



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ  
& ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες  
του όξινου ορού γιαουρτιού**

**Αντωνία Γ. Βαγγέλη**

Επιβλέπων καθηγητής:

Θεοδώρου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες  
του όξινου ορού γιαουρτιού

“Antioxidant and antimicrobial properties  
of yoghurt acid whey”

**Αντωνία Γ. Βαγγέλη**

Εξεταστική Επιτροπή:

Θεοδώρου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Μοάτσου Γκόλφω, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μοσχοπούλου Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες του όξινου ορού γιαουρτιού

ΔΠΜΣ Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος & Γαλακτοκομικών Προϊόντων  
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

### Περίληψη

Το στραγγιστό γιαούρτι είναι ένα θρεπτικό γαλακτοκομικό προϊόν με ευρεία κατανάλωση στον κόσμο. Κατά τη στράγγιση του γιαουρτιού, παράγεται σε μεγάλες ποσότητες ένα παραπροϊόν γνωστό και ως όξινος ορός γιαουρτιού, το οποίο απορρίπτεται από τις γαλακτοβιομηχανίες επηρεάζοντας αρνητικά το περιβάλλον ως περιβαλλοντολογικός ρύπος. Η ταχύτατη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και η κλιματική αλλαγή σε συνδυασμό με την εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας οδήγησε στην έρευνα για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων συμπεριλαμβανομένου του όξινου ορού γιαουρτιού, σε νέους τρόπους για την παραγωγή θρεπτικών και βιολειτουργικών τροφίμων με ποικίλες πλέον εφαρμογές.

Η διατριβή χωρίστηκε σε δύο ενότητες, η πρώτη αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα και η δεύτερη την αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού. Για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους συλλέχθηκαν αρχικά από διάφορες βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων όξινοι οροί γιαούρτης από αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο και αιγοπρόβειο γάλα. Ακολουθήθηκε λυοφιλίωση των δειγμάτων και *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και στη συνέχεια χρήση μεμβρανών διήθησης για διαχωρισμό των πεπτιδίων άνω και κάτω των 3 kDa. Έπειτα πραγματοποιήθηκε δοκιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας έναντι ριζών οξυγόνου με τη μέθοδο ORAC σε δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού λυοφιλοποιημένα, μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και σε δείγματα με μοριακό βάρος πεπτιδίων <3kDa. Επιπλέον για την επίδραση του όξινου ορού γιαουρτιού στο αντιοξειδωτικό σύστημα σε κυτταρικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη μονοκύτταρη καρκινική κυτταρική σειρά THP-1, η οποία καλλιεργήθηκε και διαφοροποιήθηκε σε μακροφάγα με PMA. Στη συνέχεια προκλήθηκε φλεγμονή των κυττάρων με LPS και έκθεση αυτών με τα δείγματα των όξινων ορών γιαουρτιού όπου και αξιολογήθηκε η έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων HMOX1, NRF2, CAT και SOD με την μέθοδο RT-qPCR.

Στην ενότητα που αφορά την αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού πραγματοποιήθηκαν δοκιμές του λυοφιλοποιημένου όξινου ορού πριν και μετά την *in vitro* πέψη μέσω της παρουσίας της σε καλλιέργειες δυνητικά παθογόνων και μη παθογόνων μικροοργανισμών του γαστρικού σωλήνα, τα οποία ανευρίσκονται στο παχύ έντερο των μονογαστρικών (άνθρωπος, χοίρος, όρνιθα). Ο έλεγχος πραγματοποιείται αρχικά με την μέθοδο έγχυσης των δειγμάτων σε βοθρία σε τρυβλία Pietri και έλεγχος της διάγασης για πιθανή παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τον όξινο ορό γιαουρτιού. Και σε δεύτερο χρόνο πραγματοποιείται ο έλεγχος της πιθανής μείωσης της ανάπτυξής τους σε πιάτα 96 βοθρίων με καταγραφή της οπτικής πυκνότητας.

Τα αποτελέσματα της έρευνας ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού, έδειξαν πως για το γονίδιο CAT που είναι υπεύθυνο για την εξουδετέρωση των ROS, οι όξινοι οροί που προέρχονται από αγελαδινό, αίγιο και αιγοπρόβειο γάλα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα, με χαμηλότερη σχετική έκφραση του γονιδίου, σε αντίθεση με το πρόβειο γάλα. Φαίνεται, ότι ο όξινος ορός γιαουρτιού έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες οι οποίες εντοπίζονται στο κλάσμα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa με ποσοστό 79,39% έως 92,29%, με τα δείγματα του όξινου ορού

γιαουρτιού από αιγοπρόβειο γάλα να εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με το αγελαδινό και αίγιο γάλα. Επιπλέον, στο κλάσμα των πεπτιδίων αυτών τα δείγματα που συλλέχθηκαν τους καλοκαιρινούς μήνες εμφάνισαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες του χρόνου. Για την αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού στα λυοφιλοποιημένα δείγματα πριν την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον ωφέλιμο μικροοργανισμό *Lactobacillus plantarum* ως προς το εμβόλιο, με τα δείγματα όξινου ορού από πρόβειο και αιγοπρόβειο γάλα να παρουσιάζουν υψηλότερη οπτική πυκνότητα.

Φαίνεται ότι ο όξινος ορός που προέρχεται από γιαούρτι παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, με το υψηλότερο ποσοστό να εμφανίζεται στα πεπτίδια με μοριακό βάρος <3kDa. Επιπλέον, ως προς την αντιμικροβιακή ικανότητα δεν παρουσιάζεται κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα όσον αφορά τους όξινους ορούς πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, εκτός από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα όξινου ορού από τα οποία φαίνεται να ευνοείται η ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum*. Ο όξινος ορός γιαουρτιού, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής λόγω της παρουσίας βιοενεργών πεπτιδίων μπορεί να αξιοποιηθεί στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών ως πρόσθετο για την διατηρησιμότητα των τροφών και ως συμπλήρωμα διατροφής για την ενίσχυση της υγείας του καταναλωτή.

**Επιστημονική περιοχή:** Γαλακτοκομικά προϊόντα

**Λέξεις κλειδιά:** αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιμικροβιακή ικανότητα, όξινος ορός γιαουρτιού, βιοενεργά πεπτίδια

## **Antioxidant and antimicrobial properties of yoghurt acid whey**

*MSc Integrated Management of Milk Production & Milk Products*

*Department of Animal Production*

*Department of Food Science & Human Nutrition*

### **Abstract**

Strained yoghurt is a nutritious dairy product with widespread consumption in the world. During the straining of yoghurt, a by-product known as yoghurt acid whey is produced in large quantities, which is discarded by the dairy industries, negatively affecting environment as an environmental pollutant. However, the rapid growth in the world's population and climate change combined with the development of science and technology has led to research on the utilization of by-products, among them yoghurt acid whey, in new ways to produce nutritious and bio-functional foods, with a variety of applications.

The dissertation was divided into two sections, the first concerning the antioxidant capacity and the second the antimicrobial capacity of acid whey of yoghurt. In order to carry out the experimental part, yoghurt acid whey from cow's, sheep's, goat's and mix of goat's and sheep's milk were initially collected from various dairy industries. This was followed by lyophilization of the samples and in vitro simulation of gastrointestinal digestion followed by the use of filtration membranes to separate the peptides above and below 3kDa. The antioxidant capacity against oxygen radicals was then tested by the ORAC method on the lyophilized samples of yoghurt acid whey, after in vitro simulation of gastrointestinal digestion and on samples with a molecular weight of peptides <3kDa. In addition, for the effect of acid whey of yoghurt on the antioxidant system at the cellular level, human monocytic cancer cell line THP-1 was used, which was cultured and differentiated into macrophages with PMA. Subsequently, the cells were stimulated with LPS and exposed to the samples of yoghurt acid whey, where the expression of the antioxidant genes HMOX1 NRF2, CAT and SOD was evaluated by the RT-qPCR method.

