



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Εκτίμηση αντιοξειδωτικής
δράσης διαφορετικών τύπων αλεύρων
με *in vitro* τεχνικές”**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής
Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΣΙΩΜΟΥ ΣΤΥΛΙΑΝΗ

A.M. 00067

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY



INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES

IN

BIOENTREPRENEURSHIP



MASTER THESIS

**“Assessment of antioxidant effect
of different types of flour *in vitro*”.**

SUPERVISOR: Dr. KOURETAS DIMITRIOS, Professor of
Physiology – Toxicology, Department of Biochemistry &
Biotechnology, University of Thessaly

SIOMOU STYLIANI

A.M. 00067

Larissa, 2021

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με την spin-off εταιρεία «FoodOxys» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή
εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Δρ. Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων)	Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Δρ. Λεωνίδας Δημήτριος	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	

Ευχαριστίες

Οι μεγαλύτερες ευχαριστίες αποδίδονται στον καθηγητή και επιβλέπων μου, τον Δρ. Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών-Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη και καθοδήγηση του καθ'όλη την πορεία της ερευνητικής μου μελέτης. Η ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την Διπλωματική μου εργασία σε συνεργασία με την εταιρεία FoodOxys, ήταν πολύτιμη και μοναδική.

Επίσης, ευχαριστώ, τον Υπ. Διδάκτωρ Τέκο Φώτη, CEO της εταιρείας FoodOxys, spin-off εταιρείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη ημέρα και με καλωσόρισε στην «οικογένεια» της FoodOxys.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Σωτηρίνα Μακρή και Υπ. Διδάκτωρ Αναστασία Πατούνα για την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση και υποστήριξη τους σε αυτό μου το ταξίδι. Οι επικοινωνητικές συμβουλές και συζητήσεις μας αποτέλεσαν τον ακρογωνιαίο λίθο για την ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας και μια απόδειξη της αξιέπαινης δουλειάς τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την «οικογένεια» του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Μαρία, Περικλή, Καλλιρόη, Μαρία, Γιάννη για την συνεχή και πολύτιμη βοήθεια τους σε κάθε βήμα μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με υποστήριξαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, δεν έχασαν την εμπιστοσύνη τους σε εμένα και χωρίς αυτούς η ολοκλήρωση αυτού του ερευνητικού έργου θα ήταν αδύνατη.

Εν κατακλείδι, η σημαντικότερη πηγή της έμπνευσης και η κινητήριος δύναμή μου, ήταν οι ιστορίες του πατέρα μου σχετικά με τη ζωή του παππού μου. Ο Δημήτρης Σιώμος ήταν αγρότης σιτηρών και βάμβακος στην περιοχή του Ν. Καρδίτσας. Ξεκινώντας από το μηδέν, έλεγε χαρακτηριστικά για τα χωράφια του πως ήταν «μαγαζί χωρίς σκεπή», εννοώντας το μεγάλο επιχειρηματικό ρίσκο λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών. Κατάφερε να επεκτείνει την «επιχείρηση» του και να τη διαφυλάξει σε βάθος χρόνου. Φυσικά, χωρίς τους κόπους και το όραμα του, πολύ πιθανόν δεν θα είχα φτάσει ως εδώ, να μελετάω με τη σειρά μου την σημαντικότητα των σιτηρών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η παρούσα διπλωματική έρευνα δεν είναι παρά η σύνδεση μου με τις ρίζες μου.

στις ρίζες μου...

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	3
1.1 Δημητριακά	3
1.2 Ρόλος στην Διατροφή.....	4
1.3 Ανατομία σιτηρών	4
2. Αλεύρι και προϊόντα του.....	5
2.1 Αλεύρι	5
2.2 Άμυλο.....	7
3. Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό στρες	7
3.1 Θεωρία και το Παράδοξο του Οξυγόνου	7
3.2 Ελεύθερες ρίζες.....	8
3.2.1 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου -ROS.....	9
3.2.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών	10
3.2.3 Ευεργετικές ιδιότητες των Ελευθέρων ριζών	11
3.2.4 Επιβλαβείς ιδιότητες των Ελευθέρων ριζών	11
3.3 Οξειδωτικό στρες	13
4. Αντιοξειδωτικά	14
4.1 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών	14
4.2 Μηχανισμοί και δράσεις των Αντιοξειδωτικών.....	15
5. Αντιοξειδωτική δράση σιτηρών	16
5.1 Βιοενεργά συστατικά σιτηρών.....	16
5.2 Προοπτικές στην υγεία μέσω της κατανάλωσης δημητριακών-σιτηρών πλούσια σε αντιοξειδωτικά	18
5.3 Σημαντικότητα των αντιοξειδωτικών των αλεύρων: από την βιομηχανία παρασκευής αρτοποιημάτων μέχρι το αρτοποιήματα του πρωινού στην συνολική υγεία του ατόμου.....	19
6. Πειραματικό μέρος.....	20

6.1 Αντιοξειδωτική δράση αλεύρων που μελετήθηκαν	20
6.1.1. Σιτάρι (αλεύρι σίτου κατηγορίας Π, Αλεύρι κατηγορίας Μ από μαλακό σιτάρι, Αλεύρι μαλακού σίτου ολικής άλεσης, Σιμιγδάλι σκληρό σιταριού)	20
6.1.2. Κριθάρι (βυνάλευρο κριθαριού)	21
6.1.3. Καλαμπόκι (Αλεύρι καλαμποκιού)	22
6.1.4. Ρύζι (Αλεύρι ρυζιού)	23
6.2 Επιλογή Δειγμάτων.....	24
6.3 Επεξεργασία Δειγμάτων	25
6.4 Διαδικασία επεξεργασίας δειγμάτων.....	25
7. Μέθοδοι Ανάλυσης των Δειγμάτων.....	26
7.1 Συνολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο - Folin Ciocalteu Assay	26
7.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας ABTS •+ - ABTS Assay.....	27
7.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας DPPH• – DPPH Assay	28
7.4 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας υδροξυλίου (•OH) - Hydroxyl Radical Assay	29
7.5 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας O ₂ •- - Superoxide Assay	31
7.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων - Reducing Power Assay	32
8. Αποτελέσματα	33
9. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	39
Βιβλιογραφία	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα δημητριακά (σιτηρά) αποτελούν το μεγαλύτερο και αρχαιότερο τμήμα της διατροφής του ανθρώπου καθώς αποτέλεσαν το πρώτο είδος καλλιέργειας τα τελευταία 10.000 χρόνια. Στις μέρες μας το ποσοστό της καλλιέργειας των σιτηρών, παγκοσμίως (1.550 τόνοι) αντικατοπτρίζουν τις απαιτήσεις της αγοράς και τον σημαντικό ρόλο τους στην διατροφή του ανθρώπου, θεσπίζοντας την βάση της διατροφικής πυραμίδας. Τα βιοενεργά συστατικά τους αποτελούνται επί το πλείστον από φυτοχημικά και άπειπτους υδατάνθρακες, τα οποία προσδίδουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Από αυτά, έχουν αναγνωρισθεί τρεις κύριες κατηγορίες, τα υδατοδιαλυτά, τα λιποδιαλυτά και τα αδιάλυτα. Απαρτίζονται κυρίως από φαινολικά οξέα, τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, καροτονοειδή, φυτοστερόλες, φλαβονοειδή, λιγνάνες κ.α.. Η σημαντικότερη ιδιότητα των φυτοχημικών συστατικών τους είναι η δράση τους έναντι των ελευθέρων ριζών, των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και η σύνδεση τους με την μείωση του οξειδωτικού στρες. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα που προσδίδει την αντιοξειδωτική τους ιδιότητα.

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή έρευνα, μελετήθηκαν τύποι αλεύρων με σειρά πειραματικών πρωτοκόλλων, τα οποία είναι: το Συνολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο (*Folin-Ciocalteu protocol*), η ικανότητα τους να αναστέλλουν τη δράση των τεχνητών ριζών DPPH•, ABTS•+ και των ενδογενώς παραγόμενων ριζών OH• και O₂•-, καθώς και την αναγωγική ικανότητα μέσω της μεθόδου *Reducing Power*. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 7 τύποι αλεύρων: 1. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις, 2. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη, 3. Φαριν απ, 4. Αλεύρι Ολικής Άλεσης, 5. Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης, 6. Καλαμποκάλευρο και 7. Σιμιγδάλι χονδρό.

Μεταξύ των δειγμάτων, τα δείγματα 5. Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης και 4. Αλεύρι ολικής άλεσης, παρουσίασαν το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών DPPH•, υδροξυλίου (•OH), αλλά και έντονη αναγωγική ικανότητα μεταξύ των υπολοίπων δειγμάτων. Επίσης, μεταξύ των δειγμάτων αλεύρων σίτου διαφορετικών τύπων και κατηγοριών μη ολικής άλεσης, το δείγμα 3. Φαριν απ αποδείχθηκε ότι είναι εκείνο με το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο και την υψηλότερη ικανότητα αναστολής των ριζών αλλά και την αναγωγική ικανότητα. Τα δείγματα 6. Καλαμποκάλευρο και 2. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη, παρουσίασαν το χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο μεταξύ των δειγμάτων. Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα μπορεί να αποτελέσει πηγή σημαντικών δεδομένων τόσο για την αξιοποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών στην διατροφή όσο και ανάπτυξης νέων προοπτικών στην έρευνα και βιομηχανία τροφίμων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Αντιοξειδωτικά, οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, αλεύρι, σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, ρύζι

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής μελέτης είναι η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων τύπων αλεύρων που μπορούν να συμβάλουν προστατευτικά έναντι του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μια σειρά αλεύρων του εμπορίου καθημερινής χρήσης όπως: Αλεύρι για όλες τις χρήσεις, Αλεύρι Φαριν απ, Αλεύρι ολικής άλεσης, Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης, Αλεύρι για όλες τις χρήσεις χωρίς γλουτένη, Καλαμποκάλευρο και Σιμιγδάλι χονδρό. Εξετάσθηκαν ως προς το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα μέσω μιας σειράς πειραμάτων έναντι των ριζών DPPH•, ABTS•+, OH• και O₂•-, καθώς και την αναγωγική τους ικανότητα (Reducing assay). Τέλος γίνεται μια συγκριτική ανάλυση των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων τους και αναφέρεται η σημαντικότητα χρήσης τους από την βιομηχανία έως και τις προοπτικές χρήσης τους σε λειτουργικά τρόφιμα.

1. Εισαγωγή

1.1 Δημητριακά

Τα δημητριακά ή σιτηρά αποτελούν το μεγαλύτερο και αρχαιότερο τμήμα της διατροφής του ανθρώπου. Τα τελευταία 100 χρόνια ο άνθρωπος έχει εξελίξει την επεξεργασία-άλεση τους ώστε να καταναλώνει μονάχα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών. Ο αρχικός τρόπος άλεσης τους δεν επέτρεπε τον πλήρη διαχωρισμό του φύτρου (germ) και του πίτουρου (bran) από το αμυλώδες ενδοσπέρμιο (white endosperm), έτσι το τελικό προϊόν ήταν ολικής άλεσης ακατέργαστης μορφής (Spiller, 2002). Το αμυλούχο ενδοσπέρμιο, το φύτρο και το πίτυρο αποτελούν τα κύρια ανατομικά συστατικά των σιτηρών. Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (άρθρο 100), ως δημητριακά ορίζει «τους αποξηραμένους ώριμους καρπούς ορισμένων φυτών που ανήκουν στην οικογένεια των αγρωστώδων (Gramineae) και πρακτικά είναι απαλλαγμένοι από κάθε πρόσμιξη ανόργανης ή οργανικής ύλης» (Κ.Τ.Π., 2021). Η Αμερικάνικη Ένωση Χημικών για τα δημητριακά (American Association of Cereal Chemists - AACC), σαν σιτηρά ολικής άλεσης ορίζει εκείνα τα σιτηρά που αποτελούνται από «τον άθικτο, αλεσμένο, σπασμένο πυρήνα (caryopsis) μετά την αφαίρεση των μη βρώσιμων τμημάτων (hull, husk)».

<u>Χειμερινά σιτηρά</u>	<u>Εαρινά σιτηρά</u>
Σιτάρι	Καλαμπόκι
Κριθάρι	Κεχρί
Βρώμη	Ρύζι
Σίκαλη	Σόργο

Πίνακας 1. Σιτηρά σύμφωνα με την εποχή σποράς τους.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η καλλιέργεια των δημητριακών είναι από τις πιο αναπτυσσόμενες με συνολική εμπορική παραγωγή ~300 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Στη χώρα της Ελλάδας, η παραγωγή σιτηρών διαχωρίζεται ως εξής: 60% καλλιεργούμενης έκτασης και 34% την συνολικής παραγωγής για το σκληρό σιτάρι, 11% της έκτασης και 8% της παραγωγής για το μαλακό σίτο και 19% της έκτασης και 48% της παραγωγής για τον αραβόσιτο (Κυρανάς, 2013).

1.2 Ρόλος στην Διατροφή

Τα δημητριακά αποτελούν την σπουδαιότερη τάξη φυτικών τροφίμων, βρίσκονται στη βάση της διατροφικής πυραμίδας και κατ' επέκταση της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου. Η κατανάλωσή τους καλύπτει περίπου το ήμισυ των καθημερινών διατροφικών αναγκών ενός ενήλικα (~2000 kcal) καθώς ο καρπός των σιτηρών απαρτίζεται από τα εξής ποσοστά μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών: 70% υδατάνθρακες, 12% πρωτεΐνη, 2% λιπαρά, 12% νερό, 2.2% ίνες, 1,8% μέταλλα (Arshad, et al., 2017). Στα σιτηρά ανήκουν περισσότερα από 350 γένη (ρύζι, σιτάρι κ.α.) που περιλαμβάνουν περίπου 4500 είδη.

Η καλλιέργεια του σιταριού άρχισε στην Μεσοποταμία περίπου το 5000 π.Χ. ταυτόχρονα με του καλαμποκιού στην ευρύτερη περιοχή της Αμερικής (Μποσδίκος, 2005). Το ποσοστό της καλλιέργειας των σιτηρών κατά την χρονιά 2019/2020, τόσο παγκοσμίως (2710.7 εκ. τόνοι), όσο και στο επίπεδο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (341.1 εκ. τόνοι), αντικατοπτρίζουν τις απαιτήσεις της αγοράς και κατ' επέκταση την σημαντικότητα του ρόλου τους στην διατροφή του ανθρώπου (FAO, 2021). Στα πλεονεκτήματα τους ανήκει η ευκολία καλλιέργειας και συγκομιδής τους και η δυνατότητα διατήρησης τους αναλλοίωτα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα, η ταυτόχρονη χρήση τους για την παραγωγή τροφών για ζώα κτηνοτροφίας, έχει ως αποτέλεσμα υψηλής διατροφικής ποιότητας ζωικών προϊόντων (κρέας, αυγά, γάλα κ.α.), ενώ η χαμηλή τιμή τους στην αγορά, τα καθιστά μια φθηνή πρώτη ύλη για την παρασκευή μιας μεγάλης γκάμας προϊόντων με μεγάλη θρεπτική αξία (Κυρανάς, 2013).

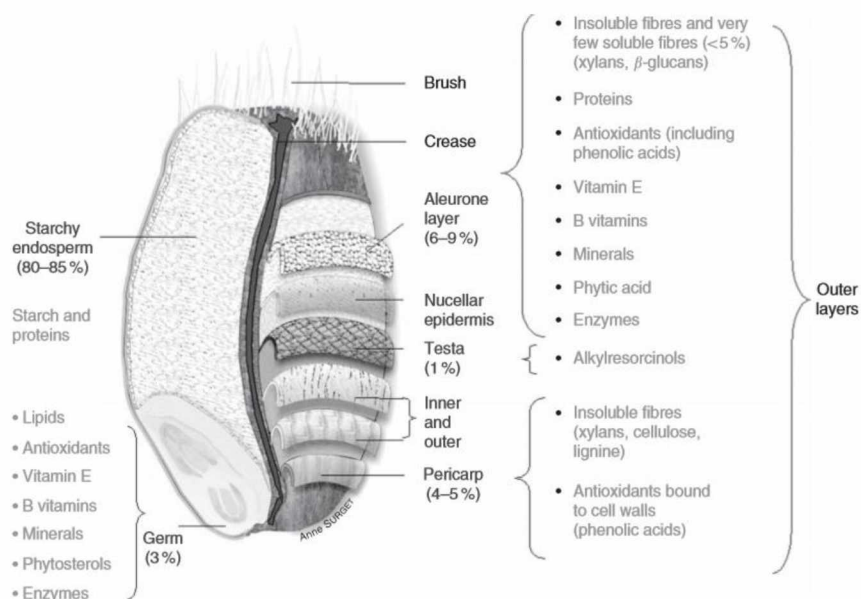
1.3 Ανατομία σιτηρών

Τα σιτηρά έχουν παρόμοια ανατομία μεταξύ τους και συγκεκριμένα οι καρποί τους αποτελούνται από τρία κύρια τμήματα: το εξωτερικό περίβλημα ή αλλιώς πίτυρο (bran), το εσωτερικό τμήμα που ονομάζεται αμυλώδες ενδοσπέρμιο (white endosperm) και το φύτρο (germ) που εμπεριέχει το «έμβρυο» του φυτού (Εικόνα 1). Ο κύριος ρόλος του ενδοσπέρμιου είναι να παρέχει στο φύτρο όλα τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός νέου φυτού. Συγκεκριμένα, το 50-75% του ενδοσπέρμιου αποτελείται από άμυλο (αμυλώδη υδατάνθρακες πχ. γλυκόζη), το 8-18% από πρωτεΐνες και το υπόλοιπο ποσοστό από βιταμίνες, μέταλλα, ίνες και φυτοχημικά συστατικά (Slavin, 2004).

Το πίτυρο είναι το δεύτερο μεγαλύτερο τμήμα του καρπού καθώς αποτελεί το 13-17% αυτού (Arshad, et al., 2017). Αποτελείται κυρίως από φυτικές ίνες, μέταλλα, βιταμίνες και βιοενεργά συστατικά, από τα οποία το 15-18% είναι φαινολικά στοιχεία.

Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι στο πύτυρο, εμπεριέχονται τα περισσότερα φαινολικά συστατικά σε σχέση με το φύτρο. Σε αυτά τα συστατικά οφείλεται κατά κύριο λόγο και η αντιοξειδωτική ικανότητα των σιτηρών. (Seal, et al., 2016).

Το φύτρο, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί το «έμβρυο» του καρπού και καταλαμβάνει περίπου το 2-3% αυτού. Το περιεχόμενό του απαρτίζεται από λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, μέταλλα (K, Ca, Mg, Zn), βιταμίνες του συμπλέγματος B και E, σελήνιο και ένα ποσοστό αντιοξειδωτικών της τάξης του 17%, μικρότερο από αυτό που βρίσκεται στο πύτυρο του καρπού (Seal, et al., 2016) (Frølich, et al., 2013).



