



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΓΑΛΑΤΑ

[ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΣ ]



«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

Λάρισα 2019

## **Evaluation of antioxidant mechanism to Greek milks**

## **Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης σε Ελληνικά γάλατα**

### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Στάγκος :** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Νικόλαος Μπαλατσός :** Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στη γυναίκα μου

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

Ευχαριστίες.....	7
Περίληψη.....	8
Περίληψη στα αγγλικά.....	9

## **I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΓΑΛΑ**

1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	10
1.2 Ορισμός.....	10
1.3 Κατηγορίες γάλακτος.....	11
1.4 Είδη γάλακτος και συστατικά.....	12
1.5 Γενικός τρόπος παρασκευής γάλακτος.....	13
1.6 Θρεπτική αξία και διατροφική αξία γάλακτος.....	15

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ**

2.1 Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμός ελεύθερων ριζών.....	16
2.2 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών.....	17
2.3 Αντιοξειδωτικά ορισμός.....	18
2.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	18
2.5 Η δράση των αντιοξειδωτικών.....	21

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ</u> .....	21
--	----

## **II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u> .....	22
--	----

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

5.1 Υλικά.....	22
----------------	----

5.2 Μέθοδος.....	24
------------------	----

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας DPPH.....	26
---	----

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
---------------	----

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>:

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
-------------------	----

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη όσο και για την αμέριστη υποστήριξη και βοήθειά του.

Την μεταδιδακτορική ερευνήτρια και υπεύθυνη εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών κα. Κερασιώτη Θάλεια, ευχαριστώ θερμά γιατί χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση της δεν θα ήταν δυνατή η προοδευτική εξέλιξη και ολοκλήρωση της μελέτης μου.

Τέλος, τις ευχαριστίες μου να απευθύνω και στις εταιρείες: ΕΒΟΛ, ΘΕΣ ΓΑΛΑ, ΜΕΒΓΑΛ, ΝΕΟΓΑΛ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ για την δωρεάν προμήθεια δειγμάτων από τα γάλατα που παράγουν. Με τον τρόπο αυτό συνέβαλαν έτσι ώστε να καταστεί δυνατό μέρος της εργαστηριακής μελέτης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα αποτελεί προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας, αποτελεί βιολογικό έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου είδους, που προορίζεται για τη διατροφή των νεογνών τους. Το γάλα δεν είναι ομοιογενές, αλλά μείγμα διάφορων οργανικών ουσιών και αποτελείται από νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, άλατα και βιταμίνες. Η δια του θηλασμού απ' ευθείας μεταφορά του γάλακτος από τους μαστούς στο πεπτικό σύστημα των νεογνών αποτελεί το μικρότερο κύκλωμα παραγωγής - κατανάλωσης που σημειώνεται στη φύση καθώς επίσης και την μοναδική τροφή μέχρι μια ορισμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο, όμως, το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της διαίτας του για όλη την διάρκεια της ζωής του.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από διάφορα γάλατα του εμπορίου και από διάφορους νομούς της επικράτειας. Η περίοδος ελέγχου πραγματοποιήθηκε από 1 Οκτωβρίου έως 20 Δεκεμβρίου του έτους 2018. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εξεταζόμενα γάλατα εμφάνιζαν την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH. Για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$ , η ποσότητα του γάλακτος που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για το εκάστοτε γάλα. Οι τιμές  $IC_{50}$  για τα πλήρη γάλατα κυμάνθηκαν από 40 μl έως και >200 μl, οι τιμές  $IC_{50}$  για τα ελαφριά γάλατα κυμάνθηκαν από 12 μl έως και >200 μl και οι τιμές  $IC_{50}$  για τα κακάο γάλατα κυμάνθηκαν από 3,5 μl έως και 5 μl.



## ABSTRACT

Milk is a product of high nutritional value, it is the biological secretion of mammal's mammary gland including the human species, intended for feeding their newborns. Milk is not homogeneous, it is a mix of several organic substances and it is composed of water, fat, proteins, carbohydrates, enzymes, salts and vitamins. The direct transfer of milk through breastfeeding from breasts to the digestive system of newborns constitutes the smaller production circuit – consumption that is noted in the nature plus the fact that it is the only nutrition till a certain age. For the human species though, milk continues to be a part of his diet for the whole of his life.

In the present research, it was studied the scavenging activity of DPPH radical from several milks of the markets and from different cities of Greece. The control period took place from 1<sup>st</sup> of October till the 20<sup>th</sup> of December of 2018. The results showed that all tested milks had a neutralizing ability against the DPPH radical. For each sample the IC<sub>50</sub> value was determined, the amount of milk having the ability to inhibit the radical by 50%. The lower the IC<sub>50</sub> value, the greater the ability to inhibit the radical. The IC<sub>50</sub> values for complete milks was from 40 µl to >200 µl, the IC<sub>50</sub> values for light milks was from 12 µl to >200 µl and the IC<sub>50</sub> values for cocoa milks was from 3,5 µl to 5 µl.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΓΑΛΑ

### 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ιστορία του γάλακτος ξεκινά πολλά χρόνια πίσω από την εξημέρωση της κατσίκας και του προβάτου, πριν από 9.000 χρόνια, στα οροπέδια του Ιράν και του Αφγανιστάν. Η παραγωγή του και η κατανάλωση του όμως επεκτάθηκε από το 1863 και μετά, όπου ανακαλύφθηκε από τον Παστέρ η διαδικασία της «παστερίωσης» που επιτρέπει την παραγωγή και τυποποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων.

Το γάλα είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη μητρική στοργή και φροντίδα. Αποτελεί την πρώτη τροφή του ανθρώπου μετά τη γέννησή του, η οποία είναι ικανή να καλύψει πλήρως τις ανάγκες αυτής της ευαίσθητης περιόδου της ζωής του. Ένα τόσο σημαντικό φυσικό αγαθό δεν θα μπορούσε να μην έχει μακρά ιστορία, η οποία ξεκινά από τον παραδοσιακό γαλατά που περνούσε από κάθε γειτονιά και μοίραζε το γάλα χύμα και φτάνει μέχρι σήμερα, όπου το φρέσκο γάλα είναι διαθέσιμο ακόμα και στο πιο απομακρυσμένο σημείο της Ελλάδας [1].

### 1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ

Σύμφωνα με τον **Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών** (Κ.Τ.Π. 1998) υπάρχει ο παρακάτω ορισμός για το γάλα:

«Γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δε βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης»

Σύμφωνα με το **FAO/WHO (1973)**:

«Γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται μετά από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε και προορίζεται για κατανάλωση σε υγρή μορφή ή για περαιτέρω επεξεργασία»

Σύμφωνα με τον **Κώδικα Γάλακτος των Η.Π.Α. (USDEW, 1953)**:

«Γάλα είναι το έκκριμα του μαστού το οποίο είναι απαλλαγμένο από πρωτόγαλα, λαμβάνεται με άμελξη μίας ή περισσότερων υγιών αγελάδων και το οποίο περιέχει τουλάχιστον 3,15% λίπος και 8,25% στέρεα συστατικά άνευ λίπους»

### 1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

- i. **Νωπό γάλα:** Ως «νωπό γάλα» θεωρείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, προβατίνων, αιγών ή βουβαλιών, το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέραν των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα.
- ii. **Θερμικά επεξεργασμένο γάλα:** Χαρακτηρίζεται γάλα κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση που παράγεται με θερμική επεξεργασία άμεσα και αποκλειστικά από νωπό γάλα και το οποίο έχει μορφή γάλακτος παστεριωμένου, UTH και αποστειρωμένου.
  - **Παστεριωμένο γάλα:** Πρέπει να έχει υποβληθεί σε επεξεργασία που περιλαμβάνει την έκθεση σε πολύ υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα ή σε διαδικασία παστερίωσης που χρησιμοποιεί διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας για την επίτευξη ισοδύναμου αποτελέσματος.
  - **UTH γάλα:** Πρέπει να έχει παραχθεί με συνεχή θέρμανση του νωπού γάλακτος που συνεπάγεται τη βραχυχρόνια εφαρμογή με σκοπό την καταστροφή όλων των υπολειπόμενων μικροοργανισμών και των σπορίων τους και τη συσκευασία, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αδιαφανή δοχεία ή σε δοχεία που καθίστανται αδιαφανή από την δεύτερη συσκευασία, κατά τρόπο όμως ώστε να μειώνονται στο ελάχιστο οι φυσικές χημικές και οργανοληπτικές μεταβολές.
  - **Αποστειρωμένο:** Πρέπει να έχει αποστειρωθεί και θερμανθεί σε ερμητικά κλειστές συσκευασίες ή δοχεία, των οποίων το σύστημα κλεισίματος πρέπει να παραμείνει άθικτο.
- iii. **Γάλα κατάψυξης:** Χαρακτηρίζεται το νωπό γάλα που έχει γίνει διατηρήσιμο, με κάποια μέθοδο ταχείας κατάψυξης, που διατηρείται στη συνέχεια σε θερμοκρασία κατώτερη από το -15°C και το οποίο πρέπει να διατίθεται στην κατανάλωση μετά από πλήρη απόψυξη.
- iv. **Αποβουτυρωμένο γάλα:** Χαρακτηρίζεται το προϊόν που απομένει από το νωπό γάλα, μετά την πλήρη αφαίρεση του λίπους από αυτό με μηχανική επεξεργασία και χωρίς καμία προσθήκη. Αυτό πρέπει να περιέχει λίπος σε ποσοστό 0,5% κατ' ανώτατο όριο.
- v. **Ημιαποβουτυρωμένο γάλα:** Χαρακτηρίζεται το προϊόν που απομένει μετά την μερική αφαίρεση του λίπους από το νωπό γάλα, χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη, το οποίο πρέπει να περιέχει λίπος σε 1,5 – 1,8%.

- vi. **Γάλα μερικώς αποβουτυρωμένο:** Χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το ημιαποβουτυρωμένο γάλα, του οποίου η περιεκτικότητα σε λίπος είναι ανώτερη από 1,8% και κατώτερη του 3,5% [2].

#### 1.4 ΕΙΔΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα είδη γάλατος διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους δηλαδή από το γαλακτοφόρο ζώο από το οποίο λαμβάνονται.