Antimicrobial capacity of yoghurt acid whey was assessed for samples before and after in vitro digestion through their presence in cultures of potentially pathogenic and non-pathogenic microorganisms of the intestinal tract found in the large intestine of monogastrics (human, pig, chicken). This was initially done by the method of injecting the samples into wells in Petri plates and checking the clarity for possible inhibition of the growth of microorganism by the acid whey of yoghurt. Subsequently the antimicrobial properties of yoghurt acid whey were tested by a growth inhibition assay through optical density measurements.

The results on the antioxidant capacity of yoghurt acid whey, showed that for the CAT gene responsible for neutralizing ROS, yoghurt acid whey derived from cow's, goat's and mix of goat's and sheep's milk have a statistically significant difference with the control, with lower relative gene expression, in contrast to sheep's milk. It also appears that the acid whey of yoghurt has significant antioxidant capacities which are predominantly found in the fraction of peptides with a molecular weight <3kDa corresponding to a percentage of 79,39% to 92,29%, with samples of yoghurt acid whey from mix of goat's and sheep's milk showing the highest antioxidant capacity compared to cow's and goat's milk. Furthermore, in the fraction of these peptides the samples collected during the summer months showed higher antioxidant capacity compared to the winter months of the year. For the antimicrobial capacity of acid whey of yoghurt in the lyophilized samples before in vitro simulation of gastrointestinal digestion, a statistically significant difference was observed in the beneficial microorganism

*Lactobacillus plantarum* in relation to the inoculum, with the acid whey samples from sheep's and mix of goat's and sheep's milk showing a higher optical density.

It looks that yoghurt acid whey exhibits antioxidant capacity after in vitro simulation of gastrointestinal digestion, with the highest percentage occurring in peptides with a molecular weight <3kDa. Furthermore, in terms of antimicrobial activity, no significant effect is evident for yoghurt acid whey before and after in vitro simulation of gastrointestinal digestion except for the lyophilized yoghurt acid whey which positively affects the growth of *Lactobacillus plantarum*. According to experimental results of the dissertation yoghurt acid whey due to the presence of bioactive peptides can be used in the food and animal food industry as an additive for food durability and as a dietary supplement to enhance consumer health.

**Scientific area:** Dairy products

**Key words:** antioxidant capacity, antimicrobial capacity, acid whey of yoghurt, bioactive peptides

## **Δήλωση έργου**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Βαγγέλη Αντωνία δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν οποιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο Πανεπιστήμιο ή Εκπαιδευτικό Ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

ΒΑΓΓΕΛΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

10 Φεβρουαρίου 2023

## **Ευχαριστίες**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύνολο των Ακαδημαϊκών που συμμετείχαν στο διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών για τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Θεοδώρου Γεώργιο για την ανάθεση του θέματος και την πολύτιμη καθοδήγησή και συμβολή του για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα Νταλάκα Ελένη για την καθοριστική βοήθειά της σε όλο το πειραματικό μέρος και όχι μόνο, της διπλωματικής εργασίας. Για την διαρκή καθοδήγηση, τις συμβουλές, τις γνώσεις και εμπειρίες που μου προσέφερε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια Διδάκτορα Γκερέκου Μαρία για την βοήθειά της, τις γνώσεις και τις εμπειρίες που απέκτησα στην εκπόνηση του δεύτερου πειραματικού μέρους της διατριβής.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τον στενό μου κύκλο που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν όλα τα χρόνια των φοιτητικών μου σπουδών.



# Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	3
Κατάλογος πινάκων .....	11
Κατάλογος διαγραμμάτων .....	12
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> .....	13
Εισαγωγή.....	13
1.1 Γάλα και στραγγιστό γιαούρτι .....	14
1.1.1 Σύνθεση του γάλακτος.....	14
1.1.2 Ορισμός γάλακτος και στραγγιστού γιαουρτιού .....	15
1.2 Βασικά στάδια παρασκευής γιαουρτιού.....	17
1.2.1 Παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού .....	19
1.3 Όξινος ορός γιαουρτιού .....	20
1.4 Επίδραση του όξινου ορού στο περιβάλλον .....	22
1.5 Διατροφικές εφαρμογές ορού γαλακτοκομικών προϊόντων .....	23
1.6 Γαλακτοκομικά προϊόντα και υγεία.....	24
1.6.1 Βιοενεργά πεπτίδια .....	24
1.7 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	25
1.8 Γιαούρτι και οφέλη στην υγεία .....	27
1.9 Σύνθεση όξινου ορού γιαουρτιού .....	28
1.9.1 Πρωτεϊνικό περιεχόμενο του όξινου ορού .....	28
1.9.2 Λακτόζη .....	32
1.9.3 Άλατα .....	33
1.9.4 Λίπος όξινου ορού γάλακτος.....	34
1.9.5 Οργανικά οξέα .....	34
1.9.6 Αντιοξειδωτικά ένζυμα του ορού γάλακτος .....	35
1.10 Αντιοξειδωτική δράση .....	36
1.10.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων .....	36
και μηχανισμός δράσης .....	36
1.10.2 Αντιοξειδωτικά συστατικά.....	36
1.10.3 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού του γάλακτος .....	37
1.11 Αντιμικροβιακή δράση συστατικών του γάλακτος .....	39
1.11.1 Αντιμικροβιακές ουσίες.....	40
1.11.2 Πρωτεΐνες του όξινου ορού με αντιμικροβιακή δράση .....	40
1.11.3 Ένζυμα όξινου ορού με αντιμικροβιακή δράση .....	42
1.11.4 Οργανικά οξέα με αντιμικροβιακή δράση.....	44

1.12 Πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση.....	44
1.12.1 Βιοενεργά πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση .....	45
Σκοπός.....	47
Κεφάλαιο 2° .....	49
2.1 Συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων.....	49
2.1.1 Στατική <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των δειγμάτων ....	50
όξινου ορού γιαουρτιού. ....	50
2.1.2 Φιλτράρισμα δειγμάτων.....	56
2.2 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών οξυγόνου με την μέθοδο .....	56
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). ....	56
2.2.1 Δοκιμασία ORAC .....	57
2.3 Γονιδιακή έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων THP-1 κυττάρων ύστερα .....	59
από έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού.....	59
2.3.1 Κυτταρική σειρά.....	59
2.3.2 Καλλιέργεια κυττάρων .....	60
2.3.3 Έλεγχος της βιωσιμότητας και της πυκνότητας των κυττάρων .....	62
2.3.4 Διαφοροποίηση των THP-1 μονοκύτταρων σε μακροφάγα .....	63
2.3.5 Διέγερση κυττάρων με LPS.....	64
2.3.6 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT .....	64
2.4 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας .....	66
2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	66
2.4.2 DNase Treatment- καθαρισμός ολικού RNA με DNase I.....	70
2.4.3 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής– Δημιουργία cDNA.....	72
2.4.4 Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR) .....	74
2.5 Αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού.....	81
2.6 Έλεγχος της αντιμικροβιακής ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού .....	83
μέσω της μεθόδου έγχυσης σε τρυβλία με άγαρ .....	83
2.7 Έλεγχος πιθανής μείωσης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.....	84
σε plate 96 wells.....	84
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	86
Κεφάλαιο 3° .....	87
Αποτελέσματα.....	87
3.1 Αποτελέσματα ORAC .....	87
3.2 Αποτελέσματα Real Time PCR της THP-1 κυτταρικής σειράς.....	89
3.3 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής ικανότητας.....	91

<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup></b> .....	93
<b>Συζήτηση</b> .....	93
<b>Συμπεράσματα</b> .....	103
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	105