Εικόνα 1. Ανατομική δομή ενός ολόκληρου σπόρου σιτηρών. (Seal, et al., 2016)

2. Αλεύρι και προϊόντα του

2.1 Αλεύρι

Η άλεση χρησιμοποιείται κυρίως για την μετατροπή των δημητριακών καρπών σε αλεύρι. Κατά την διαδικασία της άλεσης, απομακρύνεται ο ξυλώδης φλοιός (πίτυρο) των κόκκων του σιταριού και το σπέρμα (φύτρο). Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.), άρθρο 104, παρ. 1, ως «άλευρο σίτου ή απλώς σιτάλευρο, ορίζεται αποκλειστικά και μόνο το προϊόν της άλεσης υγιούς σίτου, βιομηχανικά καθαρισμένου, από κάθε ανόργανη ή οργανική ουσία» (Κ.Τ.Π., 2021). Το αλεύρι είναι το κυριότερο συστατικό των προϊόντων της αρτοποιίας (παραγωγή ψωμιού, ζυμαρικών και αρτοσκευασμάτων), για αυτό και η άλεση πρέπει να έχει σαν στόχο την παραγωγή αλεύρου με τις υψηλότερες δυνατές αρτοποιητικές ιδιότητες. Η αρτοποιητική ικανότητα, δηλαδή ο διαχωρισμός μεταξύ των αρτοσκευασμάτων σε «δυνατά» (π.χ. απλά αρτοσκευάσματα που διογκώνονται με μαγιά) και «αδύνατα» (π.χ. βουτήματα,

μπισκότα, κέικ), βασίζεται στην ποσότητα και ποιότητα της γλουτένης που φέρει το κάθε ένα άλευρο που χρησιμοποιείται. Η «δύναμη» των αρτοσκευασμάτων, συντελείται από τα κύρια χαρακτηριστικά τους (διόγκωση, δομή, εμφάνιση) και αποτελεί έναν συντελεστή για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (χαρακτηριστικά που εκτιμούνται εύκολα με τις αισθήσεις: όραση- εμφάνιση, αφή, όσφρηση-γεύση-άρωμα, ακοή). Εξαρτάται από τις ιδιότητες (ελαστικότητα, εκτατότητα, αντοχή, σταθερότητα) και την % περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, τη γλουτένη που φέρει το κάθε αρτοσκεύασμα (Schunemann & Treu, 1988).

Ως αποτέλεσμα της άλεσης προκύπτει η απομάκρυνση του φλοιού που περιέχει πολλές βιταμίνες (πχ. βιταμίνες συμπλέγματος Β) και ανόργανα στοιχεία, αλλά και του φύτρου που είναι πλούσια πηγή βιταμινών Β,Ε, πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων. Στην περίπτωση μη αφαίρεσης του φύτρου, το τελικό προϊόν είναι επιρρεπές σε αλλοιώσεις προκαλούμενες από το φαινόμενο της τάγγισης, καταστροφής των λιποδιαλυτών βιταμινών Α, D, Ε, Κ, λόγω των υψηλών ποσοστών λίπους που περιέχει. Το τάγγισμα διακρίνεται στο υδρολυτικό και το οξειδωτικό και επιδρά τόσο στην οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων όσο και στην υποβάθμιση της θρεπτικής τους αξίας (Κυρανάς, 2013).

Οι τύποι και κατηγορίες αλεύρων είναι οι εξής:

- Άλευρι τύπου 55%: για ψωμάκια πολυτελείας, ψωμί τοστ, φρυγανιές κλπ., προϊόντα με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο,
- Άλευρι τύπου 70%: το οποίο έχει πολύ μικρή ποσότητα πιτύρων, για το σύνθετες λευκό ψωμί,
- Άλευρι τύπου 90%: για ψωμί ολικής άλεσης, με μεγάλη περιεκτικότητα σε πίτυρο και θρεπτικά στοιχεία,
- Άλευρο ολικής άλεσης από μαλακό σιτάρι: για ψωμί μαύρο, πιτυρούχο, μεγάλης θρεπτικής αξίας,
- Άλευρι τύπου Μ: προέλευση από σκληρά σιτάρια και έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα,
- Άλευρι κατηγορίας Π (πολυτελείας): προέλευσης από σιτάρια υψηλής ποιότητας, ενισχυμένα με γλουτένη ώστε να είναι πολύ «δυνατό»,
- Σιμιγδάλι: προέρχεται από άλεση ενδοσπερμίου των σκληρών σιταριών,

Τέλος υπάρχουν οι εξής τύποι αλεύρων σίτου 405 για οικιακή χρήση, σίτου 550 για ψωμάκια, λευκό ψωμί και μπαγκέτες, χονδρό αλεύρι πιτυρούχο 1050, χονδρό αλεύρι πιτυρούχο 170, άλευρα σίκαλης τύπων 997 και 1150, ιδανικά για ψωμί, χονδρό

σίκαλης τύπου 1800, αλεύρι σίτου αυτοδιογκούμενο αλλά και βιολογικά άλευρα (Organic) (Μποσδίκος, 2005) (Κυρανάς, 2013).

2.2 Άμυλο

Το άλευρο κατά κύριο λόγο αποτελείται από υδατάνθρακες και το 70% αυτών συνιστάται από άμυλο, μια λευκή, άοσμη και άγευστη ουσία, αδιάλυτη στο κρύο νερό. Κύριο χαρακτηριστικό του είναι ότι βρίσκεται παγιδευμένο μέσα στο πρωτεϊνικό πλέγμα του ενδοσπέρμιου και εξάγεται ύστερα από ειδική επεξεργασία δημητριακών και αμυλωδών φυτικών ιστών, υπό μορφή λεπτότατης σκόνης, αποτελούμενο αποκλειστικά από αμυλόκοκκους. Το άμυλο συνήθως εξάγεται από καλαμπόκι, σιτάρι, πατάτα και σύμφωνα με την πηγή τους παρουσιάζουν διαφορετικές χαρακτηριστικές ιδιότητες που αφορούν τη μορφή, το μέγεθος, τη σύνθεσή τους και την κρυσταλλικότητα των κόκκων τους. Στο άμυλο της πατάτας, οι αμυλόκοκκοι είναι ελεύθεροι μέσα στην πρώτη ύλη, οπότε η απομόνωσή τους είναι εύκολη. Αντίθετα, στα δημητριακά (καλαμπόκι), το άμυλο βρίσκεται παγιδευμένο μέσα στο πρωτεϊνικό πλέγμα του ενδοσπέρμιου, με αποτέλεσμα η διαδικασία παραλαβής του να είναι πιο πολύπλοκη (Κυρανάς, 2013).

3. Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό στρες

3.1 Θεωρία και το Παράδοξο του Οξυγόνου

Το οξυγόνο (O_2) αποτελεί ένα από τα κυριότερα και απαραίτητα στοιχεία για την ζωή. Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι, όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί κατά την διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής για την παραγωγή ATP (adenosine triphosphate) (Τριφωσφορική αδενοσίνη), την κύρια χημική ενέργεια για την ζωή, απαιτούν την ύπαρξη οξυγόνου σε όλα τα στάδια της (φωτοσύνθεση (oxygenic photosynthesis) και αερόβια αναπνοή). Με αυτό τον τρόπο μπορεί και διατηρείται η ομοιόσταση στη βιόσφαιρα του πλανήτη (Thannickal, 2009). Φυσικά, κύριο ρόλο έχουν οι ιδιότητες του οξυγόνου, όπως η μεγάλη διαθεσιμότητα του από το περιβάλλον, η μετακίνηση μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών και η δυνατότητα του να δεσμεύει την αίμη σε πρωτεΐνες (αιμοσφαιρίνη και κυτοχρώματα) (Thannickal, 2009).

Από την άλλη, το οξυγόνο μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξικό και επικίνδυνο για τους οργανισμούς αναστέλλοντας απευθείας τη δράση ενζύμων, όπως έχει αποδειχθεί με ορισμένα ένζυμα των αναερόβιων οργανισμών. Τα ένζυμα στους αερόβιους οργανισμούς είτε δεν είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο είτε αναστέλλονται με πολύ χαμηλή ταχύτητα σε σχέση με την τοξικότητα που προκαλεί η έκθεση των

κυττάρων στο οξυγόνο. Οι Gershan και Gilbert, βασιζόμενοι στα κοινά χαρακτηριστικά της τοξικότητας του οξυγόνου και της ιονίζουσας ακτινοβολίας, υπέθεσαν ότι οι επιβλαβείς επιπτώσεις του O_2 οφείλονται κυρίως στη δημιουργία ελευθέρων ριζών με βάση αυτό (Gerschman, et al., 1954). Σήμερα είναι γνωστά αρκετά βασικά ένζυμα του μεταβολισμού, που σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης οξυγόνου, απενεργοποιούνται όχι απευθείας από το O_2 αλλά από τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η οποία αποτελεί προϊόν αναγωγής του O_2 με ένα ηλεκτρόνιο. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 3-5% όλου του οξυγόνου που αναπνέουμε καθημερινά, ανάγεται κατά ένα ηλεκτρόνιο, προς σχηματισμό ριζών ανιόντων υπεροξειδίου. Το υπεροξειδίο μπορεί να αναχθεί κατά ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και κατά ένα τρίτο ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($HO\cdot$) (Davies, 2016)

Το φαινόμενο αυτό, η ικανότητα δηλαδή του οξυγόνου να ανάγεται και να σχηματίζει τοξικά για τον οργανισμό μόρια, όπως οι ελεύθερες ρίζες που προαναφέρθηκαν, είναι γνωστό σαν «το παράδοξο του οξυγόνου». Η παραδοχή δηλαδή ότι, παρόλο που το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η ίδια η μοριακή μορφή του έχει την ικανότητα να μετατρέπεται σε δραστικές μορφές οξυγόνου, προκαλώντας βλάβες σε κύτταρα, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες (Davies, et al., 2017)

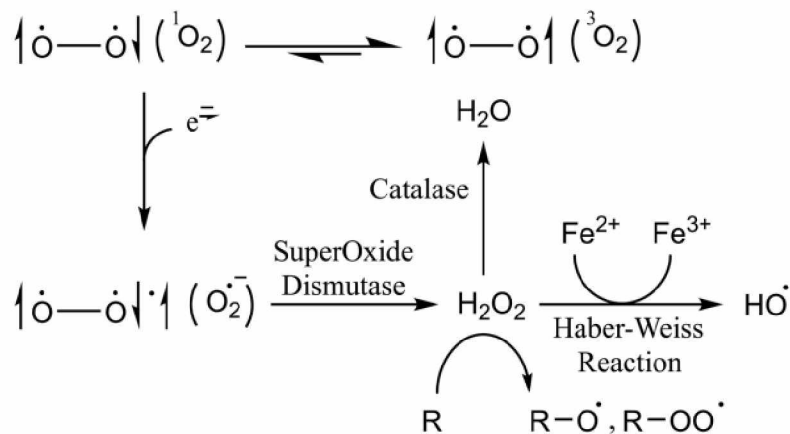
3.2 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται μόρια ή ιόντα τα οποία έχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα τους και έχουν την ικανότητα να υπάρχουν ανεξάρτητα [(Halliwell & Gutteridge, 2007) (Pham-Huy, et al., 2008)]. Ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται είτε από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, είτε από την ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όταν το ζεύγος ηλεκτρονίων που αποτελούσαν το δεσμό ισομοιραστούν (ένα ηλεκτρόνιο σε κάθε ομάδα), δημιουργώντας δυο νέες ελεύθερες ρίζες [(Halliwell & Gutteridge, 2007) (Bahorun, et al., 2006)]. Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και σε μια σειρά διαδοχικών αντιδράσεων. Κατά την διάρκεια τους δημιουργούνται και άλλες ελεύθερες ρίζες και αυτές με την σειρά τους προκαλούν επόμενες αντιδράσεις. Λόγω των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών τους, οι περισσότερες ρίζες υπό φυσιολογικές συνθήκες χαρακτηρίζονται από ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα δράσης-ζωής ($\leq 10^{-6}$ δευτερόλεπτα) [(Halliwell & Gutteridge, 2007) (Young & Woodside, 2001) (Halliwell, 2007) (Cheeseman & Slater, 1993)].

Κατά την δράση των ελευθέρων ριζών παρατηρείται μια σειρά φάσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό της δράσης τους. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες αποτελούνται από υπο-είδη, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS- Reactive Oxygen Species), οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS- Reactive Nitrogen Species), οι δραστικές μορφές άνθρακα και οι δραστικές μορφές θείου (Halliwell, 2007) .

3.2.1 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου -ROS

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS- Reactive Oxygen Species) (Εικόνα 2), αποτελούν την σημαντικότερη κατηγορία των ελευθέρων ριζών. Διαχωρίζονται σε ελεύθερες ρίζες και μη ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν: η ρίζα υπεροξειδίου $O_2\bullet-$, η ρίζα υδροξυλίου $HO\bullet$, οι ρίζες $ROO\bullet$ (peroxyl radicals), οι ρίζες $RO\bullet$ (alkoxyl radicals) (Liou & Storz, 2010). Αρχικά είχε διατυπωθεί η άποψη πως η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) πρόκυπτε μονάχα από τον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων. Αυτός ο ισχυρισμός ανατράπηκε αργότερα καθώς αποδείχθηκε ότι παραγωγή τους συνδέεται με ένζυμα όπως το NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) και άλλες κυτταρικές πηγές όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του αίματος [μονοκύτταρα (monocytes) και ουδετερόφιλα πολυμορφοκύτταρα (neutrophils)] και ένζυμα όπως οι συνθάσες του νιτρικού οξέος (nitric oxide synthases), οι οξειδάσες της ξανθίνης (xanthine oxidases), το κυτόχρωμα P_{450} κ.α. (Izyumov, et al., 2010) (Cubero & Nieto, 2012). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παρουσιάζουν τις περισσότερες επιβλαβείς ιδιότητες τους λόγω του σχηματισμού της ρίζας του υδροξυλίου. Η ρίζα του υδροξυλίου έχει την ικανότητα να αντιδρά με κάθε τύπο βιολογικών μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, λιπίδια και νουκλεοτίδια σε πολύ υψηλό ποσοστό (Young & Woodside, 2001). Τέλος αξίζει να σημειωθεί οι δραστικές μορφές οξυγόνου όταν βρίσκονται σε μη επιβλαβή επίπεδα, μπορούν να λειτουργήσουν ως ενδοκυτταρικά μόρια σηματοδότησης (Ray, et al., 2012). Επίσης, συμβάλλουν σε βιολογικές διαδικασίες όπως τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (Dhalla, et al., 2000), τη ανοσολογική απόκριση (Krause & Bedard, 2008) και στη γνωσιακή λειτουργία (σκέψη, συναίσθημα, διαίσθηση, αίσθηση) (Qin, et al., 2006)

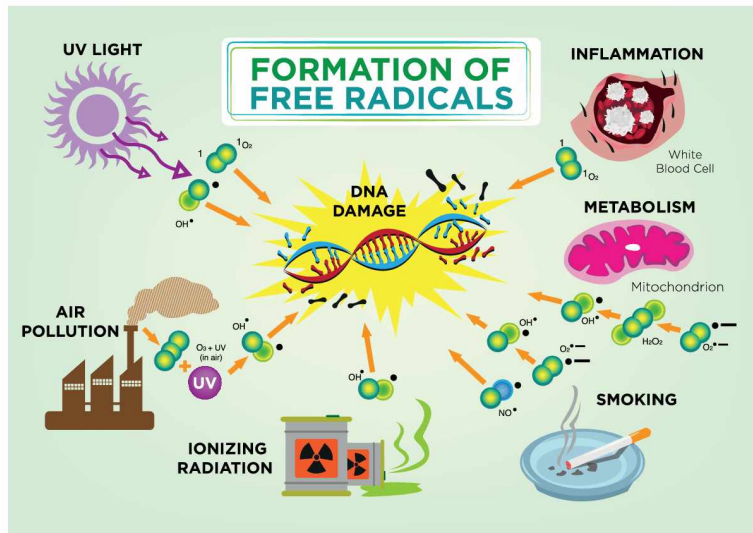


Εικόνα 2. Μετατροπή μορίων οξυγόνου σε διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). (Bardaweel, et al., 2018)

3.2.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε ενδογενώς στον οργανισμό είτε από εξωγενείς πηγές (Εικόνα 3). Οι επιβλαβείς εξωγενείς χημικές ενώσεις όταν εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε κατακερματίζονται είτε μεταβολίζονται, γεγονός που οδηγεί πολλές φορές στην παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών. Υπεύθυνες εξωγενείς πηγές είναι κυρίως περιβαλλοντικοί παράγοντες (όπως μολυσμένο νερό, αέρας, ηλιακή UV ακτινοβολία κ.α.), η παρατεταμένη έκθεση του ατόμου σε καπνό του τσιγάρου, σε μέταλλα (Cd, Hg, Pb, Fe, As) και άλλα χημικά διαλύματα. Επιπρόσθετα, ο τρόπος ζωής του ατόμου βάση των διατροφικών του συνηθειών όπως η παρατεταμένη και χρόνια κατανάλωση αλκοόλ και ο τρόπος μαγειρέματος της τροφής του (πχ καπνιστό κρέας, επαναχρησιμοποιούμενα έλαια κ.α.) συγκαταλέγεται στις εξωγενείς πηγές, υπεύθυνες για την παραγωγή δραστικών μορφών [(Pham-Huy, et al., 2008) (Young & Woodside, 2001)].

Η ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό οφείλεται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά και κυτταρικές βλάβες λόγω ύπαρξης φλεγμονής, μόλυνσης, γήρανσης και καρκίνου. Επίσης, το ψυχολογικό στρες, η ισχαιμία (ελλιπής αιμάτωση κάποιου μέρους του σώματος, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά ή και άλλα όργανα ή ιστοί, εξαιτίας περιορισμένης ροής του αίματος) και η υπερβολική άσκηση, υπάγονται στους ενδογενείς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών (Pham-Huy, et al., 2008).



Εικόνα 3. Εξωγενείς και Ενδογενείς παράγοντες δημιουργίας Ελευθέρων ριζών.

3.2.3 Ευεργετικές ιδιότητες των Ελευθέρων ριζών

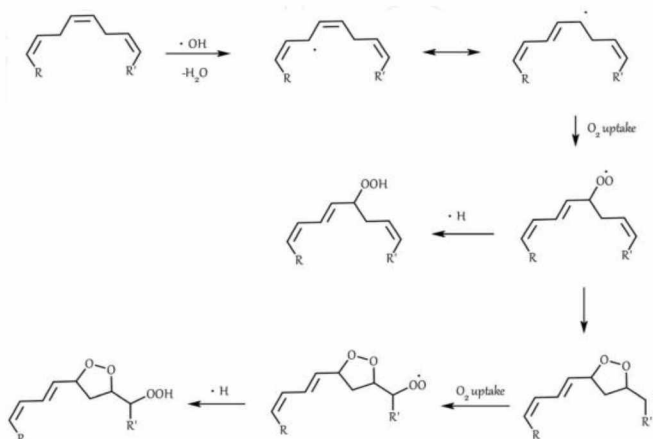
Λανθασμένα έχει δημιουργηθεί η εντύπωση πως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) έχουν μόνο επιβλαβή επίδραση στον οργανισμό. Στην πραγματικότητα είναι αναγκαίες για φυσιολογικές διεργασίες όπως όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Bardaweel, et al., 2018) (Pham-Huy, et al., 2008). Συγκεκριμένα, η ύπαρξη των ROS και RNS στο ανοσοποιητικό σύστημα, θεωρείται απαραίτητη καθώς τα φαγοκύτταρα για να καταστρέψουν παθογόνα μικρόβια παράγουν ελεύθερες ρίζες ως αμυντικούς μηχανισμούς (Young & Woodside, 2001). Εξίσου σημαντική είναι η συμβολή τους στην ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών σε ενδοκυτταρικό επίπεδο (intracellular signaling pathways) όπως μεταξύ απλών ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και κυττάρων του καρδιαγγειακού συστήματος όπως τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και τα κύτταρα του μυοκαρδίου (Pacher, et al., 2007).

3.2.4 Επιβλαβείς ιδιότητες των Ελευθέρων ριζών

Ως αποτέλεσμα της παραγωγής ελευθέρων ριζών, έχει παρατηρηθεί μια σειρά χημικών αντιδράσεων με αποτέλεσμα τις επιβλαβείς ιδιότητές τους, οι οποίες αποτελούν τον πρόδρομο της καταστροφής των κυττάρων (Nakamura, et al., 1997). Αυτό συντελείται υπό την συστηματική παραγωγή ελευθέρων ριζών σε βαθμό πέρα από την ικανότητα του οργανισμού να τις περιορίσει ώστε να μην είναι επιζήμιες γι' αυτόν (Pham-Huy, et al., 2008). Υπό αυτές τις συνθήκες, επιτελείται μια σειρά διαδικασιών, οι οποίες έχουν ως στόχο την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και άλλων δομικών στοιχείων όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, οι λιποπρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA).

