους παρουσίασαν πανομοιότυπη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το κατσικίσιο ελαφρύ γάλα αντίθετα απαιτεί σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα ώστε να εξουδετερώσει την εν λόγω ρίζα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Το ελαφρύ κατσικίσιο γάλα (1,5%) με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιποσφαιρίδια χρειάζεται αρκετά ml δείγματος (Grazyna et al. 2017). Σ' αυτό συμβάλουν και τα μικρότερα σε μέγεθος λιποσφαιρίδια που βέβαια το κάνουν πιο εύπεπτο. Το γεγονός ότι η διατροφή και ο τρόπος ζωής αυτών των ζώων δεν ευνοεί την δημιουργία ROS οδηγεί και σε χαμηλότερη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς δεν απαιτούνται. Αντίθετα, στα αντίστοιχα αγελαδινά προϊόντα υπάρχει αυξημένη σύσταση σε κορεσμένα λίπη που ευνοούν τη σύνθεση των ελευθέρων ριζών.

Το παστεριωμένο ασπράδι αυγού έδειξε μέτρια αντιοξειδωτική δράση. Αρκετές πρωτεΐνες του αυγού περιέχονται στο ασπράδι. Το δείγμα μας είχε 11,2 gr πρωτεΐνη (ανά 100ml δείγματος) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που οι τιμές τους κυμαίνονται σε πιο χαμηλές τιμές πρωτεΐνης (πχ πρωτεΐνη αγελαδινού γάλακτος 3,2gr ανά 100 ml δείγματος) . Εκτός αυτού περιέχει λεκιθίνη, α-τοκοφερόλη και ρετινόλη. Η λεκιθίνη ενεργοποιεί ένζυμα όπως η SOD (Miranda 2015), αναμένεται άρα στη μέθοδο εξουδετέρωσης του σουπεροξειδίου να έχουμε αυξημένη δράση. Αυτό

συμβαίνει πράγματι καθώς τα πειράματα που έγιναν έδειξαν πως σε συγκέντρωση 1/800 (πολύ αραιωμένο δείγμα) είχαμε 60% αναστολή της ρίζας.

#### **4.1 Εφαρμογές γύρω από τη μελέτη της βιολογικής δράσης των γαλακτοκομικών προϊόντων**

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράση των γαλακτοκομικών προϊόντων παρέχει χρήσιμες και απαραίτητες πληροφορίες για τη χρήση τους στην αγορά. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι υπάρχει δυνατότητα απομόνωσης κάποιων από τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά τους, όπως είναι η καζεΐνη, από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων ώστε να γίνει εκμετάλλευση της υψηλής βιολογικής τους αξίας (Cervato 1999). Κάτι τέτοιο είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς διάφορες εργασίες δείχνουν ότι τα αντιοξειδωτικά με τη μορφή συμπληρωμάτων παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και τη μερική αντιμετώπιση αρκετών παθήσεων και καταστάσεων (Lobo et al. 2010). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα αντιοξειδωτικά έχουν θετική επίδραση στο διαβήτη, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τη γήρανση, η φλεγμονή αλλά και την άσκηση (Veskoukis et al. 2016). Ειδικά για το κατσικίσιο γάλα υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικό προϊόν για την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, βιοενεργά πεπτίδια που προκύπτουν από την πέψη κλασμάτων κατσικίσιου γάλακτος θεωρείται ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά συμπληρώματα με ευεργετική δράση για στον άνθρωπο (Ahmed et al. 2015). Επιπρόσθετα, έρευνες έχουν δείξει ότι, όταν η λακτόζη υδρολύεται προκύπτουν δύο ισομερή με αντιοξειδωτική δράση παραπλήσια με αυτή του ασκορβικού οξέος (Abbadí et al. 2003). Επομένως, η μελέτη αυτών των μορίων αναμένεται να επιβεβαιώσει την ιδιαίτερα σημαντική αντιοξειδωτική δράση του κατσικίσιου γάλακτος. Τέλος, οι συνεχώς αυξανόμενοι ρυθμοί δημιουργίας γαλακτοκομικών προϊόντων με λιγότερα ή πιο εύπεπτα λίπη, χωρίς γλουτένη και χωρίς αλλεργιογόνες ουσίες καθώς και η δημιουργία γαλακτοκομικών από

εναλλακτικές πηγές (π.χ. σόγια, αμύγδαλο, καρύδα) θα συμβάλει στην έρευνα και την ανάπτυξη νέων προϊόντων με θετική δράση στην υγεία του ανθρώπου (Sethi et al. 2016).