## **Κατάλογος εικόνων**

<b>Εικόνα 2.1:</b> Αναπαράσταση χρόνου και ροής της μεθόδου in vitro πέψης όξινου ορού γιαούρτης INFOGEST 2.0 .....	54
<b>Εικόνα 2.2:</b> Ενδεικτική περιοχή μέτρησης των κυττάρων ( <a href="https://nemertes.library.upatras.gr/jspui/handle/10889/4761">https://nemertes.library.upatras.gr/jspui/handle/10889/4761</a> ) .....	62
<b>Εικόνα 2.3:</b> Ενζυμική αναγωγή MTT σε φορμαζάνη (Babacan et al. 2021).....	65
<b>Εικόνα 2.4:</b> Είδη εκκινητών για αντίστροφη μεταγραφή του RNA (Bookout and Mangelsdorf 2003) .....	74
<b>Εικόνα 2.5:</b> σύνδεση της χρωστικής ουσίας SYBR Green I με το δίκλωνο μόριο DNA (Arya et al. 2005) .....	76
<b>Εικόνα 2.6:</b> Μοντέλο γραφικής παράστασης που απεικονίζει την ονοματολογία που χρησιμοποιείται συνήθως στη ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Arya et al. 2005) ....	80

## **Κατάλογος πινάκων**

<b>Πίνακας 1.1:</b> Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αίγειου, πρόβειου, αγελαδινού και ανθρώπινου γάλακτος (Park et al. 2007).....	15
<b>Πίνακας 1.2:</b> Μέση σύσταση όξινου ορού γιαουρτιού (Kyle and Amamcharla 2016) .....	16
<b>Πίνακας 1.3:</b> Σύνθεση πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε αγελαδινό, αίγιο και πρόβειο γάλα (Khan et al. 2019).....	32
<b>Πίνακας 1.4:</b> Προφίλ των αμινοξέων του αγελαδινού , αίγειου και πρόβειου γάλακτος (Khan et al. 2019).....	39
<b>Πίνακας 2.1:</b> Ζωική προέλευση όξινου ορού γιαουρτιού και μέση τιμή πρωτεΐνης .....	49
<b>Πίνακας 2.2:</b> Ποσότητες χρησιμοποιηθέντων αλάτων για την παρασκευή διαλυμάτων για κάθε στάδιο πέψης SSF, SIF, SGF σε όγκο 400 mL.....	52
<b>Πίνακας 2.3:</b> Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή .....	73
<b>Πίνακας 2.4:</b> Εκκινητές των υπό μελέτη γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε RT- PCR ..	77
<b>Πίνακας 2.5:</b> Αναλογίες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του master mix .....	78
<b>Πίνακας 2.6:</b> Συνθήκες Real Time qPCR .....	79

## Κατάλογος διαγραμμάτων

**Διάγραμμα 3.1:** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ORAC του όξιου ορού γιαουρτιού σε αρχικά λυοφιλοποιημένα δείγματα (Iyo), μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SIF) και σε δείγματα με μοριακό βάρος κάτω των 3kDa μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (down 3kDa sif). Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$  ..... 87

**Διάγραμμα 3.2:** Αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων όξιου ορού γιαουρτιού ανά εποχή με την μέθοδο ORAC, σε λυοφιλοποιημένα δείγματα πριν την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (Iyo), μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (sif) και σε δείγματα μετά την *in vitro* πέψη με μοριακό βάρος πεπτιδίων κάτω των 3kDa (down 3kDa sif) ανά εποχή. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$  ..... 88

**Διάγραμμα 3.3:** Επίδραση της ζωικής προέλευσης του όξιου ορού γιαουρτιού μετά την έκθεσή τους σε THP-1 μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με LPS, στην σχετική έκφραση των γονιδίων HMOX, NRF2, SOD και CAT. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$  ..... 89

**Διάγραμμα 3.4:** Επίδραση της εποχικότητας του όξιου ορού γιαουρτιού μετά την έκθεση των δειγμάτων σε THP-1 μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με LPS, στην σχετική στην σχετική έκφραση των γονιδίων HMOX1, NRF2, SOD και CAT ..... 90

**Διάγραμμα 3.5:** Αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών παρουσία λυοφιλοποιημένου όξιου ορού γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης μετά από 10 ώρες. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$  ..... 91

**Διάγραμμα 3.6:** Αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών παρουσία λυοφιλοποιημένου όξιου ορού γιαουρτιού μετά την προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης διαφορετικής ζωικής προέλευσης, μετά από 10 ώρες. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$  ..... 92

# Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

## Εισαγωγή

Γάλα είναι το έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών που προορίζεται αποκλειστικά για τη διατροφή του νεογέννητου μέχρι μια ορισμένη ηλικία, καθώς και μετέπειτα ως πολύτιμο στοιχείο μιας ολοκληρωμένης διατροφής λόγω της πλούσιας πηγής θρεπτικών συστατικών του. Το γάλα χρησιμοποιείται σαν τροφή του ανθρώπου από τους προϊστορικούς χρόνους και εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της καθημερινής διαίτας του, είτε αυτούσιο είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (γιαούρτη, τυρί, βούτυρο κλπ.), για όλη τη διάρκεια της ζωής του (Μάντης κ.α., 2015).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι καταναλωτές δίνουν μεγάλη προσοχή στα τρόφιμα και τη σύνθεση τους λόγω της κομβικής σχέσης μεταξύ της διατροφής και της ανθρώπινης υγείας. Το γάλα είναι ένα σύνθετο μίγμα λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων, βιταμινών και άλλων διάφορων συστατικών διασκορπισμένων στο νερό. Η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται από τη σύνθεση του γάλακτος που ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας, τις μεθόδους άμελης, το περιβάλλον, την εποχή, τη διατροφή και το σύστημα διατροφής, τη φυλή και το είδος. Ωστόσο, η σύνθεση του γάλακτος κυμαίνεται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Μεταξύ των συστατικών του γάλακτος, οι πρωτεΐνες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής συμβάλλοντας σε σημαντικές θρεπτικές, βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες. Το προφίλ αμινοξέων των καζεϊνών και των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος κατέχουν μοναδική θέση στην ανθρώπινη διατροφή. Αυτές οι πρωτεΐνες κατατάσσονται ως ποιοτικές με υψηλότερη βιολογική αξία, καλή πεπτικότητα (97% έως 98%), ταχεία απορρόφηση και χρήση στον οργανισμό (Rafiq et al. 2015). Οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι η κύρια ομάδα πρωτεϊνών του γάλακτος που βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες σε διάφορα είδη γάλακτος. Το ανθρώπινο γάλα έχει αναλογία καζεΐνης προς πρωτεΐνης του ορού 40: 60, ενώ το αγελαδινό, το πρόβειο, το αίγαιο και το βουβαλίσιο γάλα έχουν αναλογία καζεΐνης προς πρωτεΐνης του ορού 80: 20 (Rafiq et al. 2015). Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες, τις κύριες πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος, α- γαλακταλβουμίνη και β-γαλακτογλοβουλίνη και τις δευτερεύουσες πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος συμπεριλαμβανομένων της λυσοζύμης, της λακτοφερρίνης, της γαλακτοϋπεροξειδάσης και των ανοσοσφαιρινών. Αν και τα συστατικά αυτά αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό κλάσμα πρωτεϊνών του γάλακτος, παίζουν σημαντικό ρόλο ως άμυνα πρώτης γραμμής λόγω της άμεσης και έμμεσης αντιμικροβιακής τους δράσης και εκτός από τις σημαντικές

φυσιολογικές λειτουργίες συμβάλουν και στο να προάγουν την υγεία (Benkerroum 2008). Ωστόσο, η ειδική τους δράση εξαρτάται από τη σύνθεση αμινοξέων καθώς και την αλληλουχία τους (Demers-Mathieu et al. 2013).