- **Το γάλα αγελάδας:** Είναι το γάλα που χρησιμοποιείται κυρίως από τον άνθρωπο ως ένα από τα βασικά είδη διατροφής. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά εξαρτάται από τη φυλή (ράτσα), την ηλικία της αγελάδας και από τις συνθήκες διαβίωσης και διατροφής της. Η απόδοση σε γάλα μιας αγελάδας μπορεί να είναι και 4000 λίτρα το χρόνο. Η αγελάδα αρχίζει να αποδίδει γάλα από 3 ετών με μέγιστη απόδοση όταν φθάσει τα 10 έτη.
- **Το γάλα προβάτου:** Περιέχει περισσότερα λιπαρά, πρωτεΐνες και άλατα από το γάλα της αγελάδας. Μια συνηθισμένη προβατίνα αποδίδει 25-100 L γάλα το χρόνο με περίοδο γαλουχίας 180-220 ημέρες. Οι προβατίνες ράτσας αποδίδουν και 250L το χρόνο.
- **Το γάλα κατσίκας:** Σε σύγκριση με το γάλα αγελάδας περιέχει περισσότερα λιπαρά και λιγότερη λακτόζη έχει σημαντικά ποσά βιταμίνης A και λιγότερα ποσά καροτενίων και έτσι εμφανίζεται λευκότερο. Τα λιποσφαίρια του έχουν μικρότερη διάμετρο (<5 μm) και έτσι δεν αποκορυφώνεται εύκολα και τα τριγλυκερίδια του λίπους περιέχουν αυξημένα ποσοστά των οξέων καπροϊκό, καπτυλικό και καπρικό στα οποία αποδίδεται και η χαρακτηριστική του οσμή. Οι πρωτεΐνες του δε διαλύονται σε αλκοολικό διάλυμα NaOH, σε αντίθεση με αυτές του γάλατος αγελάδας. Έχει αποδειχθεί πιο εύπεπτο από το γάλα της αγελάδας και δεν φέρει μικρόβια της φυματίωσης γιατί οι κατσίκες δεν προσβάλλονται από την ασθένεια αυτή. Χρησιμοποιείται σε ανάμιξη με το γάλα του προβάτου για την παρασκευή γιαούρτης και τυριών. Η περίοδος γαλουχίας στις κατσίκες αρχίζει το χειμώνα και διαρκεί 120-220 ημέρες σε απόδοση διπλάσια σχεδόν του προβάτου για ορισμένες φυλές, η οποία μπορεί να φθάσει και μέχρι 500-800 L το χρόνο.
- **Το γάλα βουβάλου:** Περιέχει αυξημένα λιπαρά και πρωτεΐνες και χρησιμοποιείται στη Μακεδονία για παρασκευή τυριού. Το ζώο αποδίδει γάλα με υποκίτρινο χρώμα και ιδιαίζουσα ευχάριστη οσμή, σε απόδοση 500-1200 L το χρόνο ανάλογα με το άτομο και τη φυλή.

- **Το μητρικό γάλα (γυναίκας):** Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα περιέχει μεγαλύτερα ποσά λακτόζης και λιγότερη τέφρα, δηλ. ανόργανα άλατα, και πρωτεΐνες αλλά συγκριτικά πολύ λιγότερη καζεΐνη και περισσότερες αλβουμίνες. Στις αλβουμίνες περιλαμβάνονται και οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες οι οποίες προστατεύουν τα νεογνά από τις διάφορες ασθένειες και αυτό είναι ένα στοιχείο υπεροχής του μητρικού γάλατος. Ένα άλλο σημείο υπεροχής είναι ότι είναι πιο εύπεπτο από το γάλα αγελάδας γιατί κατά την επίδραση οξέων (όπως τα οξέα της πέψης) οι καζεΐνες του μητρικού γάλατος κροκιδώνονται σε μικρές νιφάδες ενώ του γάλατος αγελάδας κροκιδώνονται σε πολύ μεγαλύτερα συσσωματώματα. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά υπόκειται γενικά σε μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, το άτομο, την εποχή, την περιοχή και τη διατροφή. [3]

Η μέση περιεκτικότητα στα βασικά συστατικά του γάλατος διαφόρων θηλαστικών δίνεται στον παρακάτω πίνακα: [3]

Πίνακας		Μέση σύσταση (%W/W) του γάλατος θηλαστικών				
α/α	Είδος	Νερό	Λιπαρά	Πρωτεΐνες	Λακτόζη	Τέφρα
1	Μητρικό	87.6	4.0	1.4	6.8	0.2
2	Αγελάδας	87.3	3.8	3.3	4.9	0.7
3	Προβάτου	81.4	7.6	5.6	4.5	0.9
4	Κατσίκας	86.1	5.0	3.9	4.2	0.8
5	Βουβάλου	80.5	9.2	5.2	4.3	0.8
6	Φοράδας	89.2	1.6	2.6	6.1	0.5
7	Καμήλας	87.7	3.0	3.4	5.2	0.7

## 1.5 ΓΕΝΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα που αρμέγεται στους στάβλους μεταφέρεται στο κεντρικό εργοστάσιο με βυτιοφόρα όπου, αφού υποστεί τους κατάλληλους ελέγχους χύνεται σε μία δεξαμενή. Το γάλα που δεν εκπληρώνει ορισμένες προδιαγραφές ποιότητας προορίζεται για παρασκευή ζωοτροφών.

Η πρώτη επεξεργασία στην οποία υποβάλλεται το γάλα που προορίζεται για την απευθείας κατανάλωση είναι το φιλτράρισμα, που έχει σκοπό να αφαιρέσει από το γάλα τις χοντρές ακαθαρσίες.

Σε ένα δεύτερο χρόνο το γάλα ομογενοποιείται με μια μηχανική μέθοδο που προκαλεί κατακερμάτιση των μεγαλύτερων σφαιριδίων του λίπους και σταθεροποίηση της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Με αυτό τον τρόπο το γάλα γίνεται ομοιογενές και εύπεπτο, ενώ συγχρόνως αποφεύγεται η επίπλευση των λιποσφαιριδίων και η δυνατότητα αφαίρεσής τους.

Η τελευταία επεξεργασία που υποβάλλεται το γάλα έχει σκοπό την ελάττωση ή την πλήρη καταστροφή των μικροβίων που περιέχει και γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι από τις οποίες η πιο διαδεδομένη είναι η παστερίωση, η οποία συνίσταται στην θέρμανση του γάλακτος. [4]

Σχέση χρόνου θερμοκρασίας κατά την παστερίωση ανάλογα με:

1. Την θερμική αντίσταση του βλαστικού ή παθογόνου μικροοργανισμού του οποίου η καταστροφή επιδιώκεται.
2. Την ευαισθησία της ποιότητας του προϊόντος στη θερμότητα.

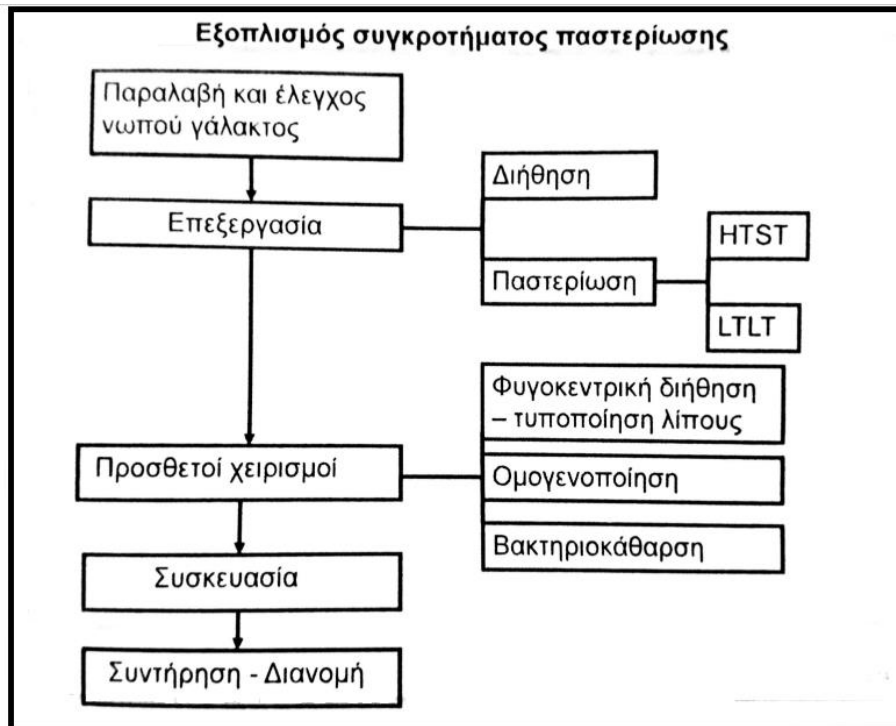
Οι συνδυασμοί χρόνου και θερμοκρασίας που βρέθηκαν ικανοποιητικοί και συγχρόνως επέφεραν τις μικρότερες φυσικοχημικές και οργανοληπτικές μεταβολές στο γάλα και εφαρμόζονται διεθνώς (και στην Ελλάδα) είναι:

- Η βραδεία παστερίωση LTLT (Low Temperature Long Time) 63°C / 30min
- Η ταχεία παστερίωση HTST (High Temperature Short Time) 72°C / 15sec

Τέλος, η συσκευασία γίνεται:

1. Σε υάλινες φιάλες που συνήθως σφραγίζονται με φύλλο αλουμινίου.
2. Σε γαλακτοδοχεία, που πρέπει να ανταποκρίνονται σε ορισμένες προδιαγραφές και χρησιμοποιούνται σε ειδικές μόνο περιπτώσεις (χονδρική πώληση).
3. Πλαστικές φιάλες μιας χρήσεως αποτελούμενες από διάφορα υλικά.
4. Χαρτοκιβωτίδια διαφόρων σχημάτων (π.χ. τετράεδρο tetrapack) τα οποία πληρώνονται από ειδική μηχανή. Έχει εσωτερική επικάλυψη από ειδικό πλαστικό το οποίο δεν πρέπει να αντιδρά με τα συστατικά του γάλακτος.

Η συσκευασία αυτού του τύπου έχει πολλά πλεονεκτήματα αλλά ορισμένες φορές παρουσιάζει πρόβλημα υγιεινής και επιμολύνεται το γάλα στο στάδιο αυτό.



[5]

## 1.6 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα είναι πηγή:

### 1. Πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας

- Δείκτης μετατρεψιμότητας >90%
- Απαραίτητα αμινοξέα
- 2<sup>η</sup> θέση μετά τις πρωτεΐνες του αυγού

### 2. Υδατανθράκων

Λακτόζη

- Διέρχεται τον στόμαχο χωρίς καμία μεταβολή
- Στο έντερο διασπάται βραδέως με την επίδραση της λακτάσης σε γλυκόζη και γαλακτόζη (απορρόφηση του Ca και σύνθεση βλεννοπολυσακχαριτών και εγκεφαλοσιδίων)

- Πηγή ενέργειας και δομικό στοιχείο εγκεφάλου
- Συμβάλει στο μεταβολισμό του μαγνησίου
- Η ζύμωση σε γαλακτικό οξύ ευνοεί την καλή λειτουργία του εντέρου και δημιουργεί δυσμενές περιβάλλον για τα εντεροπαθογόνα

### 3. Λιπαρών

- Περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα
- Χαμηλό σημείο τήξης → εύπεπτα
- Περιέχει τα απαραίτητα για τον οργανισμό λιπαρά οξέα: λινελαϊκό, λινολενικό

### 4. Ασβεστίου

### 5. Φωσφόρου

### 6. Βιταμινών

- Τις περιέχει σχεδόν όλες
- Πλούσιο σε A, B1, B2, νιασίνη, παντοθενικό [5]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 2.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους [6]. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα [7]. Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.



Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCIS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS [8]. Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντιούνται συνηθέστερα είναι οι ROS. [9]

## 2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

### **ΘΕΤΙΚΕΣ**

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης [6]. Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό [10]. Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία [11], τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων [12]. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

### **ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ**

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος [13], τη μυϊκή καταστροφή [14] και την κόπωση [15]. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2% - 5% του μοριακού οξυγόνου (O<sub>2</sub>) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία [16]. Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% [17] ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ [18]. Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία [19]. Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες

και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και την γήρανση [13].

### 2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού [13].

### 2.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

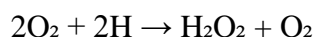
- ENZYMΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

- Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, όπως φαίνεται παρακάτω:

#### SOD

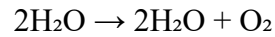


Το O<sub>2</sub> παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

➤ Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδισώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [20]. Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub>.

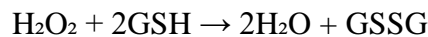
CAT



➤ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται [20].

GPX



➤ Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG : GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

• ΜΗ ENZYMΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

➤ Βιταμίνη E

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A [13].

➤ Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS [13].

➤ Β-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο [13].

➤ Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος [21]. Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

➤ Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το

αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω [13].

#### ➤ Συνένζυμο Q-10

Το συνένζυμο Q-10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης [13].

#### ➤ Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπάραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς [13]. [9]

## 2.5 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η δράση των αντιοξειδωτικών στηρίζεται στην απομάκρυνση ή την εξουδετέρωση των  $\text{ROO}\cdot$  και  $\text{R}\cdot$  ελεύθερων ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις στη πλήρη αναστολή της οξείδωσης (στα σουλφονικά, στη διάσπαση από τα υπεροξειδία). Επειδή τα περισσότερα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών  $\text{ROO}\cdot$  και  $\text{R}\cdot$ , με τη δημιουργία μιας ανενεργού και αντιοξειδωτικής ελεύθερης ρίζας. [22]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Κατά καιρούς πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να εκτιμήσουν και να συγκρίνουν την αντιοξειδωτική δράση στα τρόφιμα. Αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μετράνε την δέσμευση των ελεύθερων ριζών. Οι μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, και σε αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η μέθοδος TRAP (Total Radicaltrapping Parameter), και η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical

Absorbance Capacity). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH, TEAC (Trolox Equivalent Activity) και CUPPAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity). [23,24]

Τέλος υπάρχουν και άλλες μέθοδοι προσδιορισμού όπως είναι οι χρωματομετρικές μέθοδοι απορρόφησης που χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν την αντιοξειδωτική δράση τροφίμων, εκχυλισμάτων και βιολογικών υγρών.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του γάλακτος.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν προήλθαν από διάφορες εταιρείες παραγωγής γάλακτος ανά την Ελληνική επικράτεια.

Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με αναρρόφηση.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η *in vitro* μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών από 33 διαφορετικά δείγματα γάλακτος ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της μεθόδου DPPH.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

##### 5.1 ΥΛΙΚΑ

- ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ:

Το χημικό αντιδραστήριο 1,1-διαφαινυλ-2-πικρυδραζίλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) αποκτήθηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

- ΔΕΙΓΜΑΤΑ:

ΕΒΟΛ Αγελαδινό Βιολογικό Ελαφρύ

ΕΒΟΛ Αγελαδινό Πλήρες

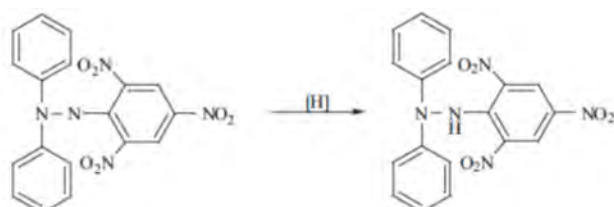
ΕΒΟΛ Κατσικίσιο Βιολογικό

ΕΒΟΛ Αγελαδινό Κακάο

ΘΕΣ ΓΑΛΛΑ Αγελαδινό Πλήρες  
ΘΕΣ ΓΑΛΛΑ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΘΕΣ ΓΑΛΛΑ Αγελαδινό Κακάο  
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες  
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο  
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Kids  
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες  
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο  
ΝΕΟΓΑΛ Ξυνόγαλο  
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Πλήρες  
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Ελαφρύ  
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Κακάο  
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες  
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο  
ΚΟΥΚΑΚΗ Αγελαδινό Πλήρες  
ΚΟΥΚΑΚΗ Αγελαδινό Κακάο  
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Πλήρες  
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Κακάο  
ΛΥΚΑΣ Αγελαδινό Πλήρες  
ΛΥΚΑΣ Αγελαδινό Ελαφρύ  
ΤΡΙΚΚΗ Αγελαδινό Κακάο  
ΔΕΛΤΑ Αγελαδινό Πλήρες  
ΜΑΡΑΤΑ Αγελαδινό Πλήρες

## 5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH• πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand – Williams et al. [25]. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου [26]. Είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. [9]



DPPH (Μωβ)

DPPHH (Κίτρινο)

Εικόνα: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με την ρίζα πραγματοποιείται σε διαφορετικές αυξανόμενες ποσότητες. Μετά την προσθήκη των συστατικών αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH• (100μM) μαζί με τη μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός



του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1mL μεθανόλης. Επίσης ελέγχθηκε αν το γάλα απορροφούσε στις εξεταζόμενες ποσότητες στα 517 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$$

A<sub>0</sub>: Η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

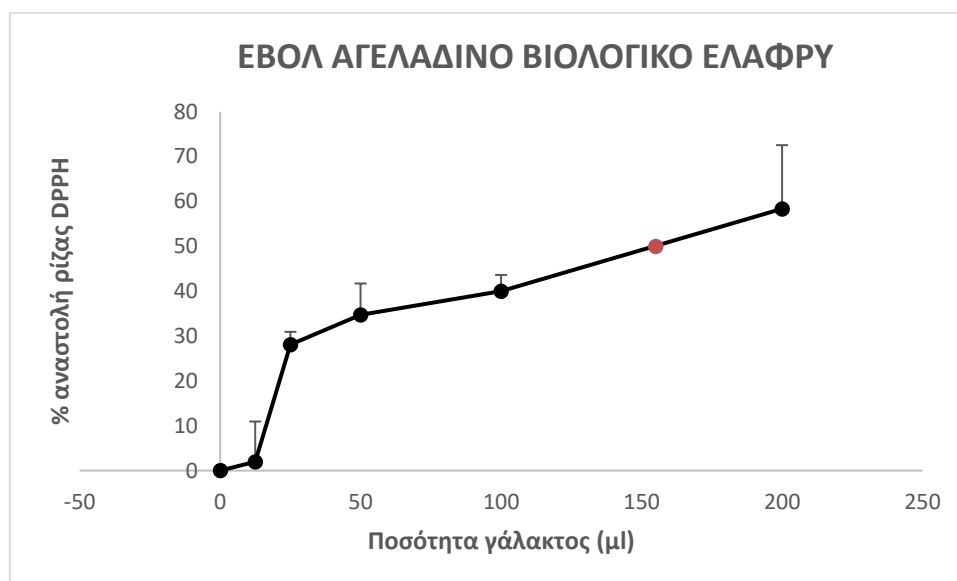
A<sub>δ</sub>: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

τελικό όγκο 1mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100μM ρίζας DPPH• και το δείγμα γάλακτος.

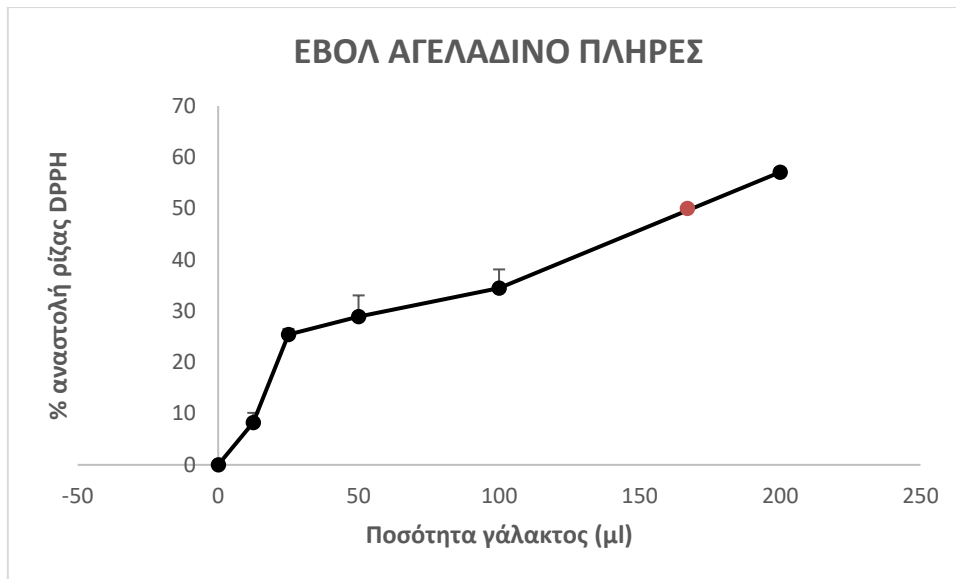
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

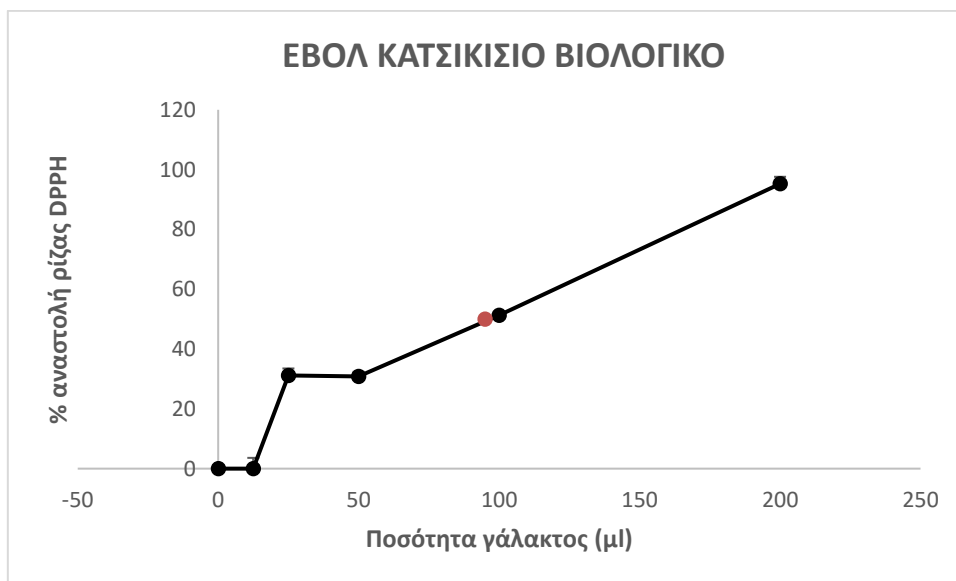
Όλα τα δείγματα γάλακτος που εξετάστηκαν εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH. Για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$ , η ποσότητα του γάλακτος που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας στο εκάστοτε γάλα. Οι τιμές  $IC_{50}$  για τα πλήρη γάλατα κυμάνθηκαν από 40  $\mu$ l έως και >200  $\mu$ l, οι τιμές  $IC_{50}$  για τα ελαφριά γάλατα κυμάνθηκαν από 12  $\mu$ l έως και >200  $\mu$ l και οι τιμές  $IC_{50}$  για τα κακάο γάλατα κυμάνθηκαν από 3,5  $\mu$ l έως και 5  $\mu$ l. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1-33 και στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι τιμές  $IC_{50}$  του κάθε δείγματος.