### **Συμπεράσματα**

Η μελέτη των γαλακτοκομικών προϊόντων ελληνικής προέλευσης δείχνει ότι μπορούν να αποτελέσουν πηγή αντιοξειδωτικών. Η πλούσια περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες και λίπη ισοδυναμεί με την παρουσία πληθώρας αντιοξειδωτικών μορίων τα οποία πιθανό να μπορούν να απομονωθούν. Αυτά μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και να αποτελέσουν δυνητικά συστατικά αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων. Η διαφορετική προέλευση των γαλακτοκομικών προϊόντων (αγελαδινά ή κατσικίσια) αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη δράση τους καθώς η σύστασή τους αλλά και ο τρόπος παρασκευής τους διαφέρει σημαντικά. Σίγουρα, το γεγονός ότι κάποια από αυτά τα προϊόντα εμφάνισαν ισχυρή δράση οφείλεται και στο πρόσφορο ελληνικό έδαφος αλλά και στο καλό κλίμα, χωρίς απότομες αλλαγές και διακυμάνσεις στο οποίο μεγαλώνουν τα ζώα.

Επιπρόσθετα, η παρουσία διαφόρων προϊόντων στην αγορά επιτρέπει την επιλογή των κατάλληλων γαλακτοκομικών, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του καθενός. Για παράδειγμα άτομα με πρόβλημα πέψης της λακτόζης μπορούν να επιλέγουν κατσικίσια προϊόντα (πιο εύπεπτα) ή ακόμα γάλατα φυτικής προέλευσης όπως είναι το γάλα αμυγδάλου. Επιπλέον, άτομα με σακχαρώδη διαβήτη επιλέγουν επίσης γάλατα φυτικής προέλευσης με ποσοστό σακχάρου 0%. Άτομα με αυξημένα επίπεδα χοληστερίνης μπορούν να επιλέξουν γάλατα τύπου becel pro active που περιέχουν στερόλες, εμποδίζοντας την απορρόφηση της χοληστερόλης. Γενικώς, υπάρχουν αρκετές επιλογές ανάλογα με τα χαρακτηριστικά αλλά και τις προτιμήσεις του καθενός. Η καθεμία επιλογή συνδυάζει και αυξημένη αντιοξειδωτική δράση αλλά

και μια καλύτερη υγεία. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς φαίνεται πως παρουσιάζουν καλή αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να εισαχθούν στα ημερήσια διατροφικά προγράμματα. Τέλος, θεωρείται απαραίτητο να μελετηθούν περαιτέρω τα κρίσιμα αυτά χαρακτηριστικά, που τους προσδίδουν αυτές τις ιδιότητες.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### *Ξενογλώσση*

Abbadı A, Gotlieb KF, Meiberg JBM, Van Bekkum H. New food antioxidant additive based on hydrolysis products of lactose. *Green Chem*, 5, 47-51, 2003.

Abramovič H, Grobin B, Poklar N Ulrih, Cigić B. The Methodology Applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteau Assays Has a Large Influence on the Determined Antioxidant Potential. *Acta Chim Slov.* 64(2): 491-499, 2017.

Ahmed A, EL-Bassiony T, Elmalt LM, Ibrahim HR. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International* 74, 80-88, 2015.

Ahsan H Ali A, Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 131(3): 398-404, 2003.

Alenisan M, Alqattan H, Tolbah L, Shori A. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 24, 101-106, 2017.

Alyaqoubi S, Abdullah A, Addai Z. Antioxidant activity of goat's milk from three different locations in Malaysia. *AIP Conference Proceedings* 1614, 198, 2014.

Ames B, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(11): 6858–6862, 1981.

Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 33(9): 1260-7, 2002.

Apak R, Capanoglu E, Shahidi F. Measurement of antioxidant activity and capacity recent trends and applications ISBN: 978-1-119-13535-7, 2018.

Arnarson A. Seven benefits of almond milk. Medical News Today Published Tuesday 1 August 2017.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239(1): 70-6, 1996.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* Volume 28, Issue 1, 1995, Pages 25-30 [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J Food Sci Nutr.* 50(4): 291-6, 1999.

Cloetens L, Panee J, Åkesson B. The antioxidant capacity of milk--the application of different methods in vitro and in vivo. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France).* 59(1): 43-57, 2013.

Díaz-Castro J, Pérez-Sánchez LJ, Ramírez López-Frías M, López-Aliaga I, Nestares T, Alférez MJ, Ojeda ML, Campos MS. Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defense and lipid peroxidation during chronic iron repletion. *Br J Nutr.* 108(1): 1-8, 2012.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10): 872-9, 2002.