Το γάλα των θηλαστικών περιέχει πολλά βιοενεργά συστατικά που ενισχύουν τις φυσιολογικές διεργασίες στο σώμα. Εάν ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχίσει να αυξάνεται με ρυθμό 1,4% τότε, μέχρι το έτος 2030, θα ξεπεράσει τα 8 δισεκατομμύρια (Khush 2002). Για να θρέψουν αυτόν τον τεράστιο πληθυσμό, οι χώρες πρέπει να αυξήσουν την παραγωγή τροφίμων τους, κάτι που αποτελεί πρόκληση λόγω της συρρίκνωσης της διαθέσιμης καλλιεργήσιμης γης και της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σχετικά με τα οφέλη για την υγεία των ειδικά σχεδιασμένων τροφίμων (designer foods) μέσω διαφορετικών εθνικών προγραμμάτων (Rajasekaran and Kalaivani 2013). Ως εκ τούτου, υπάρχει μια πολλά υποσχόμενη ανάγκη να βρεθούν νέοι τρόποι για την παραγωγή θρεπτικών τροφίμων για αυτόν τον συνεχώς αυξανόμενο πληθυσμό. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας έχουν φέρει ελπίδα για την παραγωγή επαρκών θρεπτικών τροφίμων (Mayne and Sprungen 2017).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν περίπου το 25-30% της μέσης διατροφής του ατόμου (Richmond, 2007). Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι θρεπτικά τρόφιμα που περιέχουν πολυάριθμα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως ελαϊκό οξύ, συζευγμένο λινολεϊκό οξύ, ω3 λιπαρά οξέα, βιταμίνες μέταλλα και βιοδραστικές ενώσεις όπως αντιοξειδωτικά (Saxelin et al., 2003).

## **1.1 Γάλα και στραγγιστό γιαούρτι**

### **1.1.1 Σύνθεση του γάλακτος**

Η σύνθεση μεταξύ του αγελαδινού, του αίγιου, του πρόβειου καθώς και του ανθρώπινου γάλακτος διαφέρει (Πίνακας 1.1), αλλά ποικίλει ανάλογα τη φυλή, την ατομικότητα, τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου, τη διαχείριση, την διατροφή, τις συνθήκες του περιβάλλοντος, τη γεωγραφική προέλευση, την κατάσταση της υγείας του μαστού, το στάδιο της γαλουχίας και την εποχή του χρόνου. Διαφορετικά επίπεδα λίπους και πρωτεϊνών έχουν παρατηρηθεί στο γάλα που συλλέγεται σε διαφορετικές εποχές (Parkash and Jenness 1968; Underwood 1977; Jenness 1980; Haenlein and Caccese 1984; Juarez and Ramos 1986; Young W Park 1991). Αυτές οι παραλλαγές επηρεάζουν έντονα τις συνθήκες παρασκευής, τις οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων (Ozrenk and Inci 2008).

Υπάρχουν σαφείς διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μεταξύ του αίγιου, πρόβειου και αγελαδινού γάλακτος. Η σύνθεση του αγελαδινού γάλακτος στην αγορά έχει ελάχιστες αλλαγές καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, επειδή το γάλα που εισέρχεται χύδην στη δεξαμενή από τις αγέλες αγελάδων θα ποικίλλει λίγο ανά εποχή λόγω της αναπαραγωγής όλο το χρόνο. Από την άλλη πλευρά αυτό είναι αρκετά διαφορετικό από το πρόβειο και αίγιο γάλα, το οποίο παράγεται κατά κύριο λόγο από την εποχική αναπαραγωγή των αιγοπροβάτων (Haenlein and Wendorff 2006). Επομένως ο αλλαγές στη σύνθεση του αιγοπρόβειου γάλακτος συμβαίνουν ανά εποχή, διότι προς το τέλος της γαλουχίας, το λίπος, η πρωτεΐνη, τα στερεά και τα ανόργανα συστατικά αυξάνονται ενώ η περιεκτικότητα σε λακτόζη μειώνεται (Brozos et al. 1998; Haenlein 2001, 2004). Επιπλέον, το αίγιο γάλα διαφέρει από το αγελαδινό γάλα ως προς την καλύτερη πεπτικότητα, την αλκαλικότητα, τη ρυθμιστική ικανότητα ενώ επιπλέον έχει βρεθεί από διάφορες μελέτες να προσφέρει ορισμένες θεραπευτικές αξίες στην ιατρική και τη διατροφή του ανθρώπου (Young W Park and Chukwu 1989; Y W Park 1994; Haenlein and Caccese 1984). Το πρόβειο γάλα έχει υψηλότερο ειδικό βάρος, ιξώδες, δείκτη διάθλασης, ογκομετρική οξύτητα και χαμηλότερο σημείο πήξης από το αγελαδινό γάλα (Haenlein and Wendorff 2006). Τα λιπίδια στο πρόβειο και αίγιο γάλα έχουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά από ότι στο αγελαδινό γάλα, αλλά υπάρχουν διαφορές μεταξύ διαφορετικών αναφορών (Anifantakis 1986; Young W Park 2017).

**Πίνακας 1.1:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αίγιου, πρόβειου, αγελαδινού και ανθρώπινου γάλακτος

Σύνθεση	Αίγιο	Πρόβειο	Αγελαδινό	Ανθρώπινο
Λίπος (%)	3,8	7,9	3,6	4
Στερεά άνευ λίπους (%)	8,9	12	9	8,9
Λακτόζη (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Πρωτεΐνη (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Καζεΐνη (%)	2,4	4,2	2,6	0,4
Αλβουμίνη του ορού, σφαιρίνη (%)	0,6	1	0,6	0,7
Μη πρωτεϊνικό N (%)	0,4	0,8	0,2	0,5
Τέφρα (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Θερμίδες/ 100 ml	70	105	69	68

(Park et al., 2007)

### 1.1.2 Ορισμός γάλακτος και στραγγιστού γιαουρτιού

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ, άρθρο 80, 2016) ως “Γάλα” ορίζεται το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν της ολοσχερούς, χωρίς διακοπή άμελης

υγειούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον όρο «Γάλα» απλά χωρίς να συνοδεύεται αυτό από κάποιο επίθετο, ορίζεται αποκλειστικά και μόνο το γάλα το οποίο:

α) Προέρχεται από αγελάδα.

β) Είναι νωπό.

γ) Είναι πλήρες.

δ) Δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση.

ε) Δεν περιέχει άλλες ύλες που έχουν προστεθεί από έξω.

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ως “γαλακτοκομικό προϊόν ορίζει το προϊόν που προκύπτει από οποιαδήποτε επεξεργασία του γάλακτος, το οποίο μπορεί να περιέχει πρόσθετα τρόφιμα ή συστατικά απαραίτητα για την επεξεργασία του”.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ, άρθρο 82, 2016) ως “Γιαούρτι χαρακτηρίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από την ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με την χρήση υποχρεωτικά των καλλιεργειών- εκκινητών *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 107 cfu/g προϊόντος μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του”.

Ενώ “Στραγγιστό Γιαούρτι” χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι μετά από αποστράγγιση μέρους του ορού μετά τη πήξη και έχει κατ’ ελάχιστο 5,6% πρωτεΐνες για αγελαδινό ή αίγαιο γάλα και 8% για το πρόβειο γάλα. Σε περίπτωση μιγμάτων διάφορων ειδών γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, υπολογίζεται με βάση την αναλογία των ειδών γάλακτος”, (ΚΤΠ, άρθρο 82, 2016). Το στραγγιστό γιαούρτι λαμβάνεται αφαιρώντας ένα μέρος του νερού και των υδροδιαλυτών συστατικών, δηλαδή του ορού του γιαουρτιού. Το παραπροϊόν αυτό αντιπροσωπεύει περίπου τα 2/3 του αρχικού γάλακτος που προορίζεται για την παραγωγή γιαουρτιού. Το παραπροϊόν του γιαουρτιού έχει την ακόλουθη μέση σύνθεση:

**Πίνακας 1.2:** Μέση σύσταση όξινου ορού γιαουρτιού

<b>pH</b>	4,45
<b>TS (ολικά στερεά) %</b>	5,77
<b>Τέφρα %</b>	0,72
<b>Λακτόζη %</b>	3,53
<b>Ολική πρωτεΐνη %</b>	0,27

(Kyle and Amamcharla 2016)



## Πρώτες ύλες

- **Γάλα:** Στις περισσότερες δυτικές χώρες χρησιμοποιείται το γάλα αγελάδας. Ωστόσο σε κάποιες χώρες συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας χρησιμοποιείται το γάλα προβάτου, αίγας ή βουβάλας.
- **Οξυγαλακτική καλλιέργεια:** Είναι ένα μίγμα οξυγαλακτικών βακτηριών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ, άρθρο 82) δεν επιτρέπει την προσθήκη συντηρητικών για την παρασκευή γιαούρτης. Επιτρέπει μόνο για τα επιδόρπια με βάση το γάλα και όχι σε προϊόντα που κυκλοφορούν στο εμπόριο υπό την ονομασία «γιαούρτι» (Μάντης, 2015).