A. Υπεροξειδωση λιπιδίων

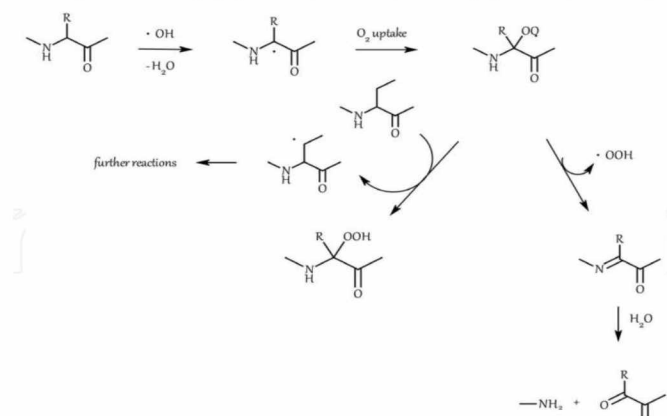
Η υπεροξειδωση των λιπιδίων παρατηρείται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που αποτελούν δομικό στοιχείο της κυτταρικής μεμβράνης. Ως αποτέλεσμα αυτού, επηρεάζονται χαρακτηριστικά του κυτάρου όπως η ρευστότητά του (fluidity) και η λύση (διάσπαση) της κυτταρικής του μεμβράνης. Κύριο χαρακτηριστικό της οξειδωσης των λιπιδίων είναι ότι εξελίσσεται μέσω μιας διαδοχικής αλυσίδας δράσης ελευθέρων ριζών (Εικόνα 4) (Santos-Sánchez, et al., 2019).



Εικόνα 4. Αντίδραση της Ρίζας Υδροξυλίου με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. (Santos-Sánchez, et al., 2019)

B. Οξειδωση πρωτεϊνών

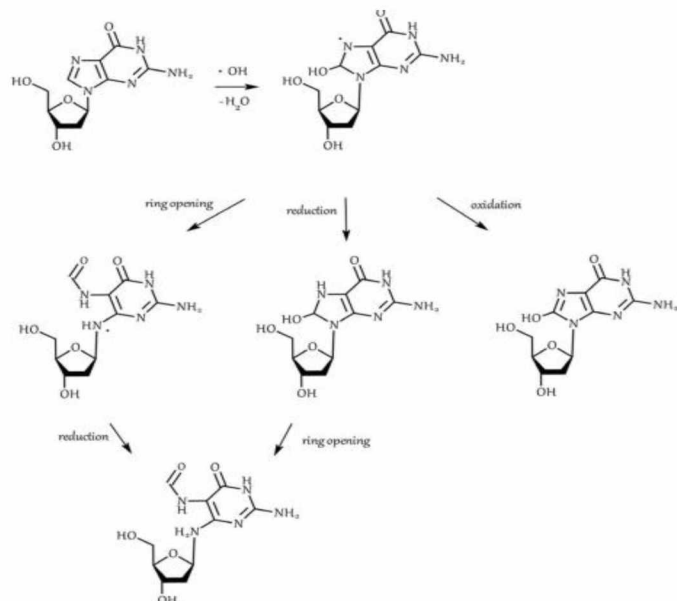
Η οξειδωση των πρωτεϊνών επέρχεται μέσω της τροποποίησης ενός αμινοξέος, της διάσπασης πεπτιδίων και της δημιουργίας «συσσωματώματος» πρωτεϊνών (με δύο ή/και περισσότερα μόρια) (protein cross-linkage) λόγω της αλληλεπίδρασης με προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Με την καταστροφή των πρωτεϊνών δημιουργείται μια σειρά προϊόντων που ως στόχο έχουν την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και των λειτουργιών του κυτάρου, της δράσης των ενζύμων και των υποδοχέων κα. (Εικόνα 5) [(Dean, et al., 1997) (Lobo, et al., 2010)]



Εικόνα 5. Αντίδραση της Ρίζας Υδροξυλίου με α-αμινοξέα. (Santos-Sánchez, et al., 2019)

Γ. Καταστροφή του Γενετικού υλικού

Μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ευαισθησία του γενετικού υλικού (DNA και RNA) από την οξειδωση των ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η τροποποίηση των αζωτούχων βάσεων (Εικόνα 6) με αποτέλεσμα την μεταλλαγμένη και την καρκινογένεση. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο επιρρεπές στην οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών. [(Nimse & Pal, 2015) (Lobo, et al., 2010)]



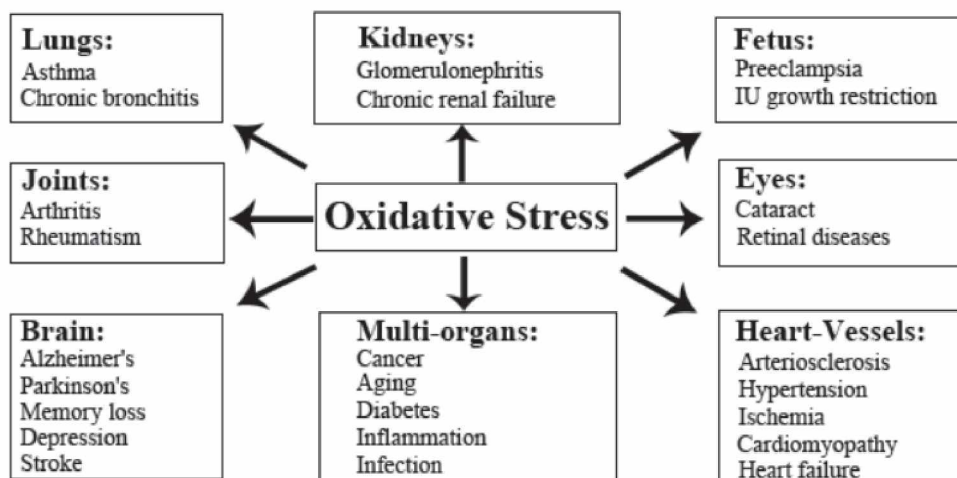
Εικόνα 6. Αντίδραση της Ρίζας Υδροξυλίου με βάσεις της DNA guanosine. (Santos-Sánchez, et al., 2019)

3.3 Οξειδωτικό στρες

Σύμφωνα με τους Sies και Jones, το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως «η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των οξειδωτικών μορίων, οδηγώντας σε διακοπή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (redox signaling) και ελέγχου και/ή σε μοριακή βλάβη» (Sies & Jones, 2007). Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετισθεί με βλάβες σε μια σειρά μορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα (McCord, 2000). Μια τέτοια οξειδωτική βλάβη συνοδεύεται με αλλαγές στην δομή και λειτουργία των μακρομορίων και με την εκδήλωση παθολογικών παθήσεων (Vaya & Aviram, 2001).

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες έχει συσχετισθεί με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, οι φλεγμονώδεις παθήσεις, συγκεκριμένων τύπων καρκίνου και τη διαδικασία της γήρανσης. Ακόμη, συμβάλει σημαντικά σε καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις κ.α. (Εικόνα 7). Ο λόγος που το οξειδωτικό στρες συνδέεται με ένα μεγάλο εύρος παθολογικών καταστάσεων, οφείλεται στο γεγονός ότι ο μεταβολισμός του κυττάρου έχει ως απαραίτητο μέρος του

τον οξειδωτικό μεταβολισμό. Στην περίπτωση κυτταρικής βλάβης που οδηγεί σε βλάβη στο μιτοχόνδριο, μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση σύνθεσης της ρίζας του σουπεροξειδίου (McCord, 2000).



Εικόνα 7. Συσχέτιση Οξειδωτικού στρες με ομάδες ασθενειών στον άνθρωπο. (Pham-Huy, et al., 2008)

4. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Σύμφωνα με τον Lobo και τους συνεργάτες του, αντιοξειδωτικό ορίζεται ως «ένα μόριο αρκετά σταθερό ώστε να “δωρίσει” ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα προκειμένου να εξουδετερωθεί, με κύριο στόχο να μειωθεί η βλαπτική της ικανότητα» (Lobo, et al., 2010). Τέτοιες ουσίες, έχουν την ικανότητα να καθυστερούν ή να αναστέλλουν την κυτταρική βλάβη, αντιδρώντας άμεσα με ελεύθερες ρίζες και τερματίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (chain reactions) που προκαλούν [(Halliwell, 1995) (Lobo, et al., 2010)]. Κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά των αντιοξειδωτικών είναι ότι δρουν συνεργιστικά, αποτελούν σημαντικούς δότες υδρογόνων ή/και ηλεκτρονίων και λειτουργούν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες δημιουργώντας λιγότερο δραστικά μόρια (Lobo, et al., 2010).

4.1 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών

Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών για να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες είτε παράγοντας αντιοξειδωτικές ουσίες (ενδογενή αντιοξειδωτικά), είτε λαμβάνοντάς αντιοξειδωτικά μέσω της διατροφής (εξωγενή αντιοξειδωτικά) (Pham-Huy, et al., 2008). Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ταξινομούνται στα: ενζυμικά αντιοξειδωτικά που δρουν άμεσα για την αδρανοποίηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και των μη ενζυμικών που χαρακτηρίζονται ως μεταβολικά και παράγονται από τον μεταβολισμό του οργανισμού. Στα εξωγενή

αντιοξειδωτικά ανήκουν αντιοξειδωτικά που δεν μπορούν να παραχθούν φυσικά από τον ανθρώπινο οργανισμό και παρέχονται μονάχα μέσω της τροφής και διατροφικών συμπληρωμάτων (Πίνακας 2) (Pham-Huy, et al., 2008).

	Ενδογενή Αντιοξειδωτικά	Εξωγενή Αντιοξειδωτικά
Ενζυμικά	Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD), Καταλάση (CAT), Αναγωγάση της Γλουταθειόνης (GR), Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GPx)	-
Μη ενζυμικά	Λιποϊκό οξύ, Γλουταθειόνη, η L-Αργινίνη, Συνένζυμο Q10, Μελατονίνη, Ουρικό οξύ, Χολερυθρίνη, Τρανσφερρίνη κ.α.	Βιταμίνη Ε, Βιταμίνη C, Καροτονοειδή, Φλαβονοειδή, Ωμέγα-3 και Ωμέγα- 6 λιπαρά οξέα, Μεταλλικά στοιχεία (Se, Mg, Zn), κ.α.

Πίνακας 2. Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών..

4.2 Μηχανισμοί και δράσεις των Αντιοξειδωτικών

Η δράση των αντιοξειδωτικών λειτουργεί κυρίως με δυο μηχανισμούς: είτε με την καταστολή της αλυσιδωτής αντίδρασης (chain breaking) που προκλήθηκε από τις ελεύθερες ρίζες, είτε ως μηχανισμός πρόληψης (Pham-Huy, et al., 2008). Όταν μια αντιοξειδωτική ουσία αναστείλει τη δράση μιας ελεύθερης ρίζας, καθίσταται οξειδωμένη και αναποτελεσματική έναντι άλλων ελευθέρων ριζών. Επιπρόσθετα, η εξισορρόπηση της δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών δεν εξαρτάται μόνο από τις συγκεντρώσεις τους, αλλά και από τη χημική τους ένωση και τις συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση (Rice-Evans, 1995).

Έχουν υπάρξει αναφορές ότι πολλά συνθετικά αντιοξειδωτικά (πχ. butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole) που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, φέρουν αντενδείξεις για την ασφαλή κατανάλωση τους από τον άνθρωπο, αντιβαίνοντας τις ευεργετικές τους ιδιότητες που είναι ο πρωταρχικός λόγος χρήσης τους (Κυρανάς, 2013) (Κυρανάς, 2016). Έτσι, η έρευνα για εξίσου αποτελεσματικές, μη τοξικές, φυσικές αντιοξειδωτικές

ουσίες έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια και ως επί το πλείστον, έχει στραφεί στα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται φυσικά στα τρόφιμα που καταναλώνονται στην καθημερινότητα.

5. Αντιοξειδωτική δράση σιτηρών

5.1 Βιοενεργά συστατικά σιτηρών

Τα βιοενεργά συστατικά των σιτηρών αποτελούνται ως επί το πλείστον, από φυτοχημικά συστατικά (phytochemicals) και άπεπτους υδατάνθρακες, που τους προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες μετά την κατανάλωση τους (Borneo & León, 2012) (Cho, et al., 2013) (Εικόνα 8). Από αυτά τα φυτοχημικά έχουν αναγνωριστεί τρεις κύριες κατηγορίες: τα υδατοδιαλυτά (water-soluble), τα λιποδιαλυτά (fat-soluble) και τα αδιάλυτα (insoluble). Αυτές τις ομάδες τις απαρτίζουν κυρίως φαινολικά οξέα (πχ φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ), τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, καρτονοειδή, φυτοστερόλες, φλαβονοειδή, λιγνάνες, ανθοκυανίνες καθώς και φυτικά οξέα και οξαλικά (oxalates) που αποτελούν τους μη-διατροφικούς παράγοντες τους (antinutritional factors). Στα σιτηρά υπάρχουν και άλλα βασικά θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, πρωτεΐνες και μέταλλα (σίδηρος, ψευδάργυρος, φώσφορος και ασβέστιο) (Arshad, et al., 2017).

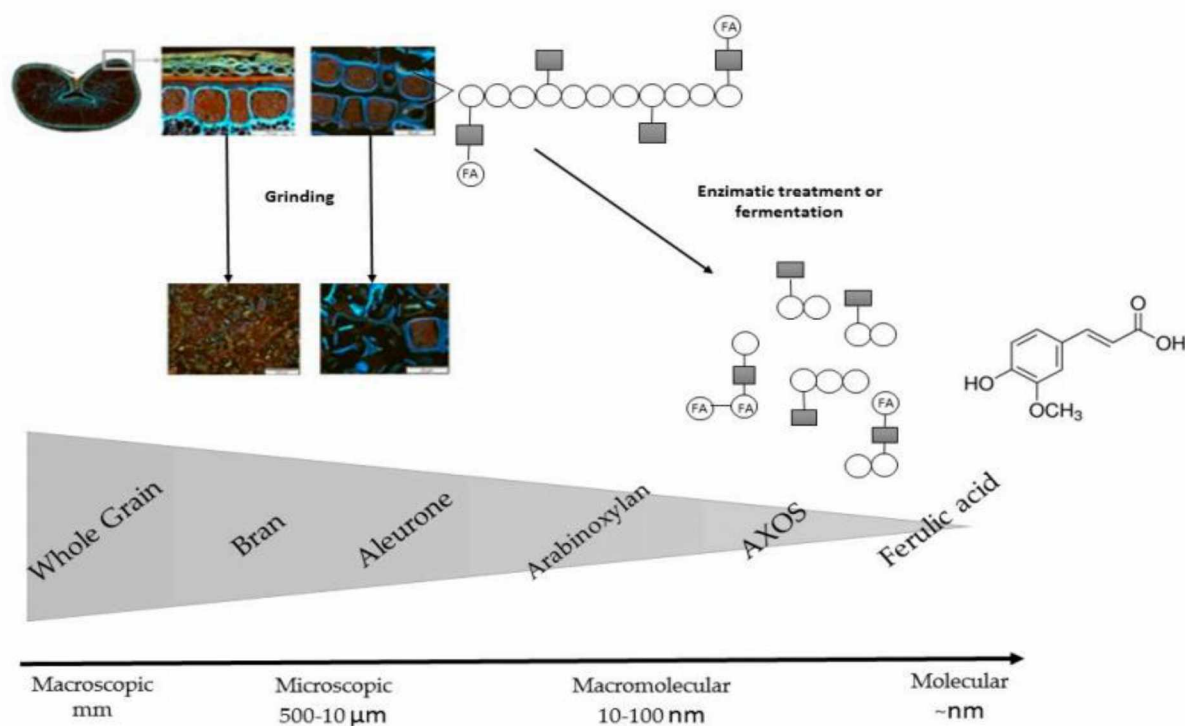
Cereals Bran	Major Antioxidants
Wheat	Ferulic, vanillic, caffeic, coumaric and syringic acid
Barley	Protocatechuic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, coumaric acid, sinapic acid
Oat	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid, vanillic acid,
Rye	Protocatechuic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, <i>p</i> -coumaric acid, caffeic acid, sinapic acid

Εικόνα 8. Κύρια αντιοξειδωτικά στοιχεία διαφόρων σιτηρών (Nayak, et al., 2015)

Από τις πιο σημαντικές και κύριες ιδιότητες των βιοενεργών συστατικών είναι η δράση τους έναντι στις ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση στο οξειδωτικό στρες. Κατά το οξειδωτικό στρες, κύρια βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (DNA) και λιπίδια, μέσω διαφόρων μηχανισμών προστατεύονται μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών οξέων (Gani, et al., 2012). Η δραστηριότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών των σιτηρών μπορεί να επηρεαστεί κατά την διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων που τα περιέχουν. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις Maillard κατά τις οποίες τα σιτηρά υποβάλλονται σε υψηλές θερμοκρασίες (θερμική αμαύρωση), έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν την ολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε

σύγκριση με την ωμή αρχική μορφή τους, προσεγγίζοντας τα επίπεδα τιμών αντιοξειδωτικής δράσης φρούτων και λαχανικών (Miller, 2001).

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα που προσδίδει την αντιοξειδωτική ιδιότητα στα σιτηρά. Λόγω της σημαντικής θέσης που έχουν τα σιτηρά στη διατροφή του ανθρώπου, αποτελούν μια σημαντική πηγή φαινολικών οξέων στην Μεσογειακή διατροφή (περίπου 30%) (Călinoiu & Vodnar, 2018). Το μεγαλύτερο τμήμα των αδιάλυτων αντιοξειδωτικών είναι τα δεσμευμένα φαινολικά οξέα (bound phenolics) τα οποία και προσδίδουν τα 2/3 όλης της αντιοξειδωτικής ιδιότητας των σιτηρών. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι δεν μπορούν να διαλυθούν σε νερό, εξάνιο και μεθανόλη και έτσι δεν μπορούν να μελετηθούν. Ωστόσο, στο κόλον έχει παρατηρηθεί η απορρόφηση τους καθώς υδρολύονται από τα μικροβιακά ένζυμα που υπάρχουν εκεί. Έτσι, αναγνωρίζεται το γεγονός πως τα σιτηρά και ιδιαίτερα τα σιτηρά ολικής άλεσης μπορούν και παρέχουν διαφορετικούς τύπους αντιοξειδωτικών, οι οποίοι απορροφούνται σε διαφορετικά τμήματα του γαστρεντερικού συστήματος, (Slavin, 2004). Σύμφωνα με τους Adom & Liu, τα δεσμευμένα φαινολικά οξέα -που κατέχουν το 90% των αντιοξειδωτικών των αλεύρων- έχουν υποτιμηθεί από την έρευνα καθώς στην πλειονότητα της μελετούνται τα μη-δεσμευμένα φαινολικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι τα συγκεκριμένα δεν διαλύονται και δεν απορροφούνται ούτε στον στόμαχο ούτε στο λεπτό έντερο (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Από το μακροσκοπικό στο μοριακό επίπεδο, τα πιο ενδιαφέροντα διατροφικά τεχνολογικά κλάσματα ενός σπόρου σιταριού (Čálikoú & Vodnar, 2018).