Fergusson A. Antioxidants, Sterols and Inflammation, a Natural Approach. Presentation to the Functional Medicine Forum, Seattle, Wa., U.S.A. March, 2007.

Floegel A. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* Volume 24, 7, 1043-1048, 2011.

Grażyna C, Hanna C, Adam A, Magdalena BM. Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology,* 70(2), 165–178, 2017.

Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükokuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *J Ethnopharmacol.* 90(2-3): 205-15, 2004.

Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem Sci.* 24(7): 255-9, 1999.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, 2015

Ioannou I, Chaaban H, Slimane M, Ghoul M. *Origin of the Variability of the Antioxidant Activity Determination of Food Material* published by Intech, 2014.

Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc.* 25(2): 210-2, 1993.

Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med.* 5: 156-70, 1988.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health *Mol Aspects Med.* 26(4-5): 340-52, 2005.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8:1865–79, 2006.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 48(4): 412–422, 2011.

Khan IT, Nadeem M. Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids Health Dis.* 16(1): 163, 2017.

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 13: 757–772, 2018.

Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 396-411

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*4(8): 118–126, 2010.

McCord, J.M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22) 6049-6055

Miranda J, Anton X, Redondo-Valbuena C, Roca-Saavedra P, Rodriguez JA, Lamas A, Franos CM, Cepeda A. Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients* 7(1): 706–729, 2015.

Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 63(1): 68-78, 2018.

Newmark LM. The Ultimate Superfood? Milk Offers Up a Glass Full of Antioxidants SPLASH! *milk science update: April 2017.* Issue <http://milkgenomics.org/article/ultimate-superfood-milk-offers-glass-full-antioxidants/>.

Niki E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J Intern Med.* 30(5): 571–579, 2015.

Nimalaratne C, Wu J. Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients* 7(10): 8274–8293, 2015.

Nimse S, Pa D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5, 27986-28006, 2015.

Olszowy M, Dawidowicz A. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical Papers* 72, 2, 393–400, 2018.

Padayatty S, Levine M. Vitamin C physiology: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* 22(6): 463–493, 2016.

Pham-Huy L, He H, Pham-Huy Ch. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 4(2): 89–96, 2008.

Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol.* 90: 724-31, 2001.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 368-70, 2001.

Sethi S, Tyagi SK, Anurag R. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J Food Sci Technol.* 53(9): 3408–3423, 2016.

Shalaby E, Shanab S. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of spirulina platensis. *Indian Journal of Geo – Marine Sciences* 42, 5. 556-564, 2013.

Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. H Sies, pp. 1–8. London: Academic, 1985.

Taylor MJ, Richardson T. Antioxidant Activity of Skim Milk: Effect of Heat and Resultant Sulfhydryl Groups. *Journal of Dairy Science* 63(11), 1783–1795, 1980.

Tirzitis G & Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights.

Turck D. Cow's milk and goat's milk. *World Rev Nutr Diet.* 108: 56-62, 2013.

Veskoukis A, Tsatsakis A, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* 17(1): 11–21, 2011.

Veskoukis AS, Goutianos G, Paschalis V, Margaritelis NV, Tzioura A, Dipla K, Zafeiridis A, Vrabas IS, Kyparos A, Nikolaidis MG. The rat closely mimics oxidative stress and inflammation in humans after exercise but not after exercise combined with vitamin C administration. *Eur J Appl Physiol.* 116(4): 791-804, 2016

Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med.* 80: 164-70, 2015.

Xu DP, Li Y, et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* 18(1), E96, 2017.

Yangilar F. (2013). As a Potentially Functional Food: Goats' Milk and Products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(4), 68-81.

Yen GC, Duh PD. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.* 42 (3), 629–632, 1994.

Zulueta A, Maurizi A, Frígoaa A, Estevea MJ, Colib R, Burini G. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 19, 6-7, 380-385, 2009.

## **Ελληνική**

Άρθρο 80. Το γάλα. Κώδικας τροφίμων και ποτών πηγή (1987) "Ισοκράτης" τράπεζα νομικών πληροφοριών ΔΣΑ, ΦΕΚ: Β 788 19871231, Αρμόδιος φορέας Γενικό Χημείο Κράτους: Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο.

Άρθρο 82: Το γιαούρτι. Κώδικας τροφίμων και ποτών πηγή (1987) "Ισοκράτης" τράπεζα νομικών πληροφοριών ΔΣΑ, ΦΕΚ: Β 788 19871231, Αρμόδιος φορέας Γενικό Χημείο Κράτους: Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο.

Γιαννακόπουλου Ε. Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, Κλινική σημασία. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής Εταιρείας* 26(1): 23-35, 2009.