Η ζύμωση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία επεξεργασίας τροφίμων στη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Λόγω της ικανότητας της να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του γάλακτος, να βελτιώνει την υφή και τις γεύσεις των προϊόντων που προκύπτουν και να ενισχύει τα οφέλη για την υγεία (McKevith and Shortt 2003).

## 1.2 Βασικά στάδια παρασκευής γιαουρτιού

### Ποιοτικός έλεγχος

Το νωπό γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή γιαούρτης πριν από την επεξεργασία του πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος με μια σειρά εξετάσεων οι οποίες αποσκοπούν στη διαπίστωση της νωπότητας, της υγιεινότητας και της χημικής του σύστασης (Μάντης κ.α., 2015).

### Τυποποίηση του γάλακτος

Το γάλα τυποποιείται αναφορικά με την λιποπεριεκτικότητα του και ως προς το ποσοστό των μη λιπαρών στερεών συστατικών (ΣΥΑΛ) ώστε το τελικό προϊόν να ανταποκρίνεται στις εκάστοτε νομοθετικές απαιτήσεις (Μάντης κ.α., 2015).

### Θέρμανση του γάλακτος

Το γάλα που προορίζεται για την παρασκευή της γιαούρτης θερμαίνεται, ανεξάρτητα εάν προηγουμένως έχει παστεριωθεί, στους 85-90 °C για 30-5 min, με σκοπό την εξυγίανση και κυρίως την αδρανοποίηση ορισμένων ενζύμων και την πρόκληση κάποιων απαραίτητων από τεχνολογικής άποψης μεταβολών σε ορισμένα συστατικά του γάλακτος όπου βελτιώνουν τη δομή και την πυκνότητα του τελικού προϊόντος (Μάντης κ.α., 2015).

### **Προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας**

Μετά τη θέρμανση το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία 40-43°C και οδηγείται σε θερμομονωμένες δεξαμενές και ενοφθαλμίζεται με καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων *Str. thermophilus* και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Σε αυτό το στάδιο τηρούνται αυστηρά μέτρα για την προστασία της οξυγαλακτικής καλλιέργειας από επιμολύνσεις, καθώς και για την αποφυγή της μόλυνσης του γάλακτος από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς (Μάντης κ.α., 2015).

Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων είναι διαθέσιμες το εμπόριο κυρίως με τη μορφή λυοφιλοποιημένων και κατεψυγμένων. Οι λυοφιλοποιημένες καλλιέργειες χρησιμοποιούνται κυρίως από τις μεγάλες βιομηχανίες ή τους μεγάλους παραγωγούς γιαούρτης και περιέχουν πληθυσμό  $10^{10}$  cfu/g, οι οποίες προστίθενται απευθείας στο γάλα σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή της καλλιέργειας.

### **Επώαση- Πήξη**

Μετά την προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας στο γάλα, αναδεύεται καλά και οδηγείται για επώαση στους 42°C (41-43°C) για 3 ώρες περίπου, σε αυτό το διάστημα επέρχεται η πήξη του γάλακτος και η μετατροπή του σε γιαούρτη. Η θερμοκρασία επώασης θεωρείται ως βέλτιστος συμβιβασμός, δεδομένων των άριστων θερμοκρασιών ανάπτυξης της οξυγαλακτικής καλλιέργειας *Str. thermophilus* (37°C) και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (45°C) (Μάντης κ.α., 2015).

Οι δυο μικροοργανισμοί της οξυγαλακτικής καλλιέργειας δρουν συνεργιστικά. Αναπτύσσονται και παράγουν γρήγορα οξύτητα στο γάλα λόγω της συμβίωσής τους, καθώς το ένα ενισχύει την ανάπτυξη του άλλου διαμέσου των προϊόντων του μεταβολισμού τους. Ζυμώνουν τη λακτόζη παράγοντας γαλακτικό οξύ το οποίο μειώνει το pH. Όταν το pH φτάσει στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (pH 4,6) προκαλεί όξινη πήξη και τη δημιουργία του πηγματος γιαουρτιού (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009). Οι τελικοί πληθυσμοί των δύο οξυγαλακτικών βακτηρίων αναμένεται να είναι τουλάχιστον  $10^8$  cfu/g. Από τα προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών καλλιέργειών αυτό που δίνει το χαρακτηριστικό άρωμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά είναι κυρίως η ακεταλδεϋδη (Μάντης κ.α., 2015).

### **Ψύξη**

Μετά τη πήξη του γάλακτος και τη μετατροπή του σε στραγγιστό γιαούρτι, οι περιέκτες, σε ομαδικές συσκευασίες εμπορίου οδηγούνται σε τούνελ ψύξης σε θερμοκρασία  $\leq 5^\circ\text{C}$ . Σε

μονάδες μικρής παραγωγής γιαουρτιού το προϊόν ψύχεται με την τοποθέτηση σε βιομηχανικά ψυγεία (Μάντης κ.α., 2015).

### **1.2.1 Παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού**

Για την παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού υπάρχουν οι εξής μέθοδοι:

#### **Στραγγισμένη σακούλας**

Η βασική αρχή της στράγγισης με τον παραδοσιακό αυτό τρόπο είναι η αύξηση της περιεκτικότητας του γιαουρτιού σε στερεά συστατικά στον εκάστοτε επιθυμητό βαθμό με την αποβολή μέρους του νερού (υδάτινης φάσης) (Μάντης κ.α., 2015).

Σε μεγάλες κλίμακες παραγωγής το γάλα αφού πήξει σε δεξαμενές θραύεται, ψύχεται και τοποθετείται είτε σε υφασμάτινους σάκους των 15-20 kg είτε σε ανοξείδωτες λεκάνες. Η στράγγιση του γιαουρτιού σε σάκους γίνεται λόγω βαρύτητας ενώ η στράγγιση του γιαουρτιού σε ανοξείδωτες λεκάνες με εφαρμογή πίεσης ο ένας πάνω στον άλλο για να επιβληθεί η στράγγιση. Ο ορός που αποβάλλεται περιέχει κυρίως λακτόζη, άλατα, και ελάχιστες αζωτούχες ενώσεις (αμινοξέα και πεπτίδια). Η διάρκεια στράγγισης διαρκεί 8-16h σε θερμοκρασία 0-5°C. Μετά την ολοκλήρωση της στράγγισης, το περιεχόμενο των σάκων οδηγείται σε ειδικό ζυμωτήριο και εκεί γίνεται η μηχανική ανάδευση του γιαουρτιού και η τυποποίησή του εάν απαιτείται. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η απαιτούμενη χειρωνακτική εργασία και από άποψη υγιεινής οι μη ιδανικές συνθήκες στράγγισης (Μάντης κ.α., 2015).