5.2 Προοπτικές στην υγεία μέσω της κατανάλωσης δημητριακών-σιτηρών πλούσια σε αντιοξειδωτικά

Όπως προαναφέρθηκε, πολλά είναι τα ευεργετικά συστατικά των σιτηρών και πιο συγκεκριμένα τα αντιοξειδωτικά τους όπως η βιταμίνη C, E, τα καροτονοειδή, τα φαινολικά στοιχεία και τα φλαβονοειδή (Okarter, et al., 2010) (Liu, et al., 2012). Πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τη σχέση των σιτηρών και την χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης οξειδωτικού στρες στον οργανισμό, λόγω της προστατευτικής τους δράσης έναντι των δραστικών μορφών (RS) (Pozzo, et al., 2015). Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες των σιτηρών εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου (hydroxyl) και περοξυλίου (peroxyl) αντιδρώντας απευθείας σε αυτές, καταστέλλοντας έτσι, την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Arshad, et al., 2017). Αναλυτικότερα, λόγω της απορρόφησης των φαινολικών σε ποσοστό 90–95% από το κόλον αλλά και τον άπεπτον διαιτητικών ινών, διευκολύνεται η διαδικασία της πέψης στον άνθρωπο και παρατηρείται και μια άμεση σταθεροποίηση στο μεταβολισμό και στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. (Swallah, et al., 2020). Κατ' επέκταση, με την σταθεροποίηση της βιοσύνθεσης την χοληστερόλης, παρατηρείται μείωση των επιπέδων της στον ορό του αίματος αλλά και των τριγλυκεριδίων, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης

καρδιαγγειακών νοσημάτων (Arshad, et al., 2017). Επιπρόσθετα, σημαντική είναι και η επιρροή τους στην ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης νηστείας του ορού του αίματος και στην εύρυθμη έκκριση ινσουλίνης. Εξίσου σημαντική είναι και η επιρροή τους στην εξέλιξη και την πορεία του καρκίνου, καθώς έχει βρεθεί ότι τα σιτηρά αναστέλλουν τον παράγοντα TNF- α και έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες κατά την απόπτωση και καρκινογένεση στον καρκίνο του μαστού (MCF-7 και MDA-MB-231) (Suliburska, et al., 2014).

5.3 Σημαντικότητα των αντιοξειδωτικών των αλεύρων: από την βιομηχανία παρασκευής αρτοποιημάτων μέχρι τα αρτοποιήματα του πρωινού στην συνολική υγεία του ατόμου

Τα ευεργετικά θρεπτικά συστατικά των αρτοπαρασκευασμάτων που παράγονται από λευκό αλεύρι, θα μπορούσαν να θεωρηθούν αναντικατάστατα και μια πολλά υποσχόμενη πηγή αντιοξειδωτικών, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε διαιτητικές ίνες, μέταλλα, ινουλίνη, βιταμίνες, ω -3 λιπαρά οξέα, ολιγοσακχαρίτες, β -γλυκάνες και σπόρους λιναριού. Η καθημερινή κατανάλωση τους σε γεύματα όπως το πρωινό, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην συνολική υγεία του ατόμου, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αυτά τα στοιχεία (Baublis, et al., 2000). Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι μέσω της καθημερινής κατανάλωσης τροφίμων πρωινού που περιέχουν σιτάρι, προλαμβάνονται νοσήματα όπως το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, η υπέρταση, το οξειδωτικό στρες, αλλά και ψυχικές διαταραχές (Ekström, et al., 2016). Εξίσου σημαντική είναι η συμβολή τους στην ρύθμιση του γλυκαιμικού δείκτη σε φυσιολογικά επίπεδα και μετά την μεταγευματική φάση, έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόληψη εμφάνισης διαβήτη τύπου II και συμβάλλοντας στον κορεσμό του ατόμου (Ekström, et al., 2016). Τέλος, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε διαιτητικές ίνες, έχει αποδειχθεί η σημαντικότητά τους και σε παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος (Mongro, 2002)

Η ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων με βάση συστατικά ή/και προϊόντα των σιτηρών, μπορεί να μοιάζει ως ένας περίπλοκος κλάδος. Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων καινοτόμων τεχνολογιών ή/και η καλύτερα στοχευμένη αξιοποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών, θα έχει πολλαπλά οφέλη τόσο στην υγεία των καταναλωτών, όσο και στην βελτίωση υπαρχόντων προϊόντων, προσδίδοντας έτσι νέες προκλήσεις τόσο για τους επιστήμονες της τεχνολογίας τροφίμων όσο και της βιομηχανίας.

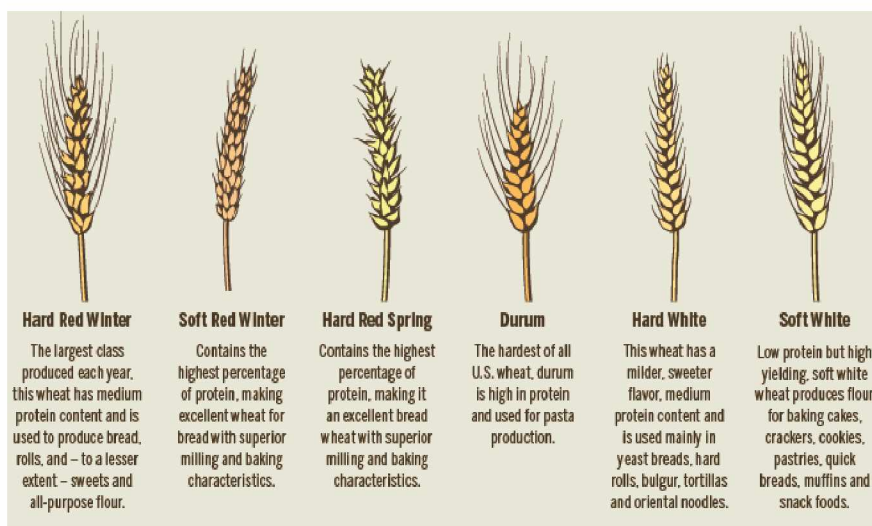
6. Πειραματικό μέρος

6.1 Αντιοξειδωτική δράση αλεύρων που μελετήθηκαν

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή εργασία, μελετήθηκε μια ποικιλία αλεύρων και αμύλων διαφορετικών σιτηρών (σιτάρι διαφορετικών τύπων και κατηγοριών, κριθάρι, καλαμπόκι, ρύζι). Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν τα παρακάτω:

6.1.1. Σιτάρι (αλεύρι σίτου κατηγορίας Π, Αλεύρι κατηγορίας Μ από μαλακό σιτάρι, Αλεύρι μαλακού σίτου ολικής άλεσης, Σιμιγδάλι σκληρό σιταριού)

Το σιτάρι (*Triticum spp. L.*) (Εικόνα 10) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες του πρωτογενούς τομέα με παγκόσμια καλλιέργεια 760.8 εκ. τόνων (FAO, 2021). Υπάρχουν διαφορετικές κατηγορίες σιταριού που καλλιεργούνται ανάλογα με τον επιθυμητό τύπο του τελικού προϊόντος (λευκό αλεύρι για παραγωγή ψωμιού και αρτοποιημάτων, σιμιγδάλι για παραγωγή ζυμαρικών, αλεύρι ολικής άλεσης για την παρασκευή ψωμιού και στη ζαχαροπλαστική) (Κυρανάς, 2013) (Adom, et al., 2003). Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση προϊόντων ολικής αλέσεως με την μη προοδευτική εκδήλωση και πρόληψη χρόνιων παθήσεων όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, ο διαβήτης Τύπου II και ο καρκίνος, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε φυτοχημικά συστατικά (Fardet, 2010).

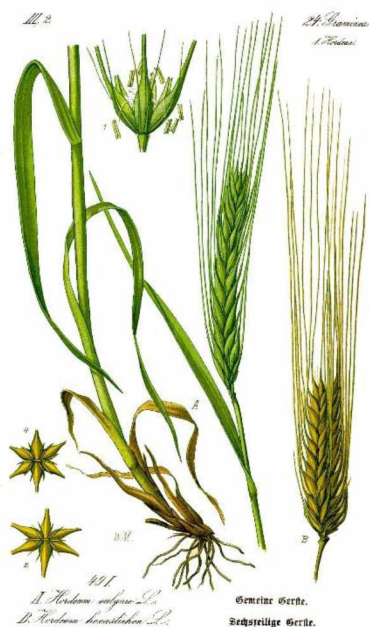


Εικόνα 10. Η ταξινόμηση του σιταριού σε έξι κλάσεις.

Τα κύρια βιοενεργά φυτοχημικά συστατικά που εμπεριέχονται στο σπόρο του σιταριού, κατανέμονται άνισα στα διάφορα τμήματά του καθώς το ποσοστό περιεκτικότητας τους μπορεί να επηρεαστεί από τον τρόπο επεξεργασίας και άλεσης του καρπού (Fardet, 2010). Τα πιο σημαντικά, εξαιρουμένων των φυτικών ινών, είναι:

ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, θειούχα αμινοξέα, ολιγοσακχαρίτες (σταχυόζη, ραφινόζη και φρουκτάνες), λιγνίνη, μέταλλα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες Β και Ε, καροτενοειδή, πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα όπως το φερουλικό οξύ, φλαβονοειδή και λιγνάνες), αλκυλορεσορκινόλες (alkylresorcinols), φυτικό οξύ, βηταΐνη, ινοσιτόλες, φυτοστερόλες, και μελατονίνη. Το κάθε ένα από αυτά τα στοιχεία αλλά και συνεργιστικά αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες τους στον καρπό του σιταριού (Fardet, 2010). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συγκεκριμένης λειτουργίας είναι η δράση της βιταμίνης Ε έναντι της υπεροξειδωσής λιπιδίων (lipid chain peroxidation), ενώ εξίσου σημαντικός είναι και ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός που παρουσιάζεται μεταξύ των φυτικών οξέων και των παραγόμενων ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (παραγόμενες από την αντίδραση Fenton) (Graf, et al., 1987). Κατά την κατανάλωση των αντιοξειδωτικών του σιταριού από το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης τους δεν είναι ακόμη πλήρως ταυτοποιημένοι, όμως υπάρχουν αρκετά δεδομένα που επιβεβαιώνουν την δράση τους έναντι ελευθέρων ριζών (Fardet, et al., 2008). Συγκεκριμένα οι μελέτες έχουν εστιάσει στην δράση τους έναντι ουσιών που παράγονται από τα βακτήρια του εντέρου που συντελούν στην παραγωγή προκαρκινογόνων ή καρκινογόνων ουσιών ή ουσιών που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton λόγω μιας διατροφής υψηλής σε κατανάλωση κόκκινου κρέατος (Babbs, 1990).

6.1.2. Κριθάρι (βυνάλευρο κριθαριού)



Εικόνα 11. Σχεδιακή αποτύπωση όλων των μελών του φυτού του Κριθαριού (*Hordeum vulgare* L.).

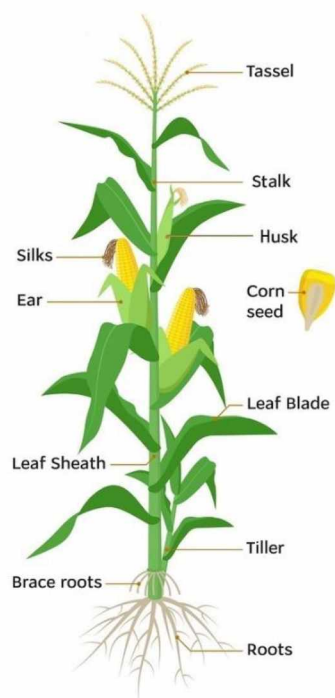
Το κριθάρι (*Hordeum vulgare* L.) (Εικόνα 11) είναι από τις αρχαιότερες καλλιέργειες δημητριακών που διατηρούνται έως και σήμερα αφού οι πρώτες αναφορές της καλλιέργειάς του τοποθετούνται στις όχθες του ποταμού Νείλου στην Αίγυπτο περίπου 17.000 χρόνια πριν (Badr, et al., 2000). Κύρια χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς του είναι η ανθεκτικότητα έναντι ακραίων καιρικών συνθηκών η ξηρασία του καλοκαιριού, καθώς και το κόστος παραγωγής του, γεγονός που το καθιστά ως ένα ιδανικό δημητριακό για αυτό το σκοπό (Cook, 2013). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει τη καθημερινή κατανάλωση κριθαριού με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης και εξέλιξης ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (ικανότητα μείωσης την LDL χοληστερόλης και αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης), καρκίνο και υψηλή αρτηριακή πίεση.

Επίσης έχει γίνει αναφορά από τον Idehen και τους συνεργάτες του, για την θετική

επίδρασή του στη διατήρηση ενός υγιούς παχέος εντέρου και σε ασθένειες που σχετίζονται με αυτό (Idehen, et al., 2017).

Κύρια βιοδραστικά συστατικά του αποτελούν οι βιταμίνες, τα μέταλλα, οι φυτικές ίνες και διάφορα φυτοχημικά στοιχεία. Από αυτά, οι β-γλυκάνες θεωρούνται οι πιο σημαντικές, καθώς προσδίδουν τα περισσότερα ευεργετικά οφέλη του κριθαριού στην υγεία του ανθρώπου. Στα κυριότερα φυτοχημικά συστατικά ανήκουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες, η βιταμίνη E (τοκόλες), οι στερόλες και το φολικό οξύ (Malik, 2012). Από αυτά, οι στερόλες και οι τοκόλες λειτουργούν κυρίως ως προστατευτικοί παράγοντες έναντι τοξινών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως το Αλτσχάιμερ στον ανθρώπινο οργανισμό. Στο σύνολο τους, τα φυτοχημικά συστατικά του κριθαριού έχουν μελετηθεί έναντι ασθενειών όπως ο διαβήτης με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική δράση των ίδιων στοιχείων του έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και ανοσοδιεγερτική δράση (Idehen, et al., 2017).

6.1.3. Καλαμπόκι (Αλεύρι καλαμποκιού)



Εικόνα 12. Σχεδιακή αποτύπωση όλων των μελών του φυτού του Καλαμποκιού.

Στην οικογένεια του καλαμποκιού ή αραβόσιτου (*Zea mays L.*) (Εικόνα 12) ανήκουν πολλοί διαφορετικοί τύποι με σημαντικότερους το οδοντόμορφο, το σκληρό και το μαλακό. Κύρια προϊόντα του είναι το άλευρό του, το άμυλο αραβόσιτου, το καλαμποκέλαιο-αραβοσιτέλαιο, τα αμυλοσιρόπια, το bouibon κ.α. και αποτελεί ένα από το κυριότερα σιτηρά στην βιομηχανία τροφίμων (Nikolić, et al., 2019), ενώ μαζί με τα υπόλοιπα σιτηρά βρίσκεται στη βάση της τροφικής πυραμίδας (Κυρανάς, 2013). Τα κύρια συστατικά του καλαμποκιού είναι πρωτεΐνη χαμηλής βιολογικής αξίας (εξαιρείται η γλουτένη), υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα, έλαια και φυτικές ίνες (Ragae, et al., 2006).

Κύρια φυτοχημικά συστατικά του είναι τα φαινολικά οξέα, όπως το πρωτοκατεχικό (protocatechuic), το π-υδροξυβενζοϊκό (p-hydroxybenzoic), το βανιλικό (vanillic), το φερουλικό (ferulic), το καφεϊκό (caffeic) και το π-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid) (δεσμευμένα (bound) 98.9%, ελεύθερα 1,1%) που έχουν ανιχνευτεί στον καρπό του καλαμποκιού (Mattila, et al., 2005). Σε αυτά τα στοιχεία οφείλεται και

η αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση που παρουσιάζει το καλαμπόκι (Van Hung, 2016) (Rosa, et al., 2016).

6.1.4. Ρύζι (Αλεύρι ρυζιού)



Εικόνα 13. Σχεδιακή αποτύπωση όλων των μελών του φυτού του Ρυζιού.

Το ρύζι (*Oryza sativa* L.) προσφέρεται σε διάφορες μορφές στο εμπόριο ανάλογα με τον τρόπο επεξεργασίας στον οποίο έχει υποβληθεί (Εικόνα 13). Η καλλιέργεια του σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχεται σε 502.9 εκ. τόνοι (FAO, 2021). Μεταξύ των τρόπων επεξεργασίας του, αναγνωρίζονται το αποφλοιωμένο (ο βαθμός αποφλοιώσης του φθάνει στο 70% και απαιτεί περισσότερο χρόνο μαγειρέματος), το αναποφλοιωτό (περιέχει 100% του φλοιού του) και το πλήρως κατεργασμένο ή άσπρο (πλήρως αποφλοιωμένο με είδη του το γλασέ και parboiled) (Κυρανάς, 2013). Κύριο χαρακτηριστικό του ρυζιού είναι ο υψηλός γλυκαιμικός δείκτης που φέρει και σαν αποτέλεσμα μπορούν επομένως έχει τη δυνατότητα να αυξάνει την γλυκόζη του ορού του αίματος ενώ παράλληλα συντελεί στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη σε άτομα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες του σε τακτική βάση (An, et al., 2016).

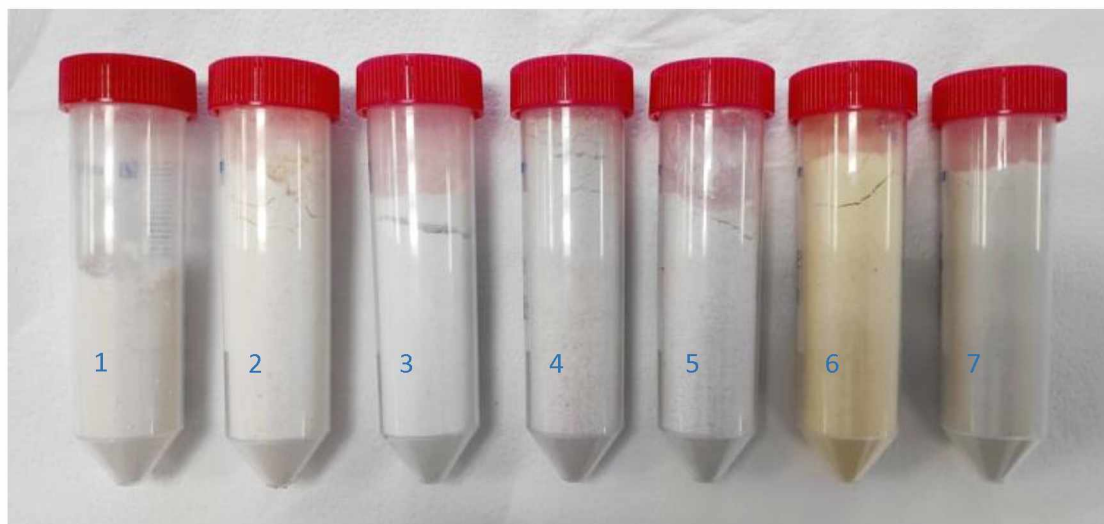
Κύρια φυτοχημικά συστατικά του ρυζιού είναι τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη E (α, β, γ, και δ tocotrienols, tocopherols) και γ -ορυζανόλες (γ -oryzanols) (ferulic acid ester of phytosterols). Περιέχουν επίσης πολυφαινόλες και ανθοκυανίνες, υπεύθυνες για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα. Τέλος, όλα τα φυτοχημικά του συστατικά έχουν μελετηθεί για την δράση τους έναντι του καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και μείωση της οξειδωτικής αλλοίωσης των τροφίμων, αποδεικνύοντας τις διάφορες ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία του ανθρώπου (Min, et al., 2011).