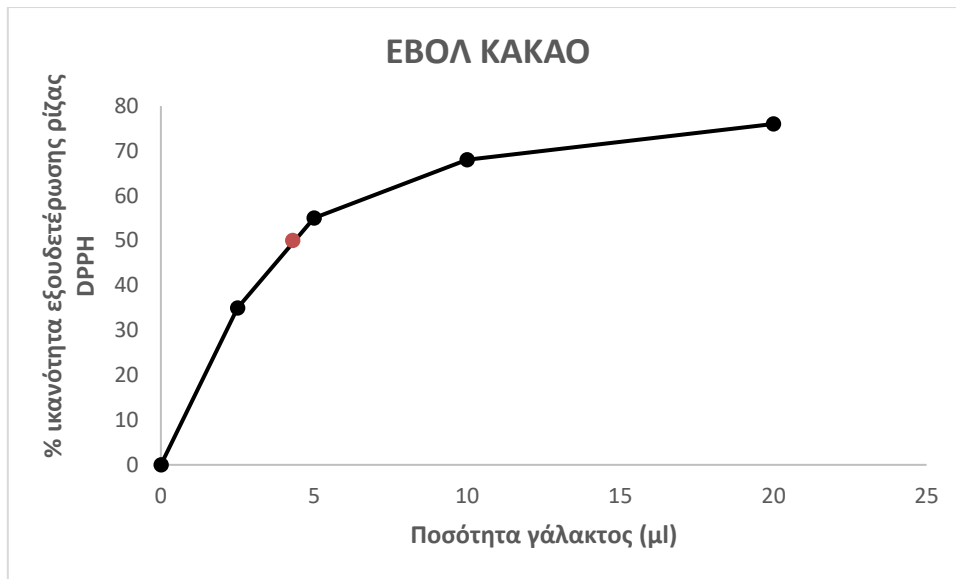
**Διάγραμμα 1:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΕΒΟΛ Αγελαδινό Βιολογικό Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



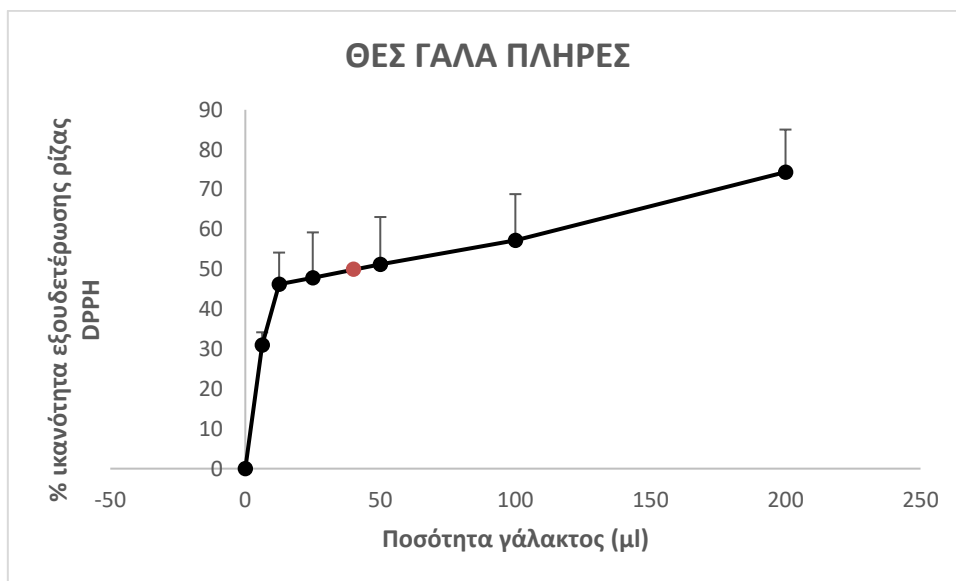
**Διάγραμμα 2:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΕΒΟΛ Αγελαδινό Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



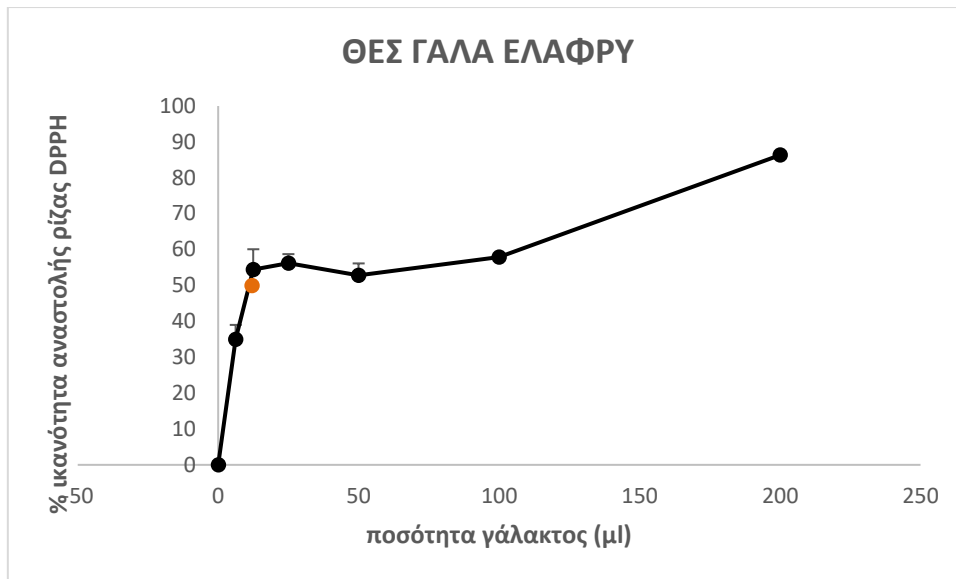
**Διάγραμμα 3:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΕΒΟΛ Κατσικίσιο Βιολογικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



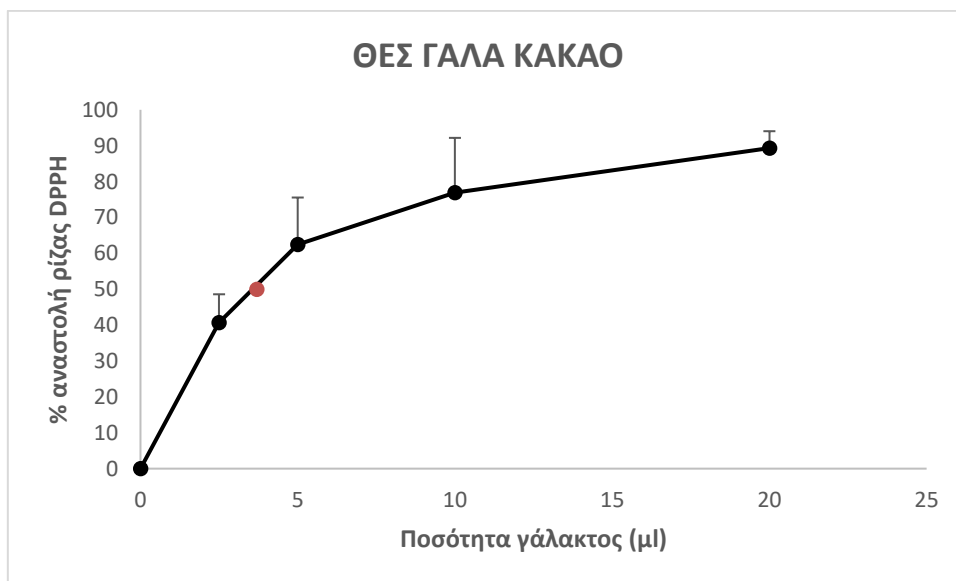
**Διάγραμμα 4:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΕΒΟΛ Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



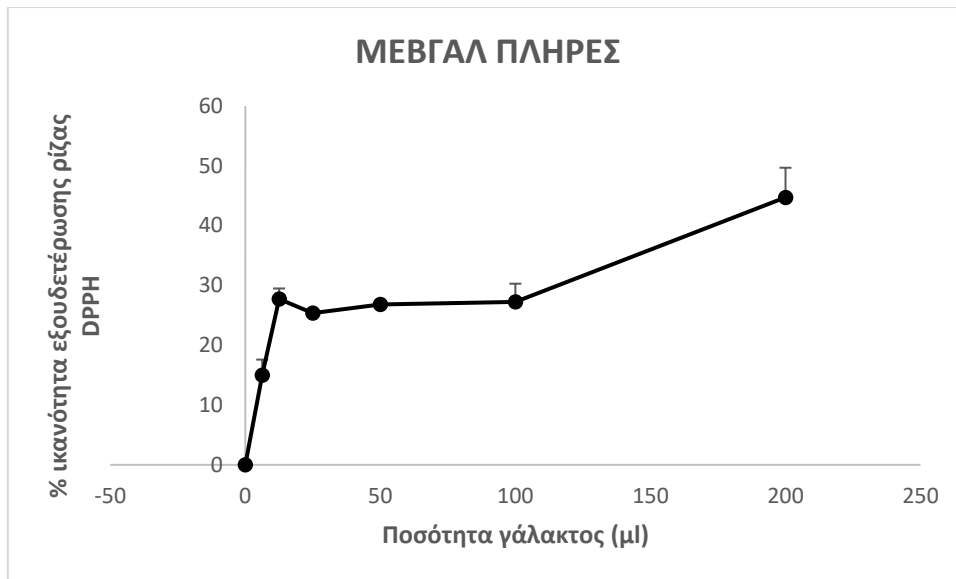
**Διάγραμμα 5:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΘΕΣ Γάλα Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