#### **Στραγγισμένη με φυγοκέντριση**

Μετά τη πήξη του γάλακτος, το πήγμα θερμαίνεται με σκοπό την απελευθέρωση ορού για την διευκόλυνση του μηχανικού διαχωρισμού του ορού κατά την φυγοκέντριση. Στη συνέχεια υποβάλλεται σε φυγοκέντριση, σε ειδικού τύπου διαχωριστήρες, αποβάλλοντας μέρος του ορού και επιτυγχάνοντας την παραγωγή πήγματος με αυξημένη αναλογία στερεών. Ανάλογα με τον τύπο του φυγοκεντητή, σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται αποβουτύρωση του γάλακτος πριν από την πήξη και η προσθήκης κρέμας πριν από την ψύξη και τη συσκευασία ώστε η τελική αναλογία λίπους να είναι περίπου 10% (Μάντης κ.α., 2015).

#### **Συμπυκνωμένο με υπερδιήθηση γάλακτος**

Το γάλα αποβουτυρώνεται και θερμαίνεται στους 90-95°C για 5-10 min. Στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία 47-50°C και συμπυκνώνεται με σύστημα υπερδιήθησης (ultrafiltration) έως στο ½ του αρχικού του όγκου έπειτα προστίθεται κρέμα ώστε το τελικό

προϊόν να αποκτήσει την επιθυμητή λιποπεριεκτικότητα. Το μίγμα ψύχεται στους 42°C και γίνεται προσθήκη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση (Μάντης κ.α., 2015).

Κατά την υπερδιήθηση χρησιμοποιούνται ειδικές μεμβράνες οι οποίες συγκρατούν το λίπος και τις πρωτεΐνες, αλλά αφήνουν να διαπεράσει στο διήθημα μέρος της λακτόζης, αλάτων και των μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχων ουσιών. Έτσι, το συμπύκνωμα είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και λίπος. Η συμπύκνωση του γάλακτος με την τεχνική της αντίστροφης ώσμωσης παρ' ότι αυξάνει την απόδοση, δημιουργεί άλλα προβλήματα λόγω αυξημένου ποσοστού λακτόζης και αλάτων στο τελικό προϊόν, γι' αυτό και δεν είναι μέθοδος επιλογής (Μάντης κ.α., 2015).

Πρέπει να τονισθεί ότι η μέθοδος της συμπύκνωσης του γάλακτος δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού στην Ελλάδα γιατί αντιτίθεται στην νομοθεσία που απαιτεί στράγγιση του πήγματος.

### **1.3 Όξινο ορός γιαουρτιού**

Ο ορός του γάλακτος είναι η υδάτινη φάση του γάλακτος ή αλλιώς το υγρό που απομένει μετά την απομάκρυνση του λίπους και της καζεΐνης (Guimarães, Teixeira, and Domingues 2010; Chandrapala et al. 2016). Η παραγωγή ποικίλων γαλακτοκομικών προϊόντων αποδίδουν ένα όξινο ή γλυκό παραπροϊόν γνωστό ως όρος (Wherry, Barbano, and Drake 2019).

Γενικά το κλάσμα του ορού του γάλακτος αποτελεί το 85-90% του αρχικού όγκου του γάλακτος και το 55% των θρεπτικών συστατικών του, συμπεριλαμβανομένου και του 20% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Guimarães, Teixeira, and Domingues 2010; Walsh 2014). Ο ορός γάλακτος είναι μια από τις πιο σημαντικές πηγές λακτόζης και πρωτεϊνών, γεγονός που καθιστά αυτό το παραπροϊόν σημαντικό λόγω των πολύτιμων θρεπτικών συστατικών του για περαιτέρω χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Η λακτόζη αντιπροσωπεύει >69% των συνολικών στερεών, ενώ τα μέταλλα αντιπροσωπεύουν το 12-15% και η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος το 8-10% των συνολικών στερεών (González-Martinez et al. 2002). Ο ορός των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι ένα κιτρινοπράσινο παραπροϊόν που οφείλεται στην παρουσία ριβοφλαβίνης (Βιταμίνη B<sub>12</sub>) (Siso 1996; De Wit 2011) και ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας του γάλακτος ο ορός ταξινομείται σε

γλυκός ή όξινος όπου είναι και οι κύριοι τύποι ορού γαλακτοκομικών προϊόντων που παράγονται από τη γαλακτοβιομηχανία (Affertsholt and Pedersen 2016).

Ο γλυκός ορός συλλέγεται μετά την πήξη της καζεΐνης κατά την παραγωγή ωριμασμένων τυριών μέσω ενζυμικής πήξης χρησιμοποιώντας μίγμα χυμοσίνης και πεψίνης (πυτιά) (Rama et al. 2019; Wherry, Barbano, and Drake 2019) έχει συνήθως pH 5,9-7 (Siso 1996; Bansal and Bhandari 2016) χαμηλότερη περιεκτικότητα σε τέφρα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε σύγκριση με τον όξινο όρο (Siso 1996). Ο όξινος ορός προκύπτει από διεργασίες ζύμωσης του γάλακτος για την παρασκευή γιαούρτης και φρέσκων τυριών με αλοιφώδη υφή όπως ricotta και cottage (Roginski et al. 2003). Ο όξινος ορός γιαούρτης είναι ένα παραπροϊόν παραγωγής στραγγιστού γιαουρτιού, το οποίο παράγεται σε pH 4,6-5,1 με όξινη πήξη των καζεϊνών (Tunick 2008), και λαμβάνεται σε σημαντικές ποσότητες, η αναλογία ορού γάλακτος προς γιαούρτι είναι περίπου 3:1 στην παραγωγή γιαουρτιού (González-Martinez et al. 2002; Bansal and Bhandari 2016; Carvalho, Prazeres, and Rivas 2013).

Οι κύριες διαφορές μεταξύ όξινου και γλυκού ορού γαλακτοκομικών προϊόντων είναι η τιμές του pH, το προφίλ των μετάλλων, η ποσότητα λακτόζης και γαλακτικού οξέος και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Ο όξινος ορός χαρακτηρίζεται από τις χαμηλότερες τιμές pH (pH ~ 4,6-5,1), σε σύγκριση με τον γλυκό ορό (pH ~ 5,9-7) (Siso 1996; Bansal and Bhandari 2016), περιέχει υψηλότερη ποσότητα ιόντων ασβεστίου καθώς και ανιόντα φωσφορικών αλάτων και γαλακτικού οξέος (Bansal and Bhandari 2016). Στην περίπτωση του όξινου ορού, το pH μειώνεται κατά τη ζύμωση μέχρι το ισοηλεκτρικό σημείο (pH 4,6) και αυτό, μετατρέπει το ασβέστιο στο σύμπλοκο φωσφορικού ασβεστίου των καζεϊνικών μικκυλίων, από αδιάλυτο σε διαλυτό. Η μεγαλύτερη διαφορά στη σύνθεση των μετάλλων παρατηρείται για είδη ιόντων  $Ca^{+2}$  και φωσφορικών ιόντων, των οποίων η περιεκτικότητα στον όξινο ορό είναι 2,9 και 2,3 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με τον γλυκό ορό, αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό pH του όξινου ορού που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πιο διαλυτού δισόξινου φωσφορικού ασβεστίου, το οποίο παραμένει στο διάλυμα (Guo and Wang 2019). Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ του όξινου και γλυκού ορού είναι η οξύτητα τους. Έτσι, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα του όξινου ορού είναι περίπου 4 φορές υψηλότερη από αυτή του γλυκού ορού. Λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε ορισμένα μέταλλα, η τιμή της τέφρας για τον όξινο ορό είναι επίσης υψηλότερη. Η υψηλή οξύτητα του όξινου ορού γαλακτοκομικών προϊόντων προκαλείται από την υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα, όπως το γαλακτικό και κιτρικό οξύ. Λόγω της όξινης πήξης της καζεΐνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό γαλακτικού οξέος από τη διαδικασία

ζύμωσης της λακτόζης, το τελικό προϊόν περιέχει σημαντική ποσότητα γαλακτικού οξέος καθώς και ελαφρώς χαμηλότερη ποσότητα λακτόζης. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στον όξινο ορό είναι μικρότερη σε γενικές γραμμές από εκείνη του γλυκού λόγω των τεχνολογικών διαφορών στην παραγωγή ορού γαλακτοκομικών προϊόντων (Merkel, Voropaeva, and Ondrušek 2021).