6.2 Επιλογή Δειγμάτων

Τα είδη αλεύρων που μελετήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας προήλθαν από προϊόντα του εμπορίου καθημερινής χρήσης και είναι τα εξής (Εικόνα 14):

1. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (Συστατικά: αλεύρι σίτου κατηγορίας Π, Διογκωτικά: δισόξινο πυροφωσφορικό νάτριο, όξινο ανθρακικό νάτριο).
2. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις χωρίς Γλουτένη (Συστατικά: Άμυλο πατάτας, Άμυλο καλαμποκιού, Αλεύρι καλαμποκιού, Αλεύρι ρυζιού, Πυκνωτικό μέσο: κόμμι γκουάρ (guar gum)).
3. Φαριν απ (Συστατικά: Αλεύρι κατηγορίας Μ από μαλακό σιτάρι, Διογκωτικά αρτοποιίας: όξινο ανθρακικό νάτριο, δισόξινο πυροφωσφορικό νάτριο, δισόξινο φωσφορικό ασβέστιο).
4. Αλεύρι Ολικής Άλεσης (Συστατικά: Αλεύρι μαλακού σίτου ολικής άλεσης, βυνάλευρο κριθαριού, βελτιωτικό αλεύρου: ασκορβικό οξύ E 300, αμυλάση.)
5. Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης (Συστατικά: Αλεύρι ολικής άλεσης από μαλακό σιτάρι, αλάτι, ξηρή μαγιά, Βελτιωτικό αλεύρου: ασκορβικό οξύ)
6. Καλαμποκάλευρο (Συστατικά: Καλαμποκάλευρο 100%)
7. Σιμιγδάλι χονδρό (Συστατικά: Σιμιγδάλι σκληρό σιταριού)

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αριθμημένα Falcon των 50mL και τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος χωρίς υγρασία εντός του εργαστηρίου.



Εικόνα 14. Δείγματα Αλεύρων που μελετήθηκαν στην παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη (1-7).

6.3 Επεξεργασία Δειγμάτων

Αρχικά, για την αποδοτικότερη λήψη δείγματος από τα προϊόντα 4. Αλεύρι ολικής άλεσης, 5. Μείγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης, 6. Καλαμποκάλευρο, 7. Σιμιγδάλι χονδρό, λόγω των μεγαλύτερων κόκκων που έφεραν σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Τα δείγματα αλέσθηκαν σε σφαιρόμυλο Planetary Mono Mill PULVERISETTE 6 classic line, FRITSCH GmbH, μέχρι η τελική τους μορφή να είναι αντίστοιχη των υπολοίπων δειγμάτων (υφή πούδρας). Οι συνθήκες άλεσης ήταν στα 410 rpm για 7' και για τα τέσσερα δείγματα (Εικόνα 15,16).



Εικόνα 15,16. Άλεση δείγματος σε σφαιρόμυλο Planetary Mono Mill PULVERISETTE 6 classic line, FRITSCH GmbH.

6.4 Διαδικασία επεξεργασίας δειγμάτων

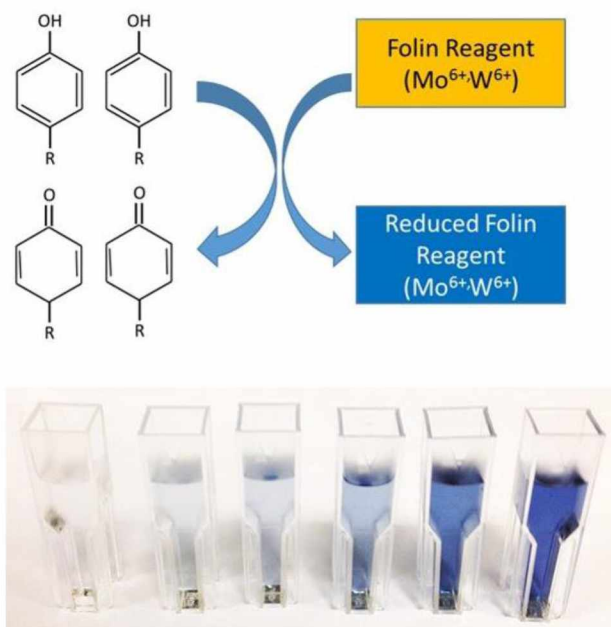
Για την δημιουργία των αλεύρων-δειγμάτων, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια και οι εξής αναλογίες για όλα τα δείγματα.

1. Δημιουργία δειγμάτων αραιώσης 10%w/v με διαλύτη απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου σε αριθμημένα Falcon Centrifuge tubes των 15mL. Ακολούθησε παρατεταμένη ανάδευση (vortex) του κάθε δείγματος για 1' μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή τους.
2. Στην συνέχεια, ακολούθησε λήψη του υπερκείμενου εκχυλίσματος κάθε δείγματος προς μελέτη σε κάθε πειραματικό πρωτόκολλο .
3. Τα δείγματα δεν διατηρούνταν και παρασκευάζονταν νέα κάθε 1 με 2 ημέρες.

7. Μέθοδοι Ανάλυσης των Δειγμάτων

7.1 Συνολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο - Folin Ciocalteu Assay

Για τον προσδιορισμό των ολικών πολυφαινολών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου από τον Blainski και τους συνεργάτες του (Blainski, et al., 2013). Η μέθοδος προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας χρωματογραφικής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μεταξύ του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) και των δειγμάτων προς μελέτη (Singleton, et al., 1999). Αναλυτικότερα, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$) καθώς είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Ως αποτέλεσμα, το παραγόμενο προϊόν της αντίδρασης [(σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W)] αποκτά ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765nm. Φυσικά, η παρουσία του διαλύματος Na_2CO_3 στην αντίδραση έχει διπλό ρόλο, καθώς ρυθμίζει την αλκαλότητα αλλά αποτελεί και την προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων, ενώ δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του διαλύματος που προκύπτει από την αντίδραση (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Διάγραμμα που δείχνει τη αναγωγή του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu που προκαλείται από την οξείδωση των φαινολικών σε ένα δείγμα. (Ford, et al., 2019)

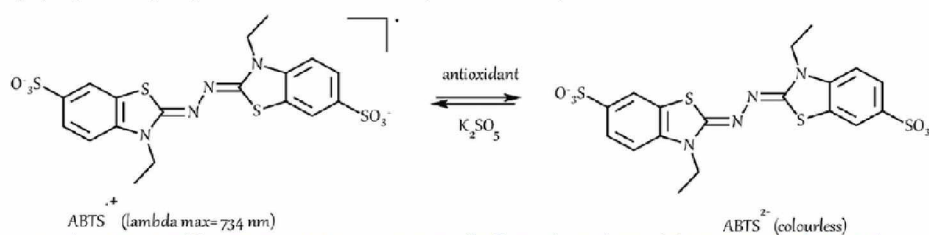
Τα εκχυλίσματα των δειγμάτων εξετάστηκαν στην αρχική τους συγκέντρωση, 10 % w/v. Σε σωληνάκι Eppendorf 2 mL προστέθηκαν, 1 mL απιονισμένου νερού (dH_2O), 0.1 mL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (2M) (Merck, Darmstadt, Germany) και

0.02 mL από το εκχυλισμένο δείγμα. Μετά από 3 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, προστέθηκαν 0.28 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου (NaCO₃) 25%w/v και 0.6 mL απιονισμένου νερού (dH₂O). Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολουθήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 5 λεπτά, συλλογή του υπερκείμενου και μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 765 nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης, και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau (2M), η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων (CTP) εκφρασμένη με mg/L, υπολογίστηκε από καμπύλη βαθμονόμησης (0,05-0,5 mg/mL) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το γαλλικό οξύ. Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και προσδιορίστηκε ως mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE) ανά g ξηρού βάρους (dw).

7.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας ABTS •+ - ABTS Assay

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από τους Cano και τους συνεργάτες του, με μερικές τροποποιήσεις (Cano, et al., 1998), βασιζόμενο στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Συγκεκριμένα, για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, παράχθηκε η ρίζα του ABTS^{•+} μέσω της οξειδωσης του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης της περοξειδάσης (HRP) παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα του ABTS^{•+} που αρχικά έχει φέρει πράσινο χρώμα στο διάλυμα, ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου. Ταυτόχρονα, το διάλυμα αποχρωματίζεται και η οπτική απορρόφηση του μετράται στα 730nm (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Αντίδραση του ABTS •+ με αντιοξειδωτικές ενώσεις (El Rayess, et al., 2014)

Αρχικά σε σωληνάκια Eppendorf 1.5 mL προστέθηκαν 0.4 mL απιονισμένου νερού (dH₂O), 0.5 mL ABTS (1mM), 0.05 mL H₂O₂ (30μM), 0.05 mL HRP (6μM). Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση για 45 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση έγινε η προσθήκη 0.05 mL του κάθε εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και ανάδευση (vortex). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 730nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 730nm χωρίς την παρουσία αντιδραστηρίου HRP (6 μM), η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

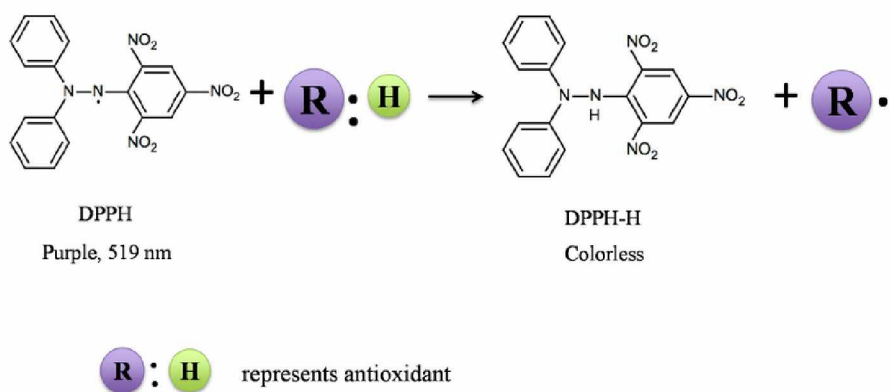
$$\%RSC = \frac{(\text{απορρόφηση Control} - \text{απορρόφηση Εκχυλιζόμενης Ουσίας})}{\text{απορρόφηση Control}} * 100$$

Όπου, RSC εννοείται radical scavenging capacity

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC₅₀, η οποία δηλώνει εκείνη την συγκέντρωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα στο 50%.

7.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας DPPH• – DPPH Assay

Για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες, βασιζόμενη στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) (Brand-Williams, et al., 1995). Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα DPPH• ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e⁻) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη. Χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ο αποχρωματισμός του αρχικού διαλύματος από σκούρο μωβ σε διάφορες αποχρώσεις του μωβ μέχρι και κίτρινο, ανάλογα με τη συγκέντρωση της ουσίας. Η μέθοδος είναι φασματοφωτομετρική επομένως ο αποχρωματισμός συνεπάγεται και μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm (Εικόνα 19) (Veskoukis, et al., 2019).



Εικόνα 19. Η χημική δομή της της ρίζας 1,1 –διφαινυλ-2-πικρυδραζυλ (DPPH) και η χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης που δημιουργείται μετά την παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών. (Liang & Kitts, 2014)

Σε σωλήνα Eppendorf 1.5 mL προστέθηκαν 0.05 mL δείγματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αναμείχθηκαν με 0.9 mL μεθανόλης και 0.05mL DPPH (2mM). Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000rpm για 5 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου για μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης, και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 517nm χωρίς την παρουσία αντιδραστηρίου DPPH (2mM), η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών DPPH εκφράστηκε ως:

$$\%RSC = \frac{(\text{απορρόφηση Control} - \text{απορρόφηση Εκχυλιζόμενης Ουσίας})}{\text{απορρόφηση Control}} * 100$$

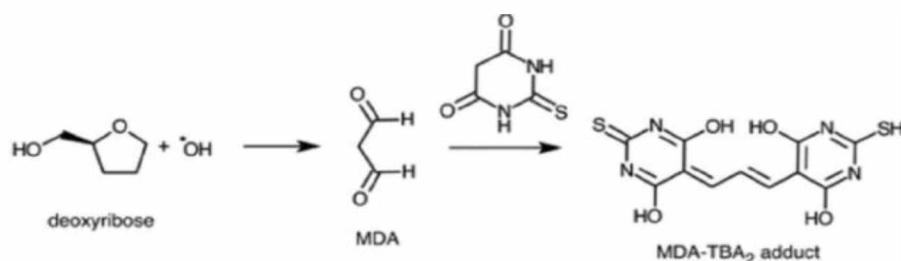
Όπου, RSC εννοείται radical scavenging capacity

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC₅₀, η οποία δηλώνει εκείνη την συγκέντρωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα στο 50%.

7.4 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας υδροξυλίου (•OH) - Hydroxyl Radical Assay

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από τους Keum και τους συνεργάτες του με κάποιες τροποποιήσεις (Keum, et al., 2000), βασισμένο στην ικανότητα απομάκρυνσης ριζών υδροξυλίου (•OH). Η ρίζα υδροξυλίου (•OH) είναι μια εξαιρετικά δραστική ρίζα που με την σύζευξη

της με τα νουκλεοτίδια του DNA, προκαλούν θραύση των δυο κλώνων του. Η επίδραση των δειγμάτων δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της δεοξυριβόζης. Αναλυτικότερα, με την έκθεση της 2-δεοξυριβόζης σε ρίζες υδροξυλίου (παραγόμενες από την αντίδραση Fenton), παρατηρείται η αποικοδόμηση της σε μαλονδιαλδεΐδη (MDA). (Εικόνα 20)



Εικόνα 20. Αρχή του Hydroxyl Radical Protocol με έκθεση της 2-deoxyribose σε ρίζες υδροξυλίου. (Tremil & Šmejkal, 2016)

Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των δειγμάτων. Σε σωλήνα Eppendorf 2 mL προστέθηκαν 0.225 mL Phosphate buffer (0.2M, pH 7.4), 0.075 mL 2-deoxyribose (10mM), 0.075 mL FeSO₄-EDTA (10mM), 0.075 mL H₂O₂ (10mM), 0.225 mL απιονισμένο νερό (dH₂O) και 0.075 mL εκχυλισμένου δείγματος. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση για 60 λεπτά στους 37°C σε κλίβανο και η προσθήκη 0.375 mL TCA (2.8% w/v) και 0.375 mL TBA (1%). Ακολούθησε ανάδευση (vortex) των μειγμάτων, βρασμός για 10 λεπτά με το πέρας των οποίων τοποθετήθηκαν στον πάγο για να κρυώσουν. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 5 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου για μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 520 nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης, και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 520nm χωρίς την παρουσία αντιδραστήριου H₂O₂, η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\%RSC = \frac{(\text{απορρόφηση Control} - \text{απορρόφηση Εκχυλιζόμενης Ουσίας})}{\text{απορρόφηση Control}} * 100$$

Όπου, RSC εννοείται radical scavenging capacity

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC₅₀, η οποία δηλώνει εκείνη την συγκέντρωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα στο 50%.

7.5 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω αναστολής της ρίζας O₂^{•-} - Superoxide Assay

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από τους Gülçin και τους συνεργάτες του με μερικές τροποποιήσεις (Gülçin, et al., 2004), βασιζόμενο στην ικανότητα αναστολής της ρίζας O₂^{•-}. Η ρίζα O₂^{•-} έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί μια σειρά βλαβών στο κύτταρο (αποικοδόμηση των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών), στο γενετικό υλικό DNA (αποικοδόμηση DNA) και στα ένζυμα (απενεργοποίηση) μέχρι και την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Επίσης, έχει συνδεθεί με την υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων ευαίσθητων ουσιών. Από το σύστημα PMS- NADH, με οξειδωση του NADH, δημιουργούνται ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου. Με την παρουσία του NBT²⁺ το διάλυμα αποκτά κίτρινο χρώμα το οποίο με την παρουσία ρίζας O₂^{•-} μετατρέπεται σε μπλε και μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Με την προσθήκη δειγμάτων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αναστέλλεται ο σχηματισμός του μπλε NBT.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των δειγμάτων. Σε σωλήνα Eppendorf 1.5 mL προστέθηκαν 0.05 mL εκχυλισμένο δείγμα, 0.625 mL Tris-HCl buffer (16mM, pH8.0), 0.125 mL Nitroblue tetrazolium (NBT)(300mM, MW=817.7), 0.125 mL NADH (468μM), 0.125 mL Phenazine methosulfate (PMS)(60μM, MW=306.34). Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των διαλυμάτων στα 3000rpm για 5λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου για μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 560nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης, και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 560nm χωρίς την παρουσία αντιδραστηρίου Phenazine methosulfate (PMS)(60μM, MW=306.34), η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\%RSC = \frac{(\text{απορρόφηση Control} - \text{απορρόφηση Εκχυλιζόμενης Ουσίας})}{\text{απορρόφηση Control}} * 100$$

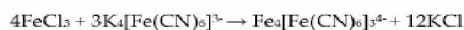
Όπου, RSC εννοείται radical scavenging capacity

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC₅₀, η οποία δηλώνει εκείνη την συγκέντρωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα στο 50%.

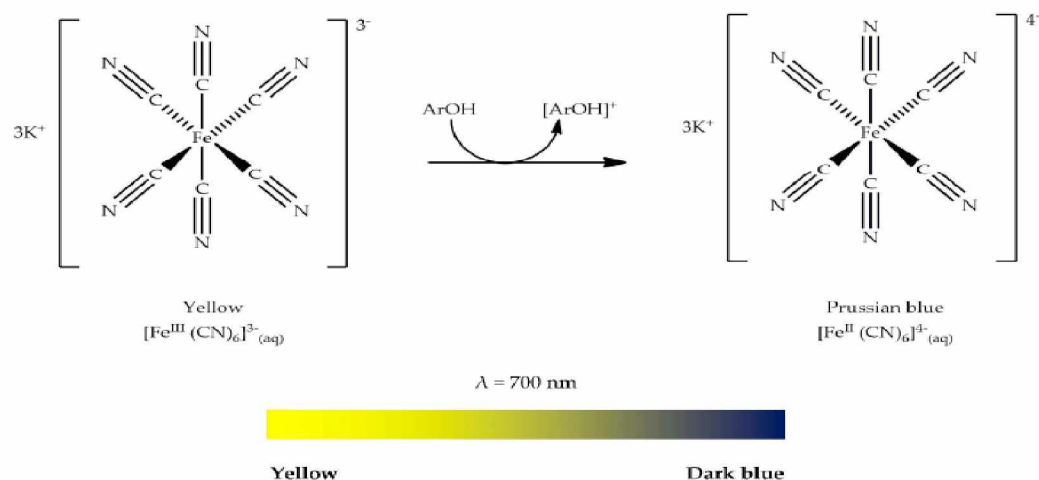
7.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων - Reducing Power Assay

Για την εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων που συνδέεται με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από τους Duh και συνεργάτες με κάποιες παραλλαγές (Duh, 1994). Στη συγκεκριμένη μέθοδο, αποδεικνύεται η αναγωγική δύναμη των ενώσεων των δειγμάτων και παρατηρείται η δράση τους ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Αναλυτικότερα, στα δείγματα που αντιδρούν με τον Fe^{3+} και παρατηρείται αναγωγική ικανότητα, τον ανάγουν σε Fe^{2+} . Ο δισθενής σίδηρος αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο και δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης αντίδρασης παρατηρείται μεταβολή του αρχικού κίτρινου χρώματος σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας, τόσο μεγαλύτερη είναι και η απορρόφηση στα 700nm. (Εικόνα 21)

Chemical reaction:



Mechanism of reaction:



Εικόνα 21. Χημική αντίδραση κατά την αναγωγή του σιδήρου Fe^{3+} σε Fe^{2+} και μεταβολή του χρώματος των διαλυμάτων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Bibi Sadeer, et al., 2020)

Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των δειγμάτων. Σε σωλήνα Eppendorf 1.5 mL προστέθηκαν 0.05mL κάθε δείγματος, 0.2 mL Phosphate buffer (0.2M, pH 6.6), 0.25 mL Potassium ferricyanide (1% w/w). Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση στους 50°C σε θερμοαντιδραστήρα (thermoblock) για 20 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 0.25 mL TCA (Trichloroacetic acid 10%w/v) και φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 10 λεπτά. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, συλλέχθηκε το υπερκείμενο, μεταφέρθηκε σε νέο tube

στο οποίο προστέθηκαν 0.25 mL απιονισμένου νερού (dH₂O) και 0.05 mL Ferric chloride (0.1%w/v). Ακολουθήθηκε περαιτέρω επώαση 10 λεπτών στο σκοτάδι. Για την μέτρηση του διαλύματος, πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 5 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου για μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 700nm ως προς το τυφλό δείγμα. Εξετάστηκε επίσης, και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 700nm χωρίς την παρουσία αντιδραστήριου Potassium ferricyanide (1% w/w), η οποία αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης (αρνητικό control).