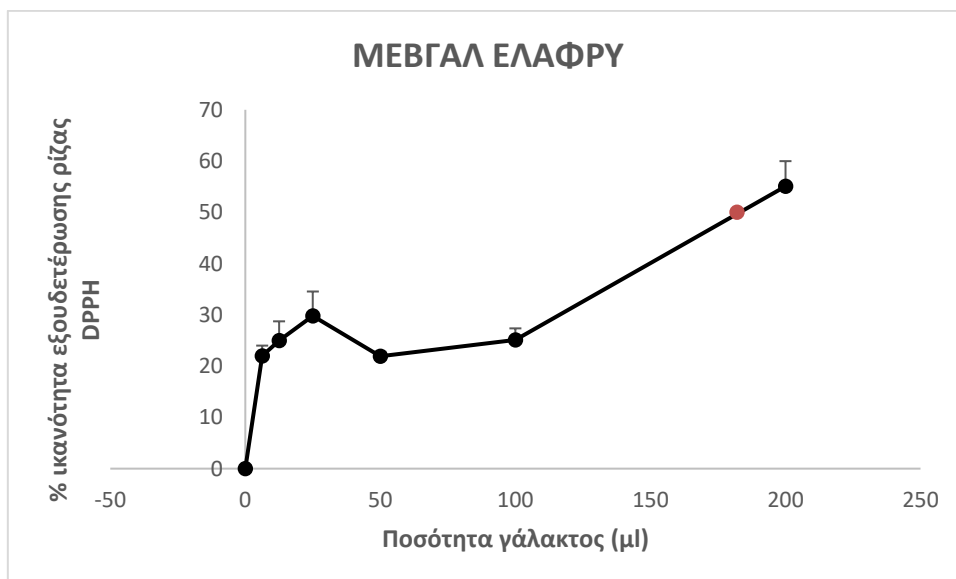
**Διάγραμμα 6:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΘΕΣ Γάλα Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



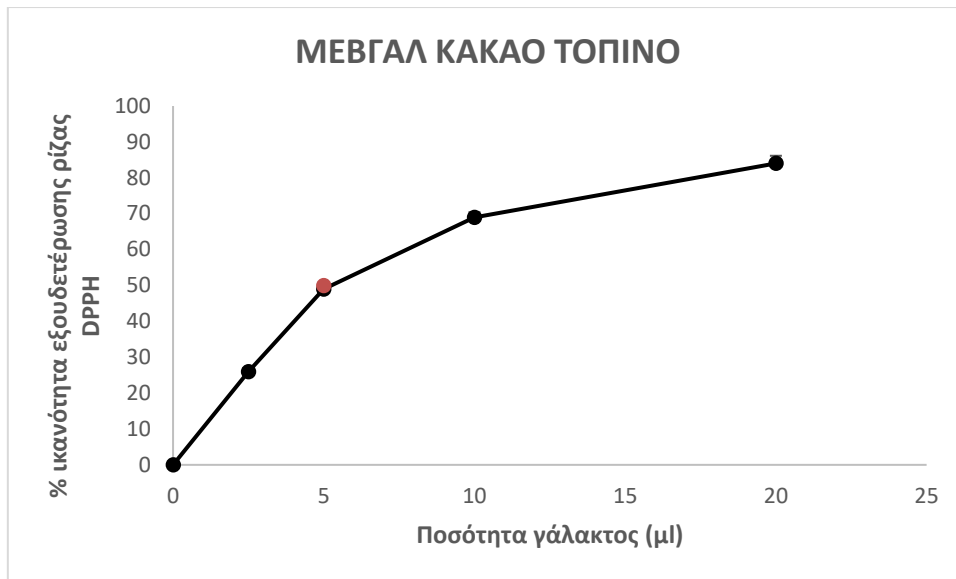
**Διάγραμμα 7:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΘΕΣ Γάλα Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



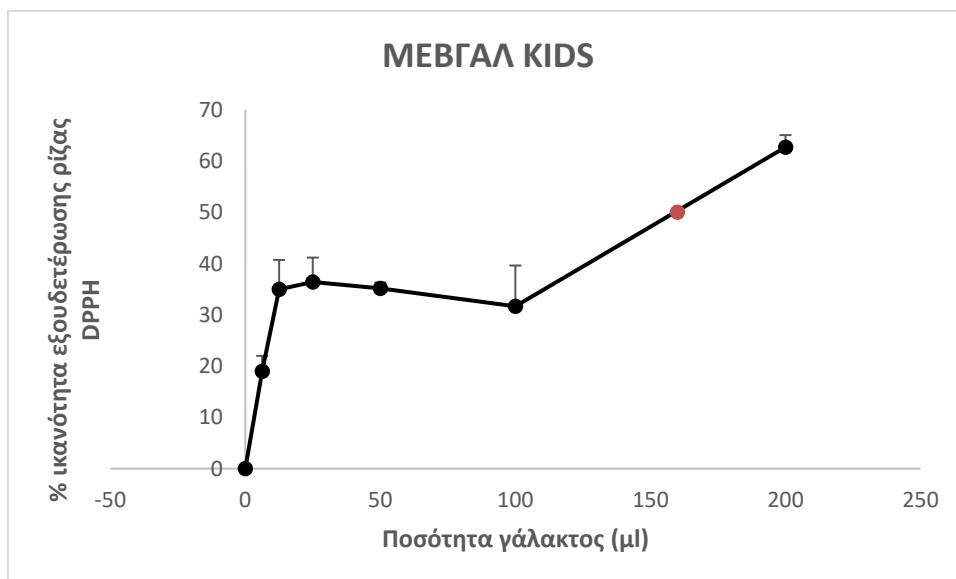
**Διάγραμμα 8:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΜΕΒΓΑΛ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



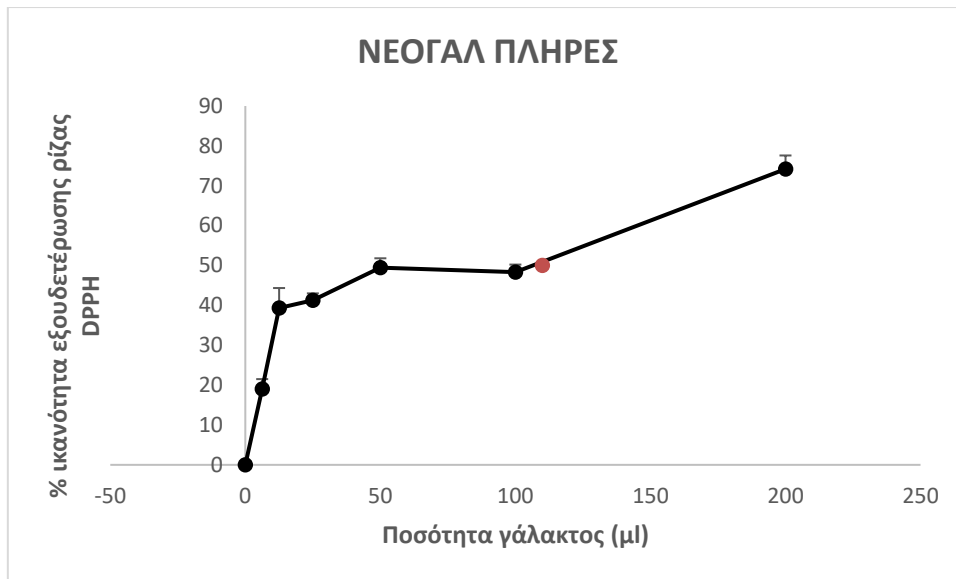
**Διάγραμμα 9:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΜΕΒΓΑΛ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



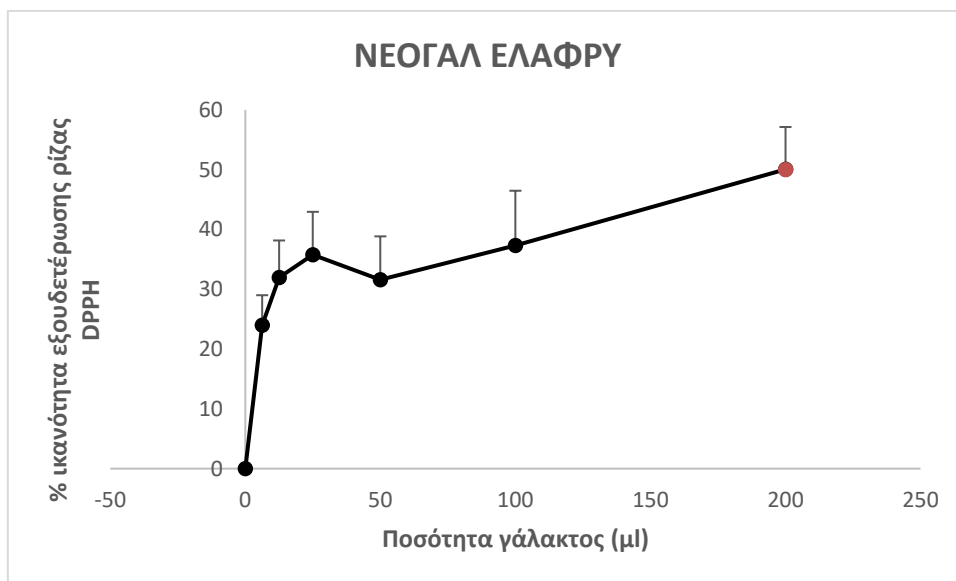
**Διάγραμμα 10:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DRPH από το γάλα ΜΕΒΓΑΛ Κακάο Τοπίνο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 11:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DRPH από το γάλα ΜΕΒΓΑΛ KIDS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.

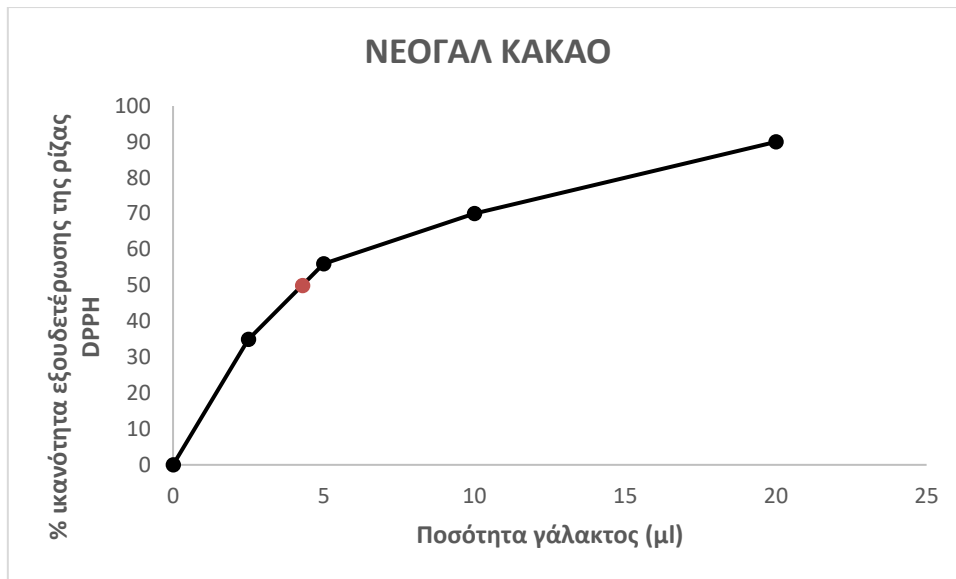


**Διάγραμμα 12:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΝΕΟΓΑΛ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.