#### **1.4 Επίδραση του όξινου ορού στο περιβάλλον**

Παρόλο που ο όξινος ορός που προέρχεται από γαλακτοκομικά προϊόντα και είναι ένα παραπροϊόν με θρεπτική αξία, θεωρείται περιβαλλοντικός ρύπος με περιορισμένη χρήση σε συμπληρώματα ζωοτροφών. Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων όξινου ορού δεν χρησιμοποιείται εύκολα από την βιομηχανία τροφίμων ή ζωοτροφών και τα υπολείμματα απορρίπτονται σε ρυάκια ή πετιούνται σε ερημιές γεγονός που επηρεάζει αρνητικά την υδρόβια ζωή και την ποιότητα/ παραγωγικότητα του εδάφους λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου και της υψηλής ζήτησης οξυγόνου για βιοαποδόμηση, δηλαδή περίπου 27-60g/L και 50-102 g/L, αντίστοιχα (Brandelli, Daroit, and Corrêa 2015; Smithers 2015; Yadav et al. 2015) και το χαμηλό pH (Elliott 2013), με αποτέλεσμα να επιφέρει τόσο οικονομικές όσο και περιβαλλοντικές προκλήσεις (Bong and Moraru 2014; Elliott 2013; Smithers 2015).

Λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας, της βιολογικής ζήτησης οξυγόνου και του υψηλού όγκου παραγωγής γλυκού και όξινου ορού γαλακτοκομικών προϊόντων είναι απαραίτητη η επεξεργασία του για περαιτέρω χρήση. Η υψηλή βιολογική ζήτηση οξυγόνου, προκαλεί τεράστια ζημιά στη φύση εάν δεν ανακυκλωθεί απευθείας. Για το λόγο αυτό, καθώς και για τις μεγάλες ποσότητες παραγόμενου ορού από γαλακτοκομικά προϊόντα είναι απαραίτητη η ανακύκλωσή του, συμπεριλαμβανομένης περεταίρω εφαρμογής του (Bansal and Bhandari 2016; Ganju and Gogate 2017; Królczyk et al. 2016). Η διάθεση επιπλέον, του όξινου ορού δημιουργεί πρόσθετο κόστος για τη γαλακτοβιομηχανία. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένες εταιρίες παραγωγής γιαουρτιού πληρώνουν προμηθευτές γάλακτος για να χρησιμοποιούν όξινο ορό στις ζωοτροφές (Elliott 2013). Η γαλακτοβιομηχανία αναζητά επομένως λύση στα προβλήματα που σχετίζονται με τον όξινο ορό. Έτσι η μείωση του όξινου ορού κατά τη παραγωγή γιαουρτιού θα μπορούσε να ωφελήσει άμεσα τη βιομηχανία.

Δεδομένης της ανάγκης μείωσης των αποβλήτων και λόγω του ότι υπάρχουν αυστηροί κανονισμοί κατά της απόρριψης όξινου ορού γαλακτοκομικών προϊόντων, λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά τη διάθεσή του (Elliott 2013). Έτσι, η αποτελεσματική χρήση και μετατροπή του ορού γαλακτοκομικών προϊόντων, σε ένα ευρύ φάσμα πολύτιμων συμπληρωμάτων διατροφής για τον άνθρωπο ολοένα και αυξάνεται (Deeth and Bansal 2018).

## 1.5 Διατροφικές εφαρμογές ορού γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα τελευταία χρόνια, τα κλάσματα ορού γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν κερδίσει σημαντική προσοχή λόγω των πλεονεκτημάτων τους όσον αφορά τα οφέλη για την υγεία και τις ποικίλες εφαρμογές τους. Πρωτεΐνες, λιπίδια, λακτόζη και βιοενεργά μόρια που προέρχονται από τον ορό γαλακτοκομικών προϊόντων, έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν πιθανή βιοτεχνολογική ικανότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς όφελος της υγείας (Fitzsimons, Mulvihill, and Morris 2008).

Τα συστατικά του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την αύξηση της λειτουργικής αξίας των τροφίμων (Aimutis 2004). Τα προϊόντα πρωτεΐνης ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων των παρασκευασμάτων για βρέφη, των διαιτητικών τροφίμων και των ζωοτροφών (Fitzsimons, Mulvihill, and Morris 2008). Οι πολυμερισμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος, οι οποίες έχουν διαφορετικές εμπορικές ονομασίες, όπως προ-θερμασμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος, κατεργασμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος, πρωτεΐνες ορού γάλακτος όπου έχουν μετουσιωθεί με θερμότητα ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος (Vardhanabhuti et al. 2001), επιδεικνύουν βελτιωμένες λειτουργικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ευρέως για την βελτίωση της υφής, της ποιότητας και διατηρησιμότητας πολλών τροφίμων, όπως λουκάνικα, γαλακτοκομικά προϊόντα, επιδόρπια, προϊόντα αρτοποιίας, κρύες σάλτσες (Ahmed R A Hammam 2019b; Elofsson et al. 1997), ποτά, μπάρες δημητριακών και φρούτα (Ferreira et al. 2007).

Η αποτελεσματική χρήση και μετατροπή του ορού γαλακτοκομικών προϊόντων σε ένα ευρύ φάσμα πολύτιμων συμπληρωμάτων ανθρώπινης διατροφής έχουν ενισχύσει τη χρήση γλυκού και όξινου ορού καθώς εκμεταλλεύονται την άφθονη παρουσία συστατικών τροφίμων που προάγουν την υγεία και την εμπορευσιμότητα των παρασκευασμένων προϊόντων που θεωρούνται «γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (Generally Recognized as Safe, GRAS) από τους ρυθμιστικούς φορείς τροφίμων/φαρμάκων (Brandelli, Daroit, and Corrêa 2015). Πρόσφατα η αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών για προϊόντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από τον ορό γάλακτος έχει καταστήσει διαθέσιμα στην αγορά τέτοια προϊόντα, όπως λειτουργικά τρόφιμα και θρεπτικά προϊόντα. Για παράδειγμα, τα τρόφιμα που προέρχονται από ορό γάλακτος αποτελούν πλούσια πηγή βιταμινών και μετάλλων, με υψηλότερες συγκεντρώσεις εύπεπτων πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων, και εξαιρετική πηγή θειούχων αμινοξέων, τα οποία παρέχουν την ενέργεια για την εκτέλεση διαφόρων μεταβολικών λειτουργιών του σώματος (Singh 2016).

## **1.6 Γαλακτοκομικά προϊόντα και υγεία**

### **1.6.1 Βιοενεργά πεπτίδια**

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών για τον άνθρωπο σε όλη τη διάρκεια της ζωής του και ιδιαίτερα στην πρώιμη παιδική ηλικία (Dror and Allen 2014). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος παρέχουν αμινοξέα απαραίτητα για την ανάπτυξη και αποτελούν πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ή αλλιώς βιοενεργών πεπτιδίων (Korhonen 2009). Τα βιοενεργά πεπτίδια ορίζονται ως συγκεκριμένες περιοχές που κωδικοποιούνται στη πρωταρχική αλληλουχία πρωτεϊνών και, εκτός από τις ειδικές λειτουργίες τους έχουν επίσης σημαντικά διατροφικά πλεονεκτήματα (Udenigwe 2014; Abd El-Fattah et al. 2018). Τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από γαλακτοκομικά προϊόντα είναι μικρά σε μέγεθος και αποτελούνται συνήθως από 3 έως 20 αμινοξέα και το μοριακό τους βάρος είναι μικρότερο από 6000Da. Επιπλέον, ο ορός γάλακτος και οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος είναι μια πηγή πρόδρομων βιολογικά ενεργών πεπτιδίων επίσης γνωστά ως βιοδραστικά πεπτίδια και μπορούν να έχουν επιπτώσεις στην υγεία (Gouda et al. 2021; Nguyen et al. 2020; Skrzypczak et al. 2020). Η βάση δεδομένων των βιολογικά ενεργών πεπτιδικών αλληλουχιών ανέφερε ότι υπάρχουν περίπου 3.000 πεπτίδια με πραγματικές ιδιότητες όπως αντιμικροβιακές, αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, μείωση της χοληστερίνης, ανοσορρυθμιστικές, αντιφλεγμονώδεις (Ahn, Cho, and Je 2015; Chakrabarti, Jahandideh, and Wu 2014; Nguyen et al. 2020; Chai, Voo, and Chen 2020), αντιθρομβωτικές, ανοσοτροποποιητικές και οπιοειδείς δραστηριότητες (Korhonen 2009).