Η αναγωγική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$AU_{0,5} = \text{απορρόφηση ουσίας} - \text{απορρόφηση control}$$

Όπου *AU* εννοείται absorbance unit

Η αναγωγική ισχύς του εξεταζόμενου δείγματος εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής *AU* 0,5, όπου η συγκεκριμένη τιμή υποδηλώνει εκείνη τη συγκέντρωση του δείγματος που δίνει απορρόφηση ίση με 0,5 στο φωτόμετρο.

8. Αποτελέσματα

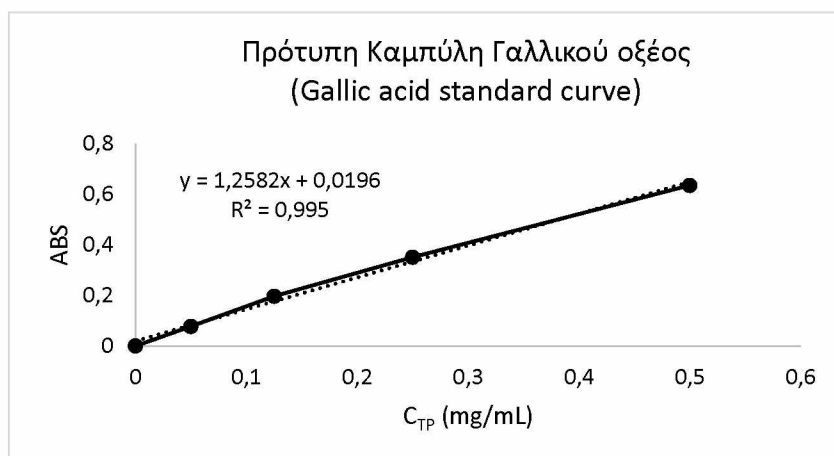
8.1 Αποτελέσματα Πειραματικών Αναλύσεων των Δειγμάτων

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων στην πειραματική μέθοδο του Folin Ciocalteu, έγινε χρήση εξίσωσης από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Οι τιμές εκφράστηκαν σε mg GAE/g.

A. Προσδιορισμός συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου- Folin Ciocalteu Assay

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1) παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε με βάση το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου στα δείγματα (Folin-Ciocalteu Assay). Η πρότυπη καμπύλη έχει συντελεστή γραμμικότητας $R^2 = 0.995$ και ακολουθεί την πρότυπη εξίσωση:

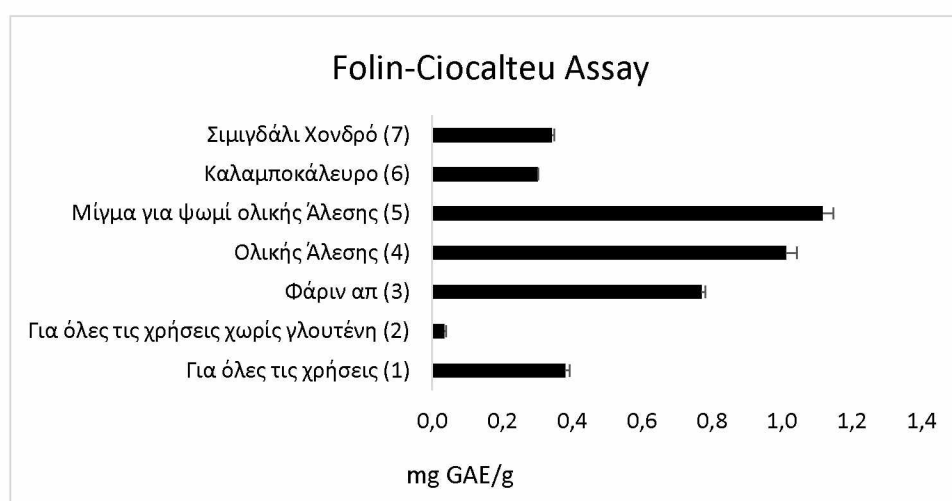
$$y = 1.2582x + 0.0196$$



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη ενός φυσικού αντιοξειδωτικού του γαλλικού οξέος σε συγκέντρωση mg/mL δείγματος.

Τα αποτελέσματα τις μεθόδου εκφράστηκαν μέσω της Πρότυπης Καμπύλης Γαλλικού Οξέος, όπου, y οι τιμές απορρόφησης στα 765nm και όπου x οι τιμές του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του εκάστοτε δείγματος, εκφρασμένες σε mg/mL.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2) καταγράφεται η ολική περιεκτικότητα πολυφαινολών των δειγμάτων. Από το σχήμα 2 διακρίνεται ότι τα δείγματα Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (1.118mg GAE/g) και Αλεύρι Ολικής Άλεσης (1.013mg GAE/g) έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Ακολουθούν τα δείγματα κατά φθίνουσα σειρά: Φαριν απ (0.770mg GAE/g), Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (0.381mg GAE/g), Σιμιγδάλι χονδρό (0.343 mg GAE/g) και Καλαμποκάλευρο (0.302mg GAE/g). Τέλος, το δείγμα Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (0.035mg GAE/g), φέρεται να έχει την μικρότερη με διαφορά περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μεταξύ των δειγμάτων.

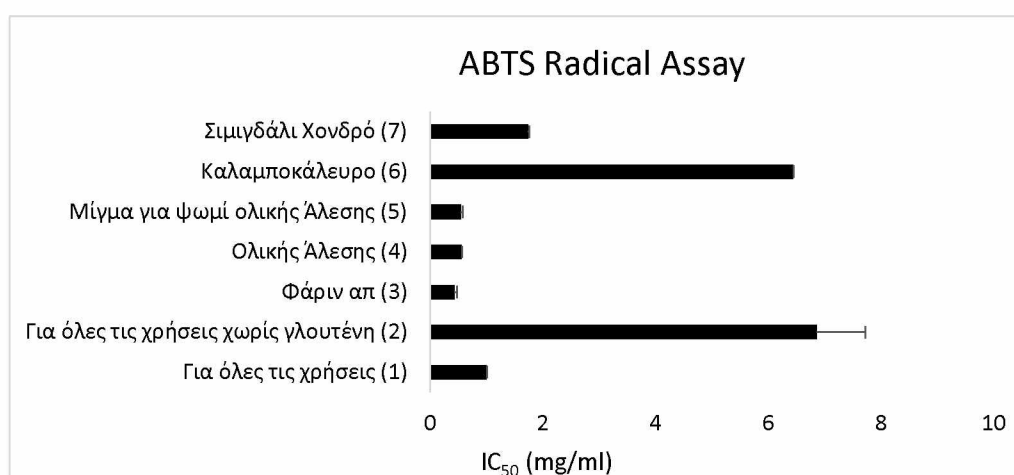


Σχήμα 2. Διάγραμμα αποτελεσμάτων συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg GAE/g. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής \pm τυπικής απόκλισης (SD).

Στις πειραματικές μεθόδους προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH•, ABTS•+, O₂•- και OH•, χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC₅₀ (mg/mL) των δειγμάτων, η οποία δηλώνει εκείνη την συγκέντρωση του εκχυλίσματος που δύναται να αναστέλλει τη εξεταζόμενη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο πιο δραστικό χαρακτηρίζεται και το εξεταζόμενο δείγμα.

B. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας- ABTS Radical Assay

Από το σχήμα 3 διακρίνεται ότι τα δείγματα Φαριν Απ (IC₅₀= 0.440mg/mL), Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC₅₀= 0.553 mg/mL) και Ολικής Άλεσης (IC₅₀= 0.569mg/mL), παρουσιάζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι της ρίζας ABTS•+, αφού είχαν τις μικρότερες τιμές IC₅₀ μεταξύ των δειγμάτων. Ακολουθούν τα δείγματα κατά αύξουσα σειρά: Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC₅₀= 1.005mg/mL) και Σιμιγδάλι χονδρό (IC₅₀= 1.745mg/mL), Καλαμποκάλευρο (IC₅₀= 6.445mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC₅₀= 6.865mg/mL).

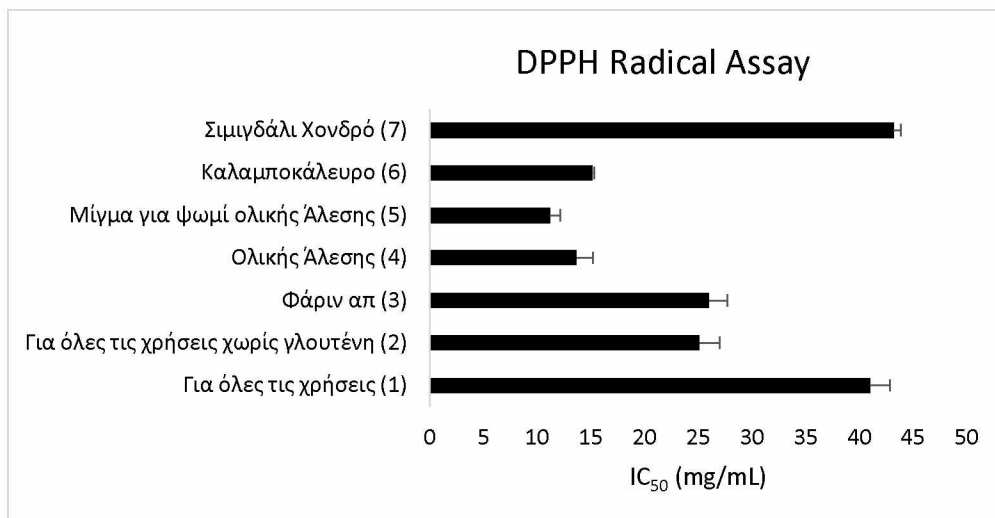


Σχήμα 3. Διάγραμμα αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έναντι της ρίζας ABTS•+. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/mL. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής ± τυπικής απόκλισης (SD).

Γ. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας DPPH•- DPPH Assay

Από το σχήμα 4 διακρίνεται ότι τα δείγματα: Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC₅₀= 11.20mg/mL), Αλεύρι Ολικής Άλεσης (IC₅₀= 13.70mg/mL) και Καλαμποκάλευρο (IC₅₀= 15.17mg/mL), παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές IC₅₀ μεταξύ των δειγμάτων και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι της ρίζας DPPH•. Ακολούθησαν κατά αύξουσα σειρά τα δείγματα: Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC₅₀=25.14mg/mL) και Φαριν απ (IC₅₀= 26.04mg/mL). Ενώ τις υψηλότερες τιμές IC₅₀

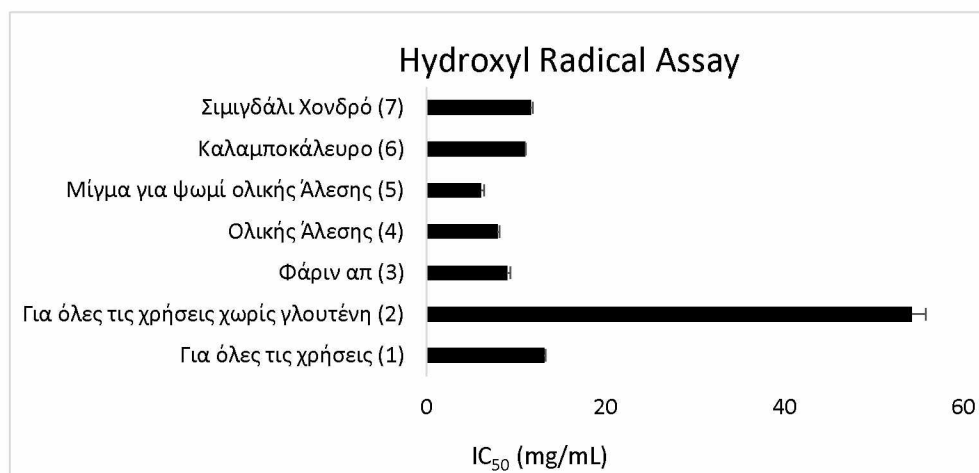
με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα, παρουσίασαν τα δείγματα Αλεύρι για όλες τις χρήσεις ($IC_{50}= 41.04\text{mg/mL}$) και Σιμιγδάλι χονδρό ($IC_{50}= 43.24\text{mg/mL}$).



Σχήμα 4. Διάγραμμα αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έναντι της ρίζας DPPH*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/mL. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής \pm τυπικής απόκλισης (SD).

Δ. Ικανότητα αναστολής δράσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) - Hydroxyl Radical Assay

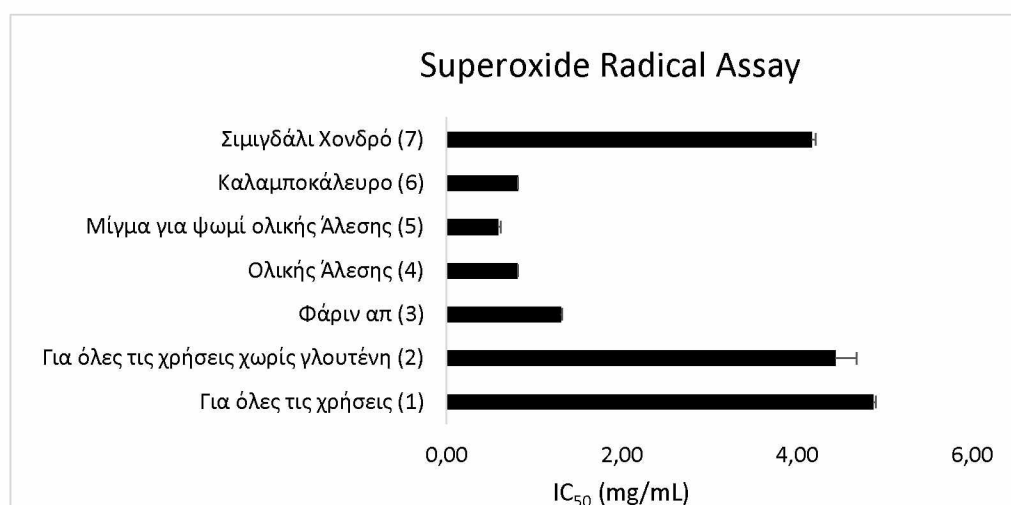
Από το σχήμα 5 διακρίνεται ότι τα δείγματα Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης ($IC_{50}= 6.10 \text{ mg/mL}$), Αλεύρι Ολικής Άλεσης ($IC_{50}= 7.96\text{mg/mL}$) και Φάριν απ ($IC_{50}= 9.01\text{mg/mL}$) παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές IC_{50} μεταξύ των δειγμάτων και συνεπώς έχουν την μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της ρίζας υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Ακολουθούν κατά αύξουσα σειρά τα δείγματα: Καλαμποκάλευρο ($IC_{50}= 11.02\text{mg/mL}$), Σιμιγδάλι χονδρό ($IC_{50}= 11.68\text{mg/mL}$) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις ($IC_{50}= 13.16\text{mg/mL}$). Ενώ το δείγμα Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη ($IC_{50}= 54.28\text{mg/mL}$) παρουσίασε την μεγαλύτερη τιμή μεταξύ των δειγμάτων.



Σχήμα 5. Διάγραμμα ικανότητας απομάκρυνσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/mL. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής \pm τυπικής απόκλισης (SD).

E. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας O₂^{•-} - Superoxide Assay

Από το σχήμα 6 διακρίνεται ότι τα δείγματα Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC₅₀= 0.59 mg/mL) και Αλεύρι Ολικής Άλεσης (IC₅₀= 0.813mg/mL), παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές IC₅₀ μεταξύ των δειγμάτων. Ακολουθούν κατά αύξουσα σειρά τα δείγματα Καλαμποκάλευρο (IC₅₀= 0.815mg/mL) και Φαριν απ (IC₅₀=1.31mg/mL). Ενώ, τα δείγματα Σιμιγδάλι χονδρό (IC₅₀= 4.17mg/mL), Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC₅₀= 4.44mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC₅₀=4.87mg/mL), παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές μεταξύ των δειγμάτων.

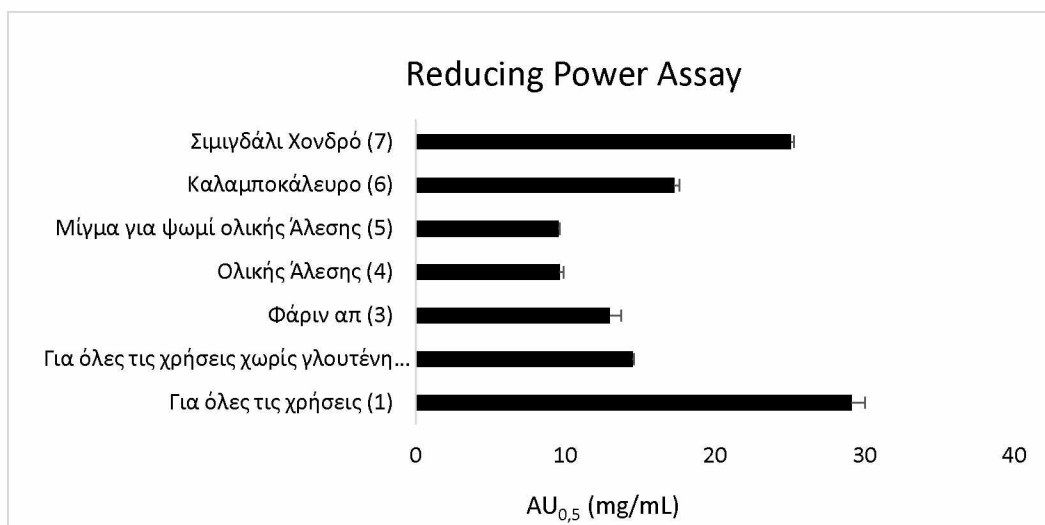


Σχήμα 6. Διάγραμμα αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έναντι της ρίζας O₂^{•-}. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/mL. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής ± τυπικής απόκλισης (SD).

Τέλος, για την εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας (Reducing power) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τιμή AU_{0.5}, που εκφράζει την συγκέντρωση του εκχυλίσματος και αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης 0.5 στα 700 nm. Όσο μικρότερη η τιμή AU_{0.5} τόσο περισσότερο δραστικό είναι το εξεταζόμενο δείγμα.

Z. Εκτίμηση αναγωγικής ικανότητας- Reducing Power Assay

Από το σχήμα 7 διακρίνεται ότι από τα δείγματα με την μικρότερη τιμή AU 0.5 είναι το Αλεύρι Ολικής Άλεσης (AU 0.5= 9.65mg/mL) και το Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης (AU 0.5=9.55mg/mL), με μικρή διαφορά μεταξύ τους. Στην συνέχεια, με λίγο μεγαλύτερες τιμές AU 0.5, κατατάσσονται τα δείγματα Φαριν απ (AU 0.5=13.00mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (AU 0.5=14.53mg/mL). Ενώ οι υψηλότερες τιμές AU 0.5, παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων κατά αύξουσα σειρά: Καλαμποκάλευρο (AU 0.5=17.31mg/mL), Σιμιγδάλι χονδρό (AU 0.5= 25.11mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (AU 0.5=29.15mg/mL).



Σχήμα 7. Διάγραμμα αποτελεσμάτων της αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/mL. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν. Έγινε χρήση της μέσης τιμής ± τυπικής απόκλισης (SD).