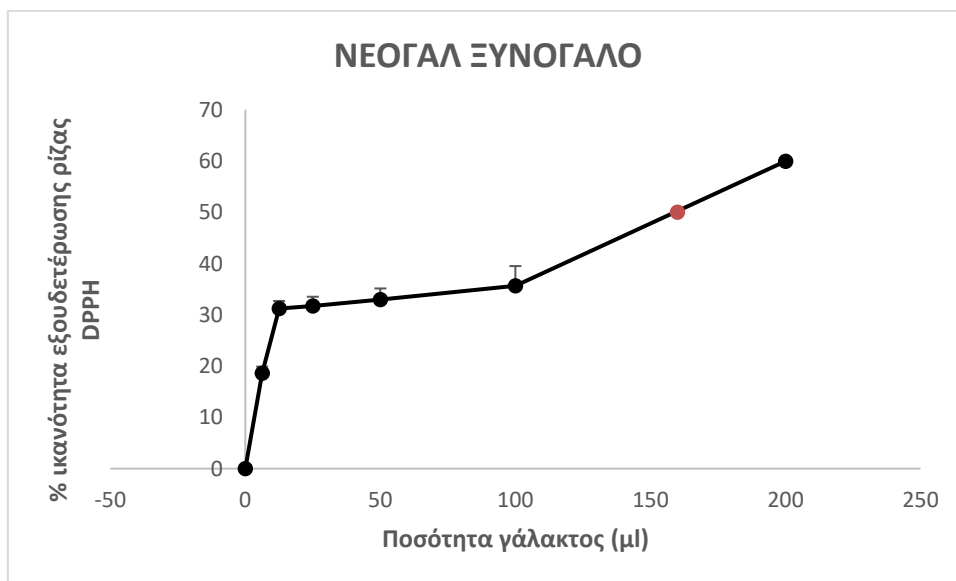


**Διάγραμμα 13:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΝΕΟΓΑΛ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.





**Διάγραμμα 14:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΝΕΟΓΑΛ Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



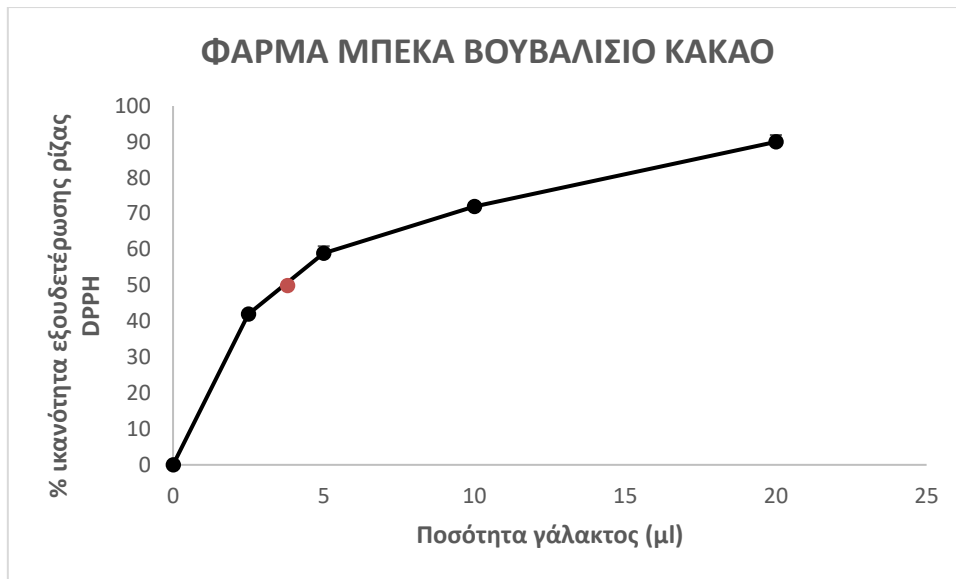
**Διάγραμμα 15:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΝΕΟΓΑΛ Ξυνόγαλο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



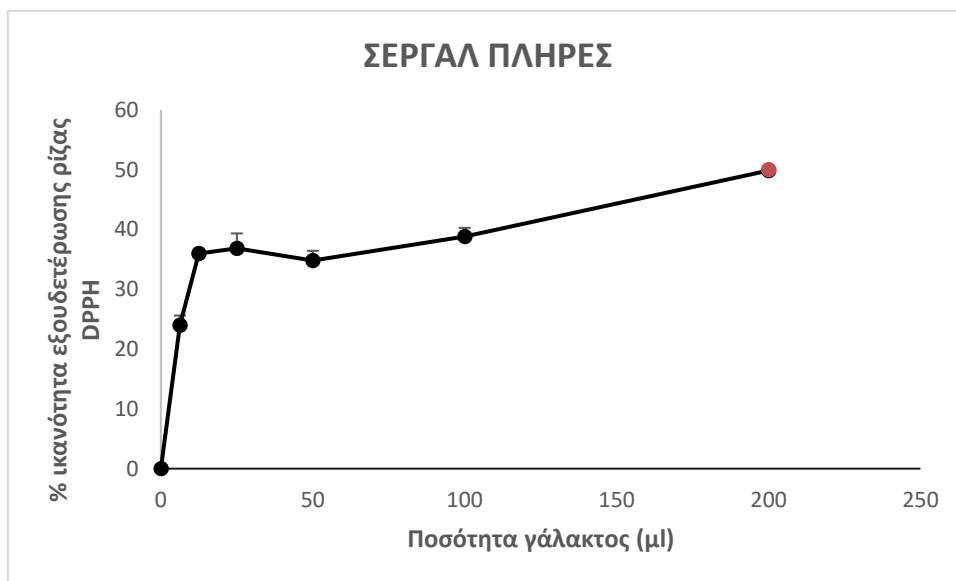
**Διάγραμμα 16:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DRPH από το γάλα Φάρμα Μπέκα Βουβαλίσιο Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



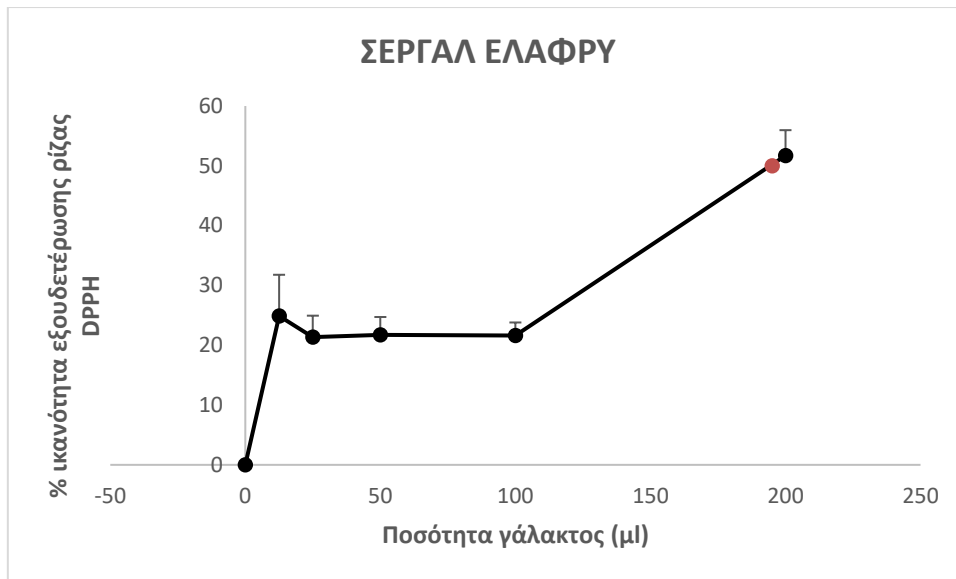
**Διάγραμμα 17:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DRPH από το γάλα Φάρμα Μπέκα Βουβαλίσιο Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Διάγραμμα 18:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα Φάρμα Μπέκα Βουβαλίσιο Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Διάγραμμα 19:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΣΕΡΓΑΛ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Διάγραμμα 20:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΣΕΡΓΑΛ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



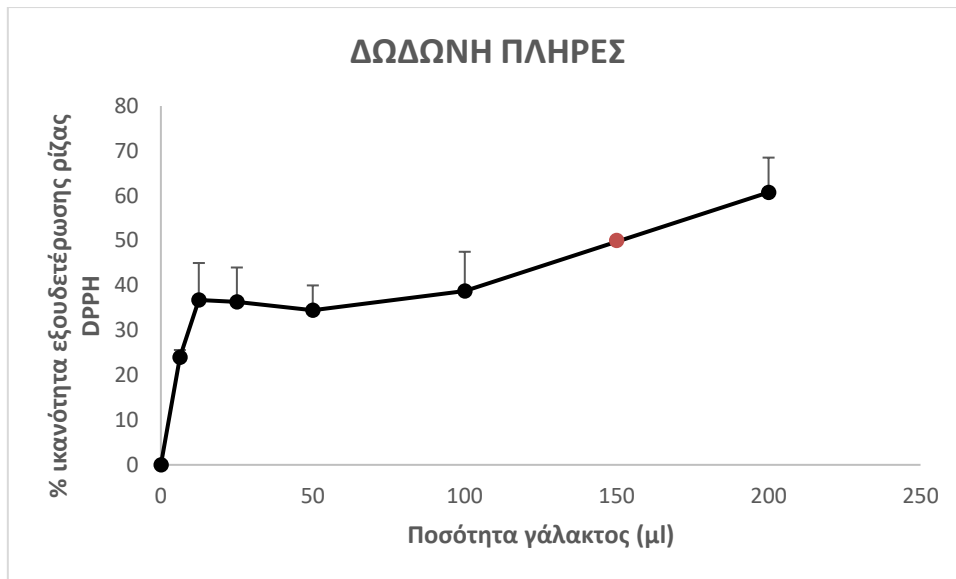
**Διάγραμμα 21:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΣΕΡΓΑΛ Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean  $\pm$  SEM.