9. Συμπεράσματα-Συζήτηση

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Folin-Ciocalteu (mg GAE/g)	ABTS•+ IC ₅₀ (mg/mL)	DPPH• IC ₅₀ (mg/mL)	•OH IC ₅₀ (mg/mL)	O ₂ •- IC ₅₀ (mg/mL)	REDUCING POWER AU _{0.5} (mg/mL)
1.Αλεύρι για όλες τις χρήσεις	0.381±0.012	1.005±0.02	41.04±1.81	13.16±0.13	4.87±0.03	29.15±0.89
2.Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη	0.035±0.004	6.865±0.87	25.14±1.87	54.28±1.53	4.44±0.24	14.53±0.07
3.Φαριν απ	0.770±0.012	0.440±0.04	26.04±1.70	9.01±0.36	1.31±0.01	13.00±0.74
4.Αλεύρι Ολικής Άλεσης	1.013±0.032	0.569±0.00	13.70±1.52	7.96±0.15	0.813±0.01	9.65±0.22
5.Μίγμα ψωμιού Ολικής Άλεσης	1.118±0.030	0.553±0.03	11.20±0.98	6.10±0.31	0.59±0.03	9.55±0.09
6.Καλαμποκάλευρο	0.302±0.001	6.445±0.011	15.17±0.15	11.02±0.07	0.815±0.05	17.31±0.34
7.Σιμιγδάλι χονδρό	0.343±0.006	1.745±0.015	43.24±0.67	11.68±0.19	4.17±0.04	25.11±0.20

Πίνακας 3.Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των δειγμάτων όλων των πειραματικών μεθόδων την παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και ανασταλτική δράση δειγμάτων αλεύρων σε μια σειρά διαφορετικών ελευθέρων ριζών *in vitro*. Τα άλευρα που μελετήθηκαν ήταν τα εξής: 1. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις, 2. Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη, 3.Φαριν απ, 4.Αλεύρι Ολικής Άλεσης, 5.Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης, 6.Καλαμποκάλευρο και 7.Σιμιγδάλι χονδρό. Η επιλογή των συγκεκριμένων δειγμάτων έγινε βάση του κύριου και πιο ενδιαφέροντος χαρακτηριστικού τους, η εύκολη πρόσβαση σε αυτά από τον μέσο καταναλωτή, αλλά και η καθημερινή χρήση τους στην οικιακή μαγειρική και αρτοποιία, καθώς αποτελούν προϊόντα ευρείας κατανάλωσης.

Ακολουθήθηκε συγκριτική μελέτη των 7 αλεύρων σε μορφή υδατικού δείγματος (10%w/v) με μια σειρά 6 πειραματικών πρωτοκόλλων. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, καθώς οι πολυφαινόλες που περιέχονται στα άλευρα είναι

ισχυρά αντιοξειδωτικά και σε συνδυασμό με την δράση των βιταμινών και ενζύμων, λειτουργούν ως αμυντικοί μηχανισμοί κατά του οξειδωτικού στρες λόγω περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Tsao, 2010). Συνεχίζοντας, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH• και ABTS•+. Σύμφωνα με την Santos-Sánchez και τους συνεργάτες της, η αναστολή της ρίζας ABTS•+ από ένα δείγμα με αντιοξειδωτική δράση έχει άμεση συσχέτιση με την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH•, καθώς και οι δύο ρίζες έχουν την ικανότητα να δέχονται ηλεκτρόνια ή/και υδρογόνα από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των δειγμάτων (Santos-Sánchez, et al., 2019). Ακόμη, μέσω των μεθόδων Superoxide και Hydroxyl Radical scavenging activity προσδιορίστηκε η ικανότητα των δειγμάτων να εξουδετερώσουν τις σταθερές και πολύ δραστικές ρίζες O₂⁻ και OH• οι οποίες παράγονται και ενδογενώς. Τέλος, καθορίστηκε η ικανότητά τους να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, δηλαδή ο προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης που διαθέτουν τα δείγματα μέσω του πρωτόκολλου Reducing assay.

Από την μέθοδο Folin Ciocalteu, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα: Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (1.118 mg GAE/g) και Αλεύρι Ολικής Άλεσης (1.013 mg GAE/g), παρουσίασαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μεταξύ των δειγμάτων. Στην συνέχεια, κατά φθίνουσα σειρά ήταν τα δείγματα, Φαριν απ (0.770 mg GAE/g), Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (0.381 mg GAE/g), Σιμιγδάλι χονδρό (0.343 mg GAE/g) και Καλαμποκάλευρο (0.302 mg GAE/g). Ενώ, το δείγμα Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (0.035 mg GAE/g), είχε την μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μεταξύ των δειγμάτων.

Από την μέθοδο DPPH, τα δείγματα που παρουσίασαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν το Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC₅₀= 11.20 mg/mL) και το Αλεύρι Ολικής Άλεσης (IC₅₀= 13.70 mg/mL). Εξίσου δραστικό παρατηρήθηκε ότι είναι και το δείγμα του Καλαμποκάλευρου (IC₅₀= 15.17 mg/mL). Με συγκριτική διαφορά έχοντας χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ήταν τα δείγματα: Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC₅₀=25.14 mg/mL), Φαριν απ (IC₅₀= 26.04 mg/mL), Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC₅₀= 41.04mg/mL) και Σιμιγδάλι χονδρό (IC₅₀= 43.24mg/mL).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της αναστολής δράσης της ρίζας ABTS•+, το δείγμα Φαριν Απ (IC₅₀= 0.440mg/mL) είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα: Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC₅₀= 0.553 mg/mL) και Ολικής Άλεσης (IC₅₀= 0.569 mg/mL). Ο λόγος στον οποίο οφείλεται αυτό το γεγονός, είναι είτε η ποιοτική (και όχι η ποσοτική) σε πολυφαινόλες σύσταση του (Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης: 1.118

mg GAE/g , Ολικής Άλεσης: 1.013 mg GAE/g), είτε η διαφορετική χημική δομή που εμφανίζουν οι συγκεκριμένες ρίζες μεταξύ τους με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι πολυφαινολικές ενώσεις των δειγμάτων. Στην συνέχεια, κατά φθίνουσα σειρά ήταν τα δείγματα: Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC_{50} = 1.005 mg/mL), Σιμιγδάλι χονδρό (IC_{50} = 1.745 mg/mL) και το Καλαμποκάλευρο (IC_{50} = 6.445 mg/mL) με χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, με τη μεγαλύτερη τιμή IC_{50} , παρατηρήθηκε να είναι το Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC_{50} = 6.865mg/mL).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αναστολής της ρίζας υδροξυλίου ($\bullet OH$) τα δείγματα Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης (IC_{50} = 6.10 mg/mL) και Αλεύρι Ολικής Άλεσης (IC_{50} = 7.96 mg/mL) παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές IC_{50} μεταξύ των δειγμάτων άρα ήταν και τα πιο δραστικά. Στην συνέχεια, κατά φθίνουσα σειρά ήταν τα δείγματα: Φαριν απ (IC_{50} = 9.01 mg/mL), Καλαμποκάλευρο (IC_{50} = 11.02 mg/mL), Σιμιγδάλι χονδρό (IC_{50} = 11.68 mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC_{50} = 13.16 mg/mL). Ενώ, το δείγμα Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC_{50} = 54.28 mg/mL) παρουσίασε την μεγαλύτερη τιμή IC_{50} μεταξύ των δειγμάτων και κατέπεκταση την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet OH$), επιβεβαιώνοντας ξανά την χαμηλή αντιοξειδωτική του δράση έναντι ελευθέρων ριζών ως απόρροια του χαμηλού πολυφαινολικού του περιεχομένου (από πρωτόκολλο Folin-Ciocalteu) (Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη: 0.035 mg GAE/g).

Από τη μέθοδο υπολογισμού της ικανότητας αναστολής της ρίζας $O_2^{\bullet-}$, τα δείγματα με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα ήταν το Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης (IC_{50} = 0.59 mg/mL) και το Αλεύρι Ολικής Άλεσης (IC_{50} = 0.813 mg/mL) καθώς παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές IC_{50} μεταξύ τους. Στην συνέχεια, κατά φθίνουσα σειρά ήταν τα δείγματα: Καλαμποκάλευρο (IC_{50} = 0.815 mg/mL) και Φαριν απ (IC_{50} =1.31mg/mL). Τέλος, τα δείγματα Σιμιγδάλι χονδρό (IC_{50} = 4.17 mg/mL), Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (IC_{50} = 4.44 mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (IC_{50} =4.87 mg/mL) παρουσίασαν τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας $O_2^{\bullet-}$, λόγω των υψηλών τιμών IC_{50} τους.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο προσδιορισμού της αναγωγικής ικανότητας (Reducing assay), τα δραστικότερα δείγματα ήταν ανάλογα με τις προηγούμενες μεθόδους και συγκεκριμένα ήταν τα Αλεύρι Ολικής Άλεσης (AU 0.5= 9.65 mg/mL) και Μίγμα για ψωμί Ολικής Άλεσης (AU 0.5=9.55 mg/mL). Με λίγο μεγαλύτερες τιμές AU 0.5, κατατάσσονται τα δείγματα Φαριν απ (AU 0.5=13.00

mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (AU 0.5=14.53 mg/mL) και Καλαμποκάλευρο (AU 0.5=17.31 mg/mL). Τα δείγματα που παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές AU 0.5 ήταν αντίστοιχα με αυτά των υπόλοιπων μεθόδων: Σιμιγδάλι χονδρό (AU 0.5= 25.11 mg/mL) και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις (AU 0.5=29.15mg/mL). Γενικά, το αλεύρι καλαμποκιού που εμπεριέχονταν στα δείγματα και 2, παρατηρήθηκε να φέρει μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη σε σχέση με προϊόντα σιταριού τύπων Σιμιγδαλιού και κατηγορίας Π (δείγματα 7, 1).

Βάση των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων (με εξαίρεση τη μέθοδο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της αναστολής της ρίζας ABTS^{•+}), που εκτελέστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα δείγματα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση βρέθηκαν να είναι το Μίγμα ψωμιού ολικής άλεσης και το Αλεύρι ολικής άλεσης. Τα συγκεκριμένα προϊόντα εμπεριείχαν αλεύρι μαλακού σίτου ολικής άλεσης και ένα συντηρητικό/βελτιωτικό μέσο αλεύρου, το ασκορβικό οξύ (E 300) που θεωρείται ως αντιοξειδωτικό μέσο για την προστασία της οξειδωσης των σουλφυδρυλομάδων (-SH) της γλουτένης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Ωστόσο, εκ της νομοθεσίας δεν μπορεί να χρησιμοποιείται ως κύριο χαρακτηριστικό συστατικό του προϊόντος καθώς εμπίπτει στην Ομάδα I των προσθέτων και η ποσότητα του στο τελικό προϊόν ορίζεται ως την ελάχιστη δυνατή (όση τεχνολογικώς απαραίτητη) (Κυρανάς, 2016). Έτσι, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του Ασκορβικού οξέος πιθανώς να μην επηρέασαν τα δεδομένα της παρούσας μελέτης για το δείγμα 5 και 4 καθώς μπορεί να απορρέουν μονάχα από την αντιοξειδωτική δράση των αλεύρων. Αντίθετα, το δείγμα του Αλευριού ολικής άλεσης, που περιείχε και βυνάλευρο κριθαριού, δεν έδειξε να προσδίδει κάποια μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ή/και αναγωγική ιδιότητα. Γενικά, το αλεύρι ολικής άλεσης έχει καταγραφεί ότι περιέχει συνολικά 70 φαινολικά στοιχεία μεταξύ των οποίων είναι οι κουμαρίνες, τα φαινολικά οξέα, οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, τα σιλιβένια, οι λιγνάνες (Dinelli, et al., 2009). Από τα δείγματα που αποτελούνταν από άλευρα σίτου διαφορετικών τύπων και κατηγοριών μη ολικής άλεσης (δείγματα 1, 3, 7), το δείγμα Φαριν απ παρουσίασε το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο στο πρωτόκολλο του Folin Ciocalteu. Κατ'επέκτασιν, παρουσίασε εξίσου και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ιδιότητα έναντι των ριζών DPPH[•], υδροξυλίου (•OH), σουπεροξειδίου O₂^{•-}, καθώς και μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ μεταξύ των τριών δειγμάτων. Επιπροσθέτως, η αντιοξειδωτική του ικανότητα έναντι της ρίζας ABTS^{•+}, ήταν υψηλότερη σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Όπως προαναφέρθηκε, πιθανά αυτό να οφείλεται είτε στην ποιοτική σύσταση του σε πολυφαινόλες, είτε στη διαφορετική χημική δομή που εμφανίζει η ρίζα του ABTS^{•+} έναντι των υπόλοιπων ελευθέρων ριζών. Γενικά, η τόσο

έντονη αντιοξειδωτική δράση και το πολυφαινολικό περιεχόμενο του δείγματος Φαριν απ, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον βαθμό επεξεργασίας-άλεσης του καθώς, κύριο συστατικό του είναι το αλεύρι σίτου κατηγορίας M (μαλακό).

Σύμφωνα με τους Yu και συνεργάτες, που μελέτησαν το πολυφαινολικό περιεχόμενο αλεύρων σίτου ολικής άλεσης και μη ολικής άλεσης, παρατηρήθηκε μια ισχυρή συσχέτιση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) των αλεύρων σίτου(1.16-1.55 mg FAE/g) ήταν σημαντικά χαμηλότερο αυτού των αλεύρων ολικής άλεσης (2.10-2.35 mg FAE/g) (Yu, et al., 2013). Επιπρόσθετα, οι Liyana-Pathirana και Shahidi, σχετικά με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο αλεύρων σίτου διαφορετικών τύπων και κατηγοριών (αλεύρι ολικής άλεσης, αλεύρι σίτου, σιμιγδάλι), παρατήρησαν ότι από όλα τα δείγματα το σιμιγδάλι είχε το χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (210 ± 11 - 140 ± 13 μg FAE/g άπαχου δείγματος). (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2007). Ακόμη από την ίδια μελέτη, για την ικανότητα δέσμευσης των ριζών DPPH•, αναφέρθηκε ότι το άλευρο ολικής άλεσης (218 ± 1.5 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) παρουσίασε με διαφορά την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και ακολούθησαν τα άλευρα σίτου (100 ± 2.4 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) και τελευταίο το σιμιγδάλι (96 ± 1.6 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος). Η αναγωγική ικανότητα των ίδιων αλεύρων μελετήθηκε εξίσου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Σύμφωνα με τους Liyana-Pathirana και Shahidi το δείγμα με την μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ ήταν το άλευρο ολικής άλεσης (405 ± 14 μmol ισοδύναμα ασκορβικού οξέος /g άπαχου δείγματος). Ενώ, τα άλευρα σίτου (131 ± 12 μmol ισοδύναμα ασκορβικού οξέος /g άπαχου δείγματος) και το σιμιγδάλι (99 ± 4 μmol ισοδύναμα ασκορβικού οξέος /g άπαχου δείγματος), παρουσίασαν μικρότερη αναγωγική δράση. Από την ίδια μελέτη, υπήρξε έντονη συσχέτιση και ως προς την απομάκρυνση των ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), καθώς παρατηρήθηκε ότι το άλευρο ολικής άλεσης (22.5 ± 0.4 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) είχε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των δειγμάτων. Ωστόσο, άξιο σημασίας είναι, ότι το σιμιγδάλι (21.1 ± 0.8 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) παρουσίασε ελάχιστα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι κάποιου τύπου αλεύρων σίτου(18.3 ± 0.3 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος), όπως παρατηρήθηκε το ίδιο και μεταξύ των δειγμάτων Σιμιγδαλιού και Αλευριού για όλες τις χρήσεις στην παρούσα έρευνα. Επιπρόσθετα, για την αντιοξειδωτική δράση των αλεύρων σίτου έναντι της ρίζας του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\cdot-}$, το άλευρο σίτου ολικής άλεσης (249 ± 2 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) αποδείχθηκε αυτό με την υψηλότερη δράση και με μεγάλη διαφορά έναντι των αλεύρων σίτου μη ολικής άλεσης (174 ± 2 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) και του σιμιγδαλιού (149 ± 2 $\mu\text{mol/g}$ άπαχου δείγματος) (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2007). Αυτή η μεγάλη διαφορά ως προς την

αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας του σουπεροξειδίου O₂^{•-}, είχε παρατηρηθεί και μεταξύ των δειγμάτων 5.,4. και των δειγμάτων 3. και 7. Ωστόσο για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων την παρούσας έρευνας για την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι της ρίζας ABTS^{•+}, δεν βρέθηκαν μελέτες που να εξέταζαν ίδια δείγματα αλεύρων, καθιστώντας την παρούσα έρευνα πρωτότυπη στην συγκεκριμένη μέθοδο.

Διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας με αυτές των παραπάνω, οφείλονται κυρίως στο εκχυλιστικό μέσο των δειγμάτων και στην πιθανή επεξεργασία των δειγμάτων (πχ. απομάκρυνση των λιπαρών οξέων των αλεύρων, defatting) με εξάνιο (1:5 w/v)) που παρατηρήθηκε στην έρευνα των Liyana-Pathirana και Shahidi. Στη μελέτη αυτή σαν διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν η αιθανόλη σε διαφορετικές αναλογίες (HCL/95%v/v αιθανόλη 15/85, 80% διάλυμα υδατικής αιθανόλης 1:10 w/v) και μεθανόλη (80%) αντί για απιονισμένου νερού. Επίσης για το πρωτόκολλο του Folin Ciocalteu χρησιμοποιήθηκαν τα ισοδύναμα φερουλικού αντί γαλλικού οξέος. Ενώ, για το πρωτόκολλο του DPPH, έγινε η χρήση ισοδυνάμων Trolox, αντί για χρήση της τιμής IC₅₀. Επιπρόσθετα, γενετικοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και διαφορετικές μέθοδοι επεξεργασίας άλεσης, έχουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση των διαφόρων τύπων αλεύρων.

Τα δείγματα του Καλαμποκάλευρου (0.302 mg GAE/g) και Αλευριού για όλες τις χρήσεις Χωρίς Γλουτένη (0.035 mg GAE/g), παρουσίασαν το μικρότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο μεταξύ των δειγμάτων διαφόρων τύπων αλεύρων σίτου. Σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης της Columba de la Parra και των συνεργατών της, το πολυφαινολικό περιεχόμενο διαφόρων τύπων καλαμποκιού κυμάνθηκε από 243.8 σε 320.1 mg GAE/100 g dw, σαφώς υψηλότερο από τα παρόντα δεδομένα καθώς περιλάμβαναν και τα δεδομένα από τα δεσμευμένα φαινολικά στοιχεία (bound phenolics) λόγω της χρήσης διαφορετικών διαλυτών κατά την εκχύλιση των δειγμάτων (80% μεθανόλη) (De la Parra, et al., 2007). Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το καλαμποκάλευρο (1.100.51-1.268.26 μg/g) ήταν καλύτερη πηγή φαινολικών στοιχείων σε σχέση με το αλεύρι σίτου (705.60 μg/g) σε αντιστοιχία με το πολυφαινολικό περιεχόμενο, κάτι που δε συμπίπτει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ακόμη, από την ίδια μελέτη, για την ικανότητα δέσμευσης των ριζών DPPH[•], αναφέρθηκε ότι το καλαμποκάλευρο (IC₅₀ 0.76-0.83 mg/mL) παρουσίασε σαφώς μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι αλεύρου σίτου (IC₅₀ 2.48±0.39 mg/mL), κάτι που επιβεβαιώθηκε από την παρούσα μελέτη (IC₅₀ καλαμποκάλευρο: 15.17 mg/mL, IC₅₀ 26.04 αλεύρι σίτου mg/mL). Επιπρόσθετα, η αναγωγική δύναμη του καλαμποκάλευρου (AU 0.5 1.62-1.86 mg/mL) αποδείχθηκε μεγαλύτερη από αυτή από το αλεύρι σίτου (AU 0.5 5.12 mg/mL) κάτι που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη

μονάχα με τα δείγματα αλεύρου σίτου 1. και 7. (Καλαμποκάλευρο: AU 0.5 11.02 mg/mL, Σιμιγδάλι χονδρό AU 0.5= 25.11 mg/mL και Αλεύρι για όλες τις χρήσεις AU 0.5=29.15mg/mL) (Nikolić, et al., 2019). Ενώ, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων την παρούσας έρευνας για την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ρίζων ABTS•+, υδροξυλίου (•OH) και σουπεροξειδίου O₂•-, δεν βρέθηκαν μελέτες που να εξετάζαν ίδια δείγματα αλεύρων, καθιστώντας την παρούσα έρευνα πρωτότυπη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ελαφρώς μεγαλύτερη διαφορά ως προς το πολυφαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική δράση σε όλα τα πρωτόκολλα μεταξύ του δείγματος 6. και 2., οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα 6., ως πρώτη ύλη (καλαμποκάλευρο), αποτελεί συστατικό του δείγματος 2. σε σαφώς μικρότερο ποσοστό. Αυτό δείχνει την μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα που έχουν τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος 2. (αλεύρι καλαμποκιού, αλεύρι ρυζιού κ.α.) Επιπλέον, η διαφορά που παρουσιάζουν στην μέτρηση της αναγωγικής του δράσης (Reducing assay), πιθανώς να οφείλεται στις ιδιότητες του αλεύρου ρυζιού που αποτελεί συστατικό του δείγματος 2. Συγκεκριμένα, από άλλη μελέτη φάνηκε ότι το αλεύρι ρυζιού (αιθανολικά εκχυλίσματα 80%) παρουσιάζει (IC₅₀ 13.76±0.04 mg dmb/mL) παρόμοια αναγωγική ικανότητα με το δείγμα Φαριν απ (AU 0.5=13.00 mg/mL) της παρούσας μελέτης, δικαιολογώντας την ελαφρώς μικρότερη αναγωγική δράση του δείγματος Αλευριού Χωρίς Γλουτένη (AU 0.5=14.53 mg/mL) καθώς αποτελεί συστατικό του (Sakač, et al., 2011).

Εν κατακλείδι, τα δείγματα Μίγμα για ψωμί ολικής άλεσης και Αλεύρι ολικής άλεσης, παρουσίασαν το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH•, υδροξυλίου (•OH), αλλά και έντονη αναγωγική ισχύ μεταξύ των δειγμάτων της παρούσας έρευνας, επιβεβαιώνοντας την σημαντικότητα της διατροφικής τους αξίας. Σύμφωνα με τη παρούσα μελέτη αλλά και τη διεθνή βιβλιογραφία, τα σιτηρά ολικής άλεσης είναι πιθανώς πιο ευεργετικά στην διατροφή των καταναλωτών σε σχέση με τα άλευρα σίτου (αλεύρι για όλες τις χρήσεις, Φαριν απ, σιμιγδάλι) ή άλλων πηγών δημητριακών (καλαμπόκι, ρύζι) .

Λόγω της σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτοχημικών συστατικών των σιτηρών, έχει δημιουργηθεί ένα έντονο ενδιαφέρον από την βιομηχανία για την χρήση τους σε προϊόντα της αγοράς. Αναλυτικότερα, τα φυτοχημικά συστατικά που εμπεριέχονται στα σιτηρά, έχουν στρέψει την χρήση των σιτηρών προς την αξιοποίηση τους σε λειτουργικά τρόφιμα (εμπλουτισμένα, ενισχυμένα, με αντικατάσταση η πλήρη αφαίρεση ενός βλαβερού για την υγεία συστατικού, με εμπλουτισμό συστατικών για διατήρηση των πλεονεκτημάτων του κ.α.). Τέτοια

τρόφιμα από τον τομέα της αρτοποιίας μπορεί να είναι ψωμί, κουλούρια, μπισκότα, δημητριακά πρωινού και μπάρες δημητριακών με νέα χαρακτηριστικά αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον σχεδιασμό νέων πρεβιοτικών τροφίμων (novel foods) λόγω της ιδιότητας τους να λειτουργούν ως υποστρώματα ζύμωσης για την ανάπτυξη πρεβιοτικών μικροοργανισμών (Charalampopoulos, et al., 2002). Επιπρόσθετα, το άμυλο και τα παράγωγά του όπως τροποποιημένα άμυλα, δεξτρίνες κ.λπ., μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ναυοτεχνολογία ως υλικά ενθυλάκωσης πρεβιοτικών, ώστε να βελτιωθεί η σταθερότητά, ο χειρισμός και η ενίσχυση της βιωσιμότητας τους (bioavailability) κατά τη διέλευση τους από τον γαστρεντερικό σωλήνα (Sidhu, et al., 2007). Αλλά και για τον εμπλουτισμό άλλων τροφίμων με τα φυτοχημικά στοιχεία τους, είτε άμεσα είτε μέσω τεχνικών μικρο- και νανο-ενθυλάκωσης για τη διασφάλιση της βιοδιαθεσιμότητας (bioavailability) τους κατά την διαδικασία της πέψης (Călinoiu & Vodnar, 2018). Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πρόσθετα στην ζαχαροπλαστική και αρτοποιία, προσδίδοντας καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα (μαλακότητα, ελαστικότητα κλπ.) (Salmenkallio-Marttila, et al., 2004). Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει ένα πρώτο βήμα στην μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των βιοενεργών συστατικών των αλεύρων διαφορετικών σιτηρών και επεξεργασίας, έτσι ώστε, η αξιοποίηση των δεδομένων τους να βελτιώσει τόσο την καθημερινή διατροφή των ανθρώπων, να αποδώσει στην αγορά προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όσο και την χρήση τους στην τεχνολογία και βιομηχανία τροφίμων με σκοπό την ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων.

Βιβλιογραφία

Adom, K. K., Sorrells, M. E. & Liu, R. H., 2003. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Wheat Varieties. *J. Agric. Food Chem*, Volume 51, p. 7825–7834.

An, J. et al., 2016. In vitro potential of phenolic phytochemicals from black rice on starch digestibility and rheological behaviors.. *Journal of Cereal Science*, Volume 70, p. 214–220.

Arshad, M. S. et al., 2017. Wheat Antioxidants, Their Role in Bakery Industry, and Health Perspective.. In: *Wheat Improvement, Management and Utilization*. s.l.:INTECH.

Babbs, C., 1990. Free radicals and the etiology of colon cancer.. *Free Radicic Biol Med*, Volume 8, p. 191–200.

Badr, A. et al., 2000. On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), p. 499–510.

Bahorun, T., Soobrattee, M., Luximon-Ramma, V. & Aruoma, O., 2006. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease.. *Internet J. Med.*, Issue 1, pp. 1-17.

Bardaweel, S. et al., 2018. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body.. *Eurasian J. Med.*, pp. 50(3): 193-201.

Baublis, A., Lu, C., Clydesdale, F. & Decker, E., 2000. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants.. *Journal of the American College of Nutrition*, pp. 308S-11.

Bibi Sadeer, N. et al., 2020. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations.. *Antioxidants*, 9(8), p. 709.

Blainski, A., Lopes, G. & De Mello, J., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L.. *Molecules.*, 18(6), p. 6852–6865.

Borneo, R. & León, A., 2012. Whole grain cereals: functional components and health benefits.. *Food & Function.*, 3(2), pp. 110-9.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.. *LWT - Food Sci Technol*, Volume 28, pp. 25-30.

Buonocore, G., Perrone, S. & Tataranno, M. L., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, Volume 15(Issue 4), pp. 186-190.

- Călinoiu, L. F. & Vodnar, D. C., 2018. Whole Grains and Phenolic Acids: A Review. *Nutrients*, 10(11), p. 1615.
- Camire, M., Kubow, S. & Donnelly, D., 2009. Potatoes and human health.. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Volume 49, p. 823–840.
- Cano, A. et al., 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material.. *Phytochem Anal*, Volume 9, pp. 196-202.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. & Webb, C., 2002. Application of Cereals and Cereal Components in Functional Foods: A Review.. *International J. Food Microbiol.*, 79(1–2), p. 131–141.
- Cheeseman, K. & Slater, T., 1993. An introduction to free radicals chemistry.. *Br Med Bull.*, Volume 49, p. 481–93.
- Cho, S., Qi, L., Fahey, G. & Klurfeld, D., 2013. Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease.. *The American Journal of Clinical Nutrition*, pp. ajcn-067629..
- Cook, A., 2013. *Barley and malt: biology, biochemistry, technology*.. New York: Academic Press.
- Cubero, F. & Nieto, N., 2012. Arachidonic acid stimulates TNF α production in Kupffer cells via a reactive oxygen species-pERK1/2-Egr1-dependent mechanism.. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Volume 303, pp. G228-G39.
- Davies, J. et al., 2017. The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases.. *GeroScience*, 39(5-6), p. 499–550.
- Davies, K., 2016. The Oxygen Paradox, Oxidative Stress, and Ageing. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, Volume 595, pp. 28-32.
- De la Parra, C., Saldivar, S. & Liu, R., 2007. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 55, pp. 4177-4183.
- Dean, R., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.. *Biochemistry Journal*, 32(4), pp. 1-18.
- Dhalla, N., Temsah, R. & Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases.. *J. Hypertens*, Volume 18, pp. 655-73.

Dinelli, G. C. A. S. et al., 2009. Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry.. *Journal of chromatography.*, 1216(43), p. 7229–7240.

Duh, Y. G., 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species.. *J. Agricult. Food Chem.*, Volume 42, pp. 629-632.

Ekström, L., Björck, I. & Östman, E., 2016. An improved course of glycaemia after a bread based breakfast is associated with beneficial effects on acute and semi-acute markers of appetite.. *Food & Function.*, 7(2), p. 1040–7.

El Rayess, Y., Barbar, R., Wilson, E. & Bouajila, J., 2014. Analytical methods for wine polyphenols analysis and for their antioxidant activity evaluation.. In: s.l.:s.n.

FAO, 2021. *FAO*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.fao.org/giews/reports/crop-prospects/en/>
[Πρόσβαση 20 9 2021].

Fardet, A., 2010. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?. *Nutrition Research Reviews*, Volume 23, p. 65–134.

Fardet, A., Rock, E. & Remesy, C., 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?. *J Cereal Sci*, Volume 48, p. 258–276.

Fletcher, L. & Hudson, H., 2008. Impulsive phase flare energy transport by large-scale Alfvén waves and the electron acceleration problem.. *Astrophys J.*, Volume 675, p. 1645.

Frølich, W., Åman, P. & Tetens, I., 2013. Whole grain foods and health—A Scandinavian perspective.. *Food Nutr. Res.*, Issue 57.

Gani, A., Wani, S., Masoodi, F. & Hameed, G., 2012. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review..

Gerschman, R. et al., 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common.. *Science (New York, N.Y.)*, 119(3097), p. 623–626.

Graf, E., Empson, K. & Eaton, J., 1987. Phytic acid. A natural antioxidant.. *J Biol Chem*, Volume 262, p. 11647–11650.

Gülçin, I., Küfreviöglu, O., Oktay, M. & Büyükkuroglu, M., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.).. *J.Ethnopharmacol.*, Volume 90, pp. 205-215.

Halliwell, B., 1995. How to characterize an antioxidant: an update.. *Biochemical Society symposium*, Issue 61, p. 73–101.

Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress.. *Biochem Soc Trans.*, 35(5), pp. 1147-1150.

Halliwell, B. & Gutteridge, J., 2007. *Free radicals in biology and medicine*.. 4th ed. s.l.:Oxford, UK: Clarendon Press.

Idehen, E., Tang, Y. & Sang, S., 2017. Bioactive phytochemicals in barley. *Journal of food and drug analysis*, Volume 25, pp. 148-161.

Inoue, M. et al., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life.. *Curr Med Chem.*, 10(23), pp. 2495-2505(11).

Izyumov, D. S. et al., 2010. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants—the “Skulachev-ion” derivatives.. *Biochemistry (Mosc)*, Volume 75, pp. 123-9.

Keum, Y. S. et al., 2000. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng.. *Cancer letters*, 150(1), p. 41–48.

Krause, K. & Bedard, K., 2008. NOX enzymes in immuno-inflammatory pathologies.. *Semin Immunopathol*, Volume 30, p. 193–194.

Lasségue, B., San Martin, A. & Griendling, K., 2012. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system.. *Circ Res.*, Volume 110, pp. 1364-90.

Liang, N. & Kitts, D., 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action.. *Molecules*, Issue 19, pp. 19180-19208.

Liou, G. Y. & Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer.. *Free radical research*, 44(5), p. 479–496.

Liu, Y., He, Z., Appels, R. & Xia, X., 2012. Functional markers in wheat: current status and future prospects.. *Theoretical and Applied Genetics.*, Volume 1, pp. 1-10.

Liyana-Pathirana, C. M. & Shahidi, F., 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chemistry*, Volume 3, pp. 1151-1157.

Lobo, V., Patil, A., Phatak & Chandra, N., 2010. Free Radicals antioxidants and functional foods: Impact on human health.. *Pharmacogen Rev.*, Volume 8, pp. 118-126.

Malik, A., 2012. Governing grain protein concentration and composition in wheat and barley: use of genetic and environmental factors. *Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences- Doctoral thesis*, Volume 55, pp. 1652-6880.

Mattila, P., Pihlava, M. & Hellström, J., 2005. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 53, pp. 8290-8295.

McCord, J. M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress.. *The American journal of medicine.*, 108(8), p. 652–659.

Miller, D., Buettner, G. & Aust, S., 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions.. *Free Radic Biol Med.*, Volume 8, pp. 95-108.

Miller, G., 2001. Whole grain, fiber and antioxidants.. In: G. Spiller, ed. *Handbook of Dietary Fiber*. s.l.:Boca Raton, FL: CRC Press, p. 453–460.

Min, B., McClung, A. M. & Chen, M.-H., 2011. Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color.. *Journal of food science*, 76(1), p. 117–126.

Monro, J., 2002. Faecal bulking efficacy of Australasian breakfast cereals.. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.*, 11(3), p. 176–85.

Nakamura, H., Nakamura, K. & Yodai, J., 1997. Redox regulation of cellular activation.. *Annual Review of Immunology.*, Issue 15, pp. 351-369..

Nayak, B., Liu, R. & Tang, J., 2015. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review.. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Issue 55, p. 887–918.

Nikolić, N. et al., 2019. A comparison between wheat and different kinds of corn flour based on minerals, free phenolic acid composition and antioxidant activity. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(4), pp. 341-349.

Nimse, S. & Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms.. *RSC Advances*, 35(5), p. 27986.

Okarter, N., Liu, C., Sorrells, M. & L. R., 2010. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat.. *Food Chemistry.*, 119(1), p. 249–57.

Pacher, P., Beckman, J. & Liudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.. *Physiol. Rev.*, Issue 87, pp. 315-424.

Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), pp. 89-96.

Pozzo, L. et al., 2015. The effects of fermented wheat powder (Lisosan G) on the blood lipids and oxidative status of healthy rabbits.. *Food and Chemical Toxicology*, Issue 84, p. 1–7.

Qin, B. et al., 2006. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiology of Aging*, 27(11), pp. 1577-1587.

Ragaei, S., Abdel-Aal, E.-S. & Noaman, M., 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use.. *Food Chemistry*, Volume 98, pp. 32-38.

Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), pp. 981-990.

Rice-Evans, C., 1995. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes.. In: *Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction*.. s.l.:London: Portland Press, pp. 1-32.

Rosa, L. et al., 2016. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer – a review.. *Journal of Nutrition and Food Science*, Volume 6, pp. 2-7.

Ru, W. et al., 2019. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Potato Cultivars with White, Yellow, Red and Purple Flesh.. *Antioxidants*, 8(10), p. 419.

Sakač, M., Torbica, A., Sedej, I. & Hadnađev, M., 2011. Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours.. *Food Research International*, Volume 9, pp. 2806-2813.

Salmenkallio-Marttila, M., Roininen, K., Autio, K. & Lahteenmaki, L., 2004. Effects of Gluten and Transglutaminase on Microstructure, Sensory Characteristics and Instrumental Texture of Oat Bread.. *Agricultural and Food Science*, 13(1-2), p. 138–150.

Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. & Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism.. In: E. Shalaby, ed. *Antioxidants*. s.l.:IntechOpen.

Schroeder, N., Gallaher, D., Arndt, E. & Marquart, L., 2009. Influence of whole grain barley, whole grain wheat, and refined rice-based foods on short-term satiety and energy intake.. *Appetite*, 53(3), p. 363–9.

Schunemann, C. & Treu, G., 1988. *BAKING THE ART AND THE SCIENCE*. Canada: Baker Tech Inc.

Seal, C. J., Nugent, A. P., Tee, E.-S. & Thielecke, F., 2016. Whole-grain dietary recommendations: the need for a unified global approach. *British Journal of Nutrition*, Issue 115, p. 2031–2038.

Sidhu, J. S., Kabir, Y. & Huffman, F. G., 2007. Functional Foods from Cereal Grains.. *International Journal of Food Properties*, 10(2), pp. 31-244.

Sies, H. & Jones, D., 2007. Oxidative stress.. In: *Encyclopedia of Stress*.. 2nd ed. s.l.:George Fink, Academic Press, pp. 45-48.

Singleton, V., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.. *Methods in Enzymology*, Volume 299, p. 152–178.

Slavin, J., 2004. Whole grains and human health.. *Nutrition Research Reviews*, Issue 17.

Spiller, G., 2002. Whole grains, whole wheat, and white flours in history.. In: J. S. a. R. F. L Marquart, ed. *Whole-Grain Foods in Health and Disease*. s.l.:Eagan Press., p. 1–7.

Suliburska, J. et al., 2014. The effects of L-arginine, alone and combined with vitamin C, on mineral status in relation to its anti-diabetic, anti-inflammatory, and antioxidant properties in male rats on a high-fat diet.. *Biological Trace Element Research*., 157(1), p. 67–74.

Swallah, M. S. et al., 2020. The Impact of Polyphenol on General Nutrient Metabolism in the Monogastric Gastrointestinal Tract.. *Journal of Food Quality*.

Thannickal, V. J., 2009. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*., Volume 40(Issue 5), pp. 507-510.

Trembl, J. & Šmejkal, K., 2016. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals.. *Food Science and Food Safety*, 15(4), pp. 720-738.

Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*., 2(12), p. 1231–1246.

Van Hung, P., 2016. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity.. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 56, pp. 25-35.

Vaya, J. & Aviram, M., 2001. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications.. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1(1).

Veskoukis, A. et al., 2019. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, pp. 99-109.

Young, I. S. & Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease.. *Journal of clinical pathology*, 54(3), p. 176–186.

Yu, L., Nanguet, A. L. & Beta, T., 2013. Comparison of Antioxidant Properties of Refined and Whole Wheat Flour and Bread.. *Antioxidants*, 2(4), p. 370–383.

Κ.Τ.Π., 2021. ΑΑΔΕ - Ανεξάρτητη Αρχή Δημόσιων Εσόδων. [Ηλεκτρονικό] Available at: <https://www.aade.gr/polites/ypiresies-himeioy/trofima-ylika-se-epafi-me-trofima/himeio/kodikas-trofimon-kai-poton>

[Πρόσβαση Αύγουστος 2021].

Κυρανάς, Ε., 2016. *Πρόσθετα Τροφίμων και Νομοθεσία..* Έκδοση 2η επιμ. σ.λ.:Εκδόσεις Τζιόλα.

Κυρανάς, Ε. Ρ., 2013. *Τρόφιμα: Σύσταση, Προέλευση, Αλλοιώσεις, Επεξεργασία και Συσκευασία.* Αθήνα: Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ.

Μποσδίκος, Δ., 2005. *Από το σιτάρι στο ψωμί: τεχνολογία αρτοποιήσης.* Αθήνα: Ειδικές Εκδόσεις Κορμος.