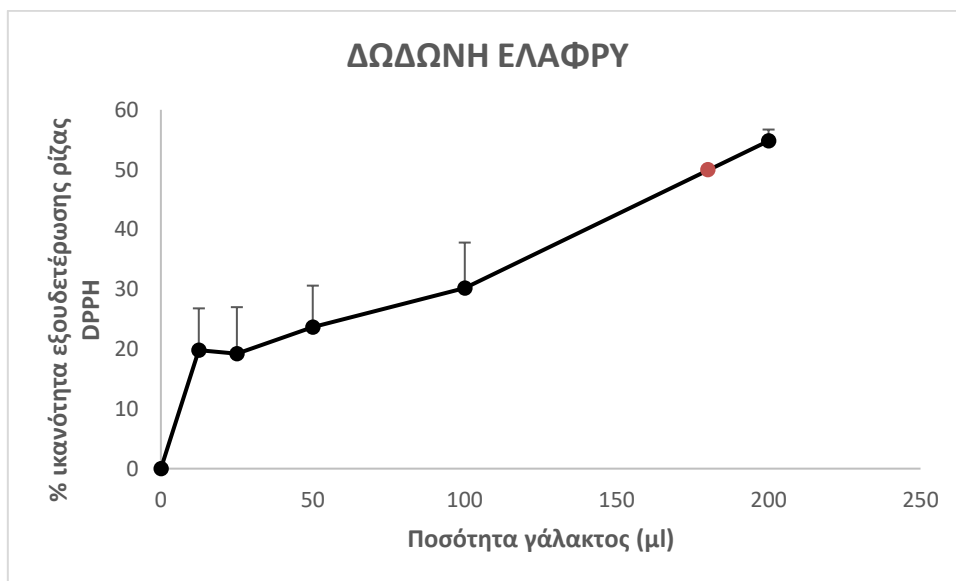
**Διάγραμμα 22:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα Κουκάκη Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 23:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα Κουκάκη Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 24:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΔΩΔΩΝΗ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



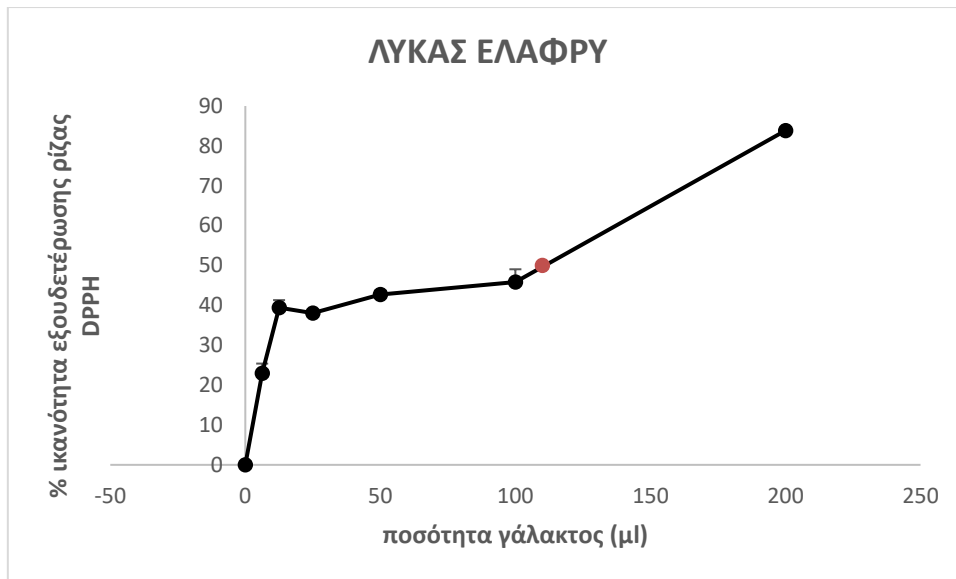
**Διάγραμμα 25:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΔΩΔΩΝΗ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



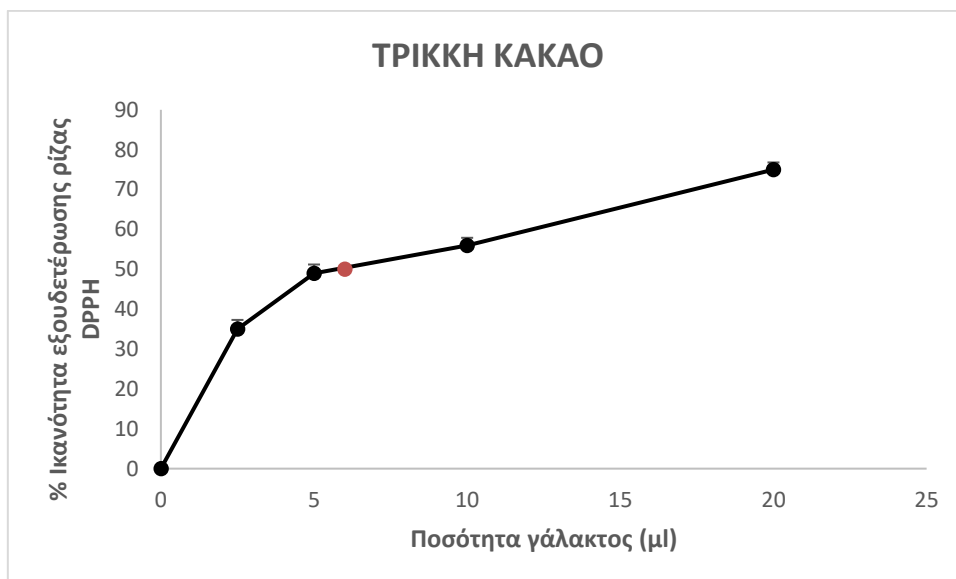
**Διάγραμμα 26:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΔΩΔΩΝΗ Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 27:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΛΥΚΑΣ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.

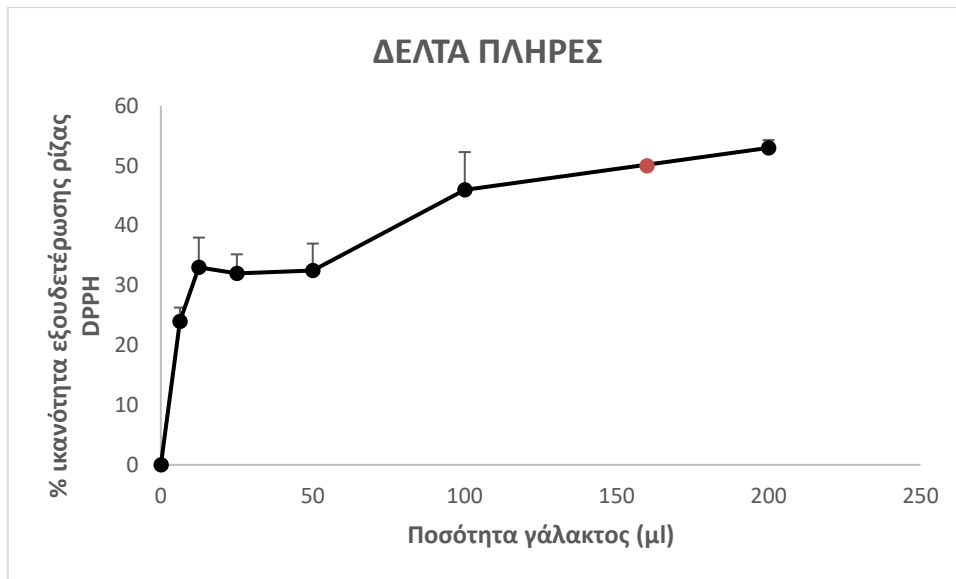


**Διάγραμμα 28:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΛΥΚΑΣ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.

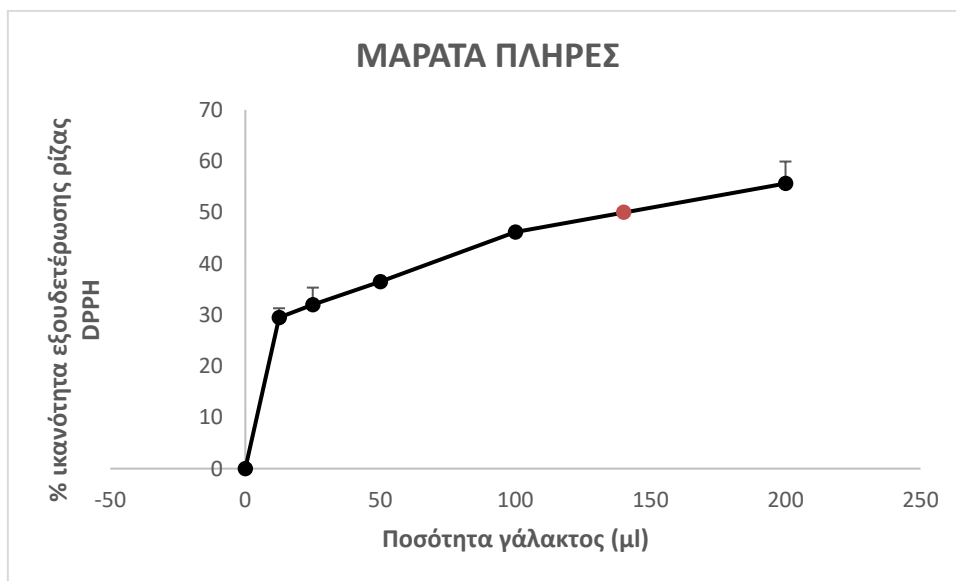


**Διάγραμμα 29:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΤΡΙΚΚΗ Κακάο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.





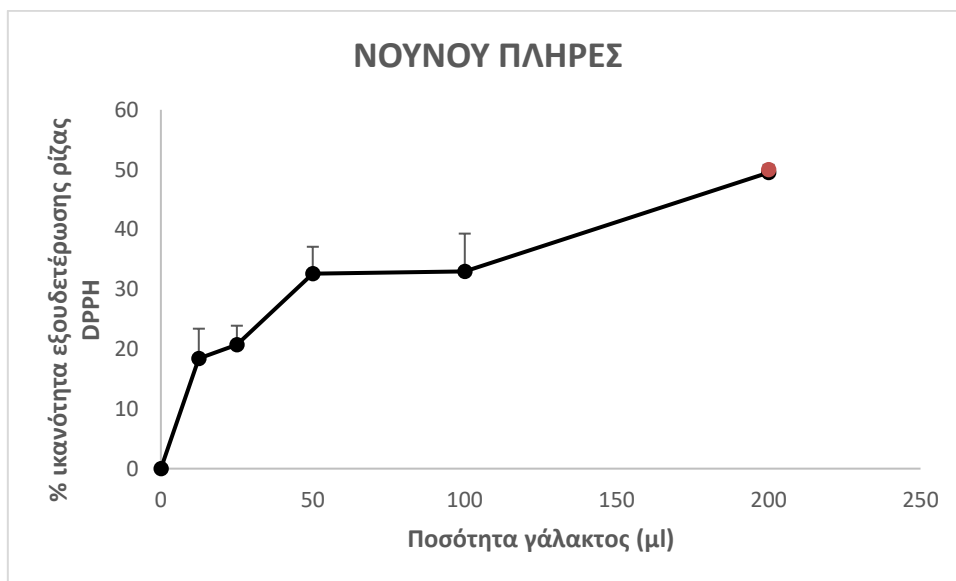
**Διάγραμμα 30:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΔΕΛΤΑ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 31:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΜΑΡΑΤΑ Πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 32:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΜΑΡΑΤΑ Ελαφρύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



**Διάγραμμα 33:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH από το γάλα ΝΟΥΝΟΥ πλήρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.

**Πίνακας 1:** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές IC<sub>50</sub> για κάθε δείγμα γάλακτος που εξετάστηκε:

<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μl)</b>
EΒΟΛ Αγελαδινό Βιολογικό Ελαφρύ	155
EΒΟΛ Αγελαδινό Πλήρες	167
EΒΟΛ Κατσικίσιο Βιολογικό	100
EΒΟΛ Αγελαδινό Κακάο	4,3
ΘΕΣ ΓΑΛΑ Αγελαδινό Πλήρες	40
ΘΕΣ ΓΑΛΑ Αγελαδινό Ελαφρύ	12
ΘΕΣ ΓΑΛΑ Αγελαδινό Κακάο	3,7
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες	>200
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ	182
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο	5
ΜΕΒΓΑΛ Αγελαδινό Kids	160
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες	110
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ	200
ΝΕΟΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο	4,3
ΝΕΟΓΑΛ Ξυνόγαλο	160
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Πλήρες	>200
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Ελαφρύ	>200
ΦΑΡΜΑ ΜΠΕΚΑ Βουβαλινό Κακάο	3,8
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Πλήρες	200
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Ελαφρύ	195
ΣΕΡΓΑΛ Αγελαδινό Κακάο	3,5
ΚΟΥΚΑΚΗ Αγελαδινό Πλήρες	93
ΚΟΥΚΑΚΗ Αγελαδινό Κακάο	4
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Πλήρες	150
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Ελαφρύ	180
ΔΩΔΩΝΗ Αγελαδινό Κακάο	3,7
ΛΥΚΑΣ Αγελαδινό Πλήρες	50
ΛΥΚΑΣ Αγελαδινό Ελαφρύ	110
ΤΡΙΚΚΗ Αγελαδινό Κακάο	6
ΔΕΛΤΑ Αγελαδινό Πλήρες	160
ΜΑΡΑΤΑ Αγελαδινό Πλήρες	140
ΜΑΡΑΤΑ Αγελαδινό Ελαφρύ	120
ΝΟΥΝΟΥ Family Πλήρες	200

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα θεωρείται μία από τις βασικότερες τροφές στο ημερήσιο διαιτολόγιο τόσο των παιδιών όσο και των ενηλίκων. Αποτελεί πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων, με κυριότερο το ασβέστιο το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την υγεία των οστών και των δοντιών.

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που δρουν με τέτοιο τρόπο ώστε να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να τις μετατρέπουν σε μη τοξικές και άρα ακίνδυνες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης με την μορφή κάποιων βιταμινών και φαινολικών ουσιών, αυτό όμως δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν και στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως είναι το γάλα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση 33 διαφορετικών δειγμάτων γάλακτος, τα οποία ανήκουν σε εταιρείες από διάφορα μέρη της Ελλάδας. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι όλα τα δείγματα εξουδετέρωσαν την ρίζα DPPH•. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• πιθανώς οφείλεται στα κύρια αντιοξειδωτικά τους, που είναι το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ CLA, οι βιταμίνη Α, η βιταμίνη Ε καθώς και οι πρωτεΐνες.

Το CLA αποτελεί το πιο ενεργό αντιοξειδωτικό στο λίπος του γάλακτος των μηρυκαστικών με αντιοξειδωτική ικανότητα 100 φορές υψηλότερη της ατοκοφερόλης [27]. Μειώνει τη συγκέντρωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα τα κύτταρα των μεμβρανών να είναι λιγότερο ευαίσθητα στην οξείδωση, με αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι πιθανότητες να προκληθεί οξειδωτική καταστροφή.

Η βιταμίνη Α είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση [28].

Η βιταμίνη Ε είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον [29].

Τέλος, αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν και οι πρωτεΐνες του γάλακτος, τόσο οι καζεΐνες όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Με την υδρόλυση των καζεϊνών προκύπτουν τα αμινοξέα ιστιδίνη, λυσίνη, προλίνη και τυροσίνη τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες [30]. Αλληλουχίες καζεϊνών μοριακού βάρους 3 kDa απενεργοποιούν την ρίζα DPPH αναλογικά με το επίπεδο συγκέντρωσής τους στο περιβάλλον αντίδρασης [31].

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση πιθανώς με τη συνεισφορά της σε πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες βοηθούν τη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH), ενός από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά

[32]. Η GSH είναι το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στον οργανισμό, παρέχει προστασία ενάντια σε ηλεκτρονιόφιλα, αλογονωμένες δομές και εποξειδία και εμπλέκεται σε πολλούς άμεσους και έμμεσους προστατευτικούς μηχανισμούς [33]. Επίσης σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφανίζει ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH [34].

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα γάλακτος εξουδετέρωσαν την ρίζα DPPH•. Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα πλήρη γάλατα κυμάνθηκαν από 40 μl έως και >200 μl, οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα ελαφριά γάλατα κυμάνθηκαν από 12 μl έως και >200 μl και τέλος οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα κακάο γάλατα κυμάνθηκαν από 3,5 μl έως και 5 μl.

Παρατηρήθηκε εμφανώς ότι η δυνατότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και άρα η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάστηκε στα κακάο γάλατα. Αποτέλεσμα που είναι απολύτως λογικό αν αναλογιστεί κανείς την τεράστια αντιοξειδωτική δράση του κακάο. Το κακάο περιέχει περισσότερα φαινολικά αντιοξειδωτικά από τα περισσότερα τρόφιμα. Μία έως δύο κουταλιές της σούπας φυσικής σκόνης κακάου παρέχει περίπου την ίδια ποσότητα φλαβονοειδών με μισή ουγκιά μαύρης σοκολάτας, ποσότητα που οι μελέτες δείχνουν ότι προσφέρει οφέλη για την υγεία. Οι προκυανιδίνες παρέχουν την πλειοψηφία της αντιοξειδωτικής δράσης σε προϊόντα κακάο [35]. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο δακτυλίους αρωματικού άνθρακα, βενζοπυράνιο και βενζόλιο και υποδιαιρούνται σε 13 κατηγορίες με βάση τον βαθμό υδροξυλίωσης και οξείδωσης των δακτυλίων. Είναι οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες και οι φλαβανόλες. Η τρικυκλική δομή των φλαβονοειδών προσδιορίζει τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις που απομακρύνουν τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup>, αναστέλλουν τα ένζυμα και ρυθμίζουν προς τα πάνω την αντιοξειδωτική άμυνα. Οι φλαβανόλες υπάρχουν στο κακάο είτε ως μονομερή (-) επικικατίνη και (+) κατεχίνη ή ως ολιγομερή της επικικατίνης και / ή κατεχίνης, που ονομάζονται προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι κύριες φλαβανόλες που βρίσκονται στο κακάο είναι η επικατεχίνη και η κατεχίνη και οι προκυανιδίνες [36].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Patton (2004). Milk: its remarkable contribution to human health and well-being, Transaction Publishers, New Brunswick, New Jersey.
- [2] Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Κεφάλαιο ΙΧ, άρθρο 80. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.gcsf.gr/media/trofima/80.pdf>
- [3] Ν.Κ. Ανδρικόπουλος, Τροφογενωσία. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: [https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4709/1/ΚΕΦ\\_17\\_ΓΑΛΛΑ%20ΚΑΙ%20ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ.pdf](https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4709/1/ΚΕΦ_17_ΓΑΛΛΑ%20ΚΑΙ%20ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ.pdf)
- [4] Νασοπούλου Κωνσταντίνα (2016), Τεχνολογία γάλακτος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου – Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής.
- [5] Δρ. Ελένη Μαλισσιόβα (Κτηνίατρος, MSc, MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια – ΤΕΙ Θεσσαλίας Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων), Τεχνολογία Παραγωγής & Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης.
- [6] Jenkins RR. (1988) Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med.
- [7] Mylonas & Kouretas, (1999) Lipid peroxidation and tissue damage. In vivo.
- [8] Giles & Jacob, (2002) Reactive sulfur species: an emergine concept in oxidative stress. Biol Chem.
- [9] Καθηγητής: Δημήτριος Κουρέτας και Επίκουρος: Δημήτριος Στάγκος (2017), Εργαστηριακές σημειώσεις: Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Βιοτεχνολογία – Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος».
- [10] Malm, (2001) Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. ActaPhysiol Scand.
- [11] Reid, (2001) 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.
- [12] Ji LL. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc. Soc. Exp. Biol. Med
- [13] Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.
- [14] Nikolaidis et al., (2008) Favorable and prolonged changes in blood lipid profile after muscle-damaging exercise.
- [15] Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. (2004) Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. Am.J.Respir.Crit Care Med.
- [16] Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. (1990) Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med.
- [17] Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. (1997) Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. Bioenerg Biomembr.

- [18] St-Pierre J, Buckingham, JA, Roebuck SJ, and Brand MD. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*.
- [19] Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. (2000) Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants.
- [20] Antunes F, Derick H, Cadenas E. (2002) 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*.
- [21] Green HJ, Fraser IG. (1988) Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc*.
- [22] Roberfroid, M. and Calderon, P., (1990). *Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological System*, Belgium.
- [23] Prior R., Wu X. & Schaich K. (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [24] Dai J. & Mumper R. (2010), Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*.
- [25] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*.
- [26] Prior R, Xianli W, Schaich K, (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J Agric Food Chem*.
- [27] N.K. Badr El-Din, S.T. Omaye (2007) Concentration dependent antioxidant activities of conjugated Linoleic acid and  $\alpha$ -tocopherol in corn oil. *Br. J. Nutr*.
- [28] Powers SK, Lennon SL. (2000) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc. and Ozhogina & Kasaikina, (1995) b-carotene as an interceptor of free radicals*.
- [29] Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al. (1997) Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Radic Biol Med*. and Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. (2001) Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med*.
- [30] Power JD, Barnes KA, Snyder AZ, Schlaggar BL, Petersen SE. (2013) Steps toward optimizing motion artifact removal in functional connectivity MRI; a reply to Carp. *NeuroImage*.
- [31] Sakanaka S., Tachibana Y., Okada Y. (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinohacha) *Food Chemistry*.

- [32] Walzem, R.L., Dillard, C.J., German, J.B (2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we maybe overlooking. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*
- [33] Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione – related enzymes.
- [34] Kerasioti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Rsatsakis, A.M., Hayes, A.W., Kouretas, D. (2014) Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.*
- [35] Ramiro-Puig E, Castell M *Br J Nutr* (2009). Cocoa: antioxidant and immunomodulator. 101(7):931-40.
- [36] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L *Am J Clin Nutr* (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. 79(5):727-47.