Λόγω της φυσιολογικής και φυσικοχημικής ευελιξίας τους τα πεπτίδια γάλακτος θεωρούνται ως εξαιρετικά σημαντικά συστατικά για τρόφιμα που προάγουν την υγεία ή για φαρμακευτικές εφαρμογές. Η πλειονότητα των πεπτιδίων δημιουργείται κατά τη γαστρεντερική πέψη (Pritchard, Phillips, and Kailasapathy 2010). Αυτά τα πεπτίδια προέρχονται κυρίως από κλάσματα καζεΐνης (Su et al. 2017; Tagliacruzchi et al. 2018), πιθανώς λόγω του ότι οι καζεΐνες είναι τα κύρια συστατικά πρωτεΐνης γάλακτος (70-80% της συνολικής πρωτεΐνης) (Potočnik et al. 2011). Τέτοια βιοενεργά θραύσματα σχηματίζονται από την πρόδρομη ανενεργή πρωτεΐνη κατά τη γαστρεντερική πέψη και/ή κατά την επεξεργασία των τροφίμων (Korhonen and Pihlanto 2003).

Η πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος έχει υψηλή ποσότητα βιοδραστικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένης της β-γαλακτογλοβουλίνης, της α-γαλακταλβουμίνης, της αλβουμίνης ορού, των ανοσοσφαιρινών, της λακτοφερρίνης και της γαλακτοϋπεροξειδάσης (Whitney 1988; Zydney 1998; A R A Hammam et al. 2017; Ahmed R A Hammam 2019b). Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστατικά σε φαρμακευτικές, διατροφικές και



καλλυντικές εφαρμογές (Pihlanto and Korhonen 2003; Etzel 2004), λόγω των βιοδραστικών χαρακτηριστικών τους (Pihlanto and Korhonen 2003). Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια έχουν πολλά οφέλη για την υγεία, όπως η βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Mann et al. 2019), η αναστολή λοιμώξεων λόγω της αντιικής δράσης της λακτοφερρίνης (Drago-Serrano et al. 2017; Ahmed R A Hammam 2019a), μείωση του οξειδωτικού στρες και της λοίμωξης από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Gupta and Prakash 2017), η αντικαρκινική δραστηριότητα (A R A Hammam et al. 2017; Patel 2015), μείωση του άγχους (Yalcin 2006), βοηθά στη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Fekete et al., 2018), έχουν θετικές επιδράσεις στην ηπατίτιδα (Ng et al. 2015), μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο (Pal et al. 2019) και την οστεοπόρωση (Mangano, Bao, and Zhao 2019).

### **1.7 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες**

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά μόρια που προέρχονται από οξυγόνο που παράγονται ως συνέπεια της διαστημικής ακτινοβολίας (Kovalev 1983), ή ως παραπροϊόν κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής φωσφορυλιωτικής οξείδωσης σε ζωικά κύτταρα (Dröge 2002). Αυτά τα μόρια είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική αλλοίωση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA (Robbins, Kumar, and Abbas 2010) και η δραστηριότητά τους έχει συσχετιστεί με κλινικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση και ο νευροεκφυλισμός (Gilbert 2000). Σε αυτό το σενάριο, τα αντιοξειδωτικά των τροφίμων έχουν μελετηθεί ευρέως για τις θετικές τους επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, που σχετίζονται κυρίως με την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και την πρόληψη του οξειδωτικού στρες (Halliwell and Gutteridge 2015). Το γάλα έχει διερευνηθεί ως πηγή αντιοξειδωτικών, μια από αυτές είναι τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (Suetsuna, Ukeda, and Ochi 2000; Pihlanto 2006).

Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS) και την αδυναμία των φυσικών αντιοξειδωτικών ειδών να ελέγξουν την παραγωγή τους. Όταν συμβαίνει μια ανισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού και του αντιοξειδωτικού συστήματος, μπορεί να παρατηρηθεί κυτταρική βλάβη και τραυματισμός των ιστών, η οποία συμβάλει στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους διαδικασίας (Pisoschi and Pop 2015). Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή εμπλέκονται σε αρκετές ασθένειες όπως ασθένειες του παχέος εντέρου συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου και των καρκίνων του παχέος εντέρου (Bhattacharyya et al. 2014), είναι σημαντικό να αναζητηθούν εναλλακτικές θεραπείες για την ελαχιστοποίηση αυτών των επιπτώσεων και την προώθηση της υγείας. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα εστιάζεται σε

φυσικά προϊόντα λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους (Hussain et al., 2016) και των λιγότερων παρενεργειών σε σύγκριση με την συνθετική φαρμακευτική αγωγή (Toreti et al. 2013).

Η ζύμωση του γάλακτος από κλασικά βακτήρια εκκίνησης (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. και *Bulgarius Streptococcus thermophilus*) αλλάζει τις ιδιότητες του γάλακτος και αυξάνει την πεπτικότητα του με την μείωση της συγκέντρωσης λακτόζης και του pH. Το ζυμωμένο γάλα έχει υψηλότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε σύγκριση με το κανονικό γάλα, λόγω του περιεχόμενου του σε βακτήρια γαλακτικού οξέος και των προϊόντων που δημιουργούνται έπειτα από την ζύμωση του γάλακτος από αυτά, για παράδειγμα μπορούν να απελευθερώσουν βιολογικά ενεργά πεπτίδια από τις ανενεργές μορφές τους που υπάρχουν στην αντίστοιχη αλληλουχία της πρόδρομης πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη αλληλουχία και το μήκος των πεπτιδίων που απελευθερώνονται εξαρτάται από δύο κύριους παράγοντες: (α) την πρόδρομη πρωτεΐνη, η οποία είναι διαφορετική σε αλληλουχία ανάλογα με το ζωικό είδος και ακόμη και τη φυλή (Li et al. 2013) και (β) τα βακτήρια εκκίνησης, επειδή το πρωτεολυτικό σύστημα είναι εγγενές σε κάθε στέλεχος βακτηρίων. Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους για τον προσδιορισμό πεπτιδίων που προέρχονται από καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού γάλακτος με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς. Αυτά τα πεπτίδια απελευθερώνονται με ενζυμική υδρόλυση (Rival et al. 2001; Rival, Boeriu, and Wichers 2001; Suetsuna, Ukeda, and Ochi 2000; Hernández-Ledesma et al. 2005) και ζύμωση του γάλακτος (KUDOH et al. 2001).

Όπως έχει αποδειχθεί η πρόσληψη 2 μερίδων ζυμωμένου γάλακτος σε καθημερινή βάση μείωσε τον κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης έως και 38% σε σύγκριση με τα άτομα που δεν τρέφονταν με ζυμωμένο γάλα (Larsson et al. 2008). Η πρόσληψη γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση με *E. Faecium* RM11 L. *Fermentum* RM 28 είχε 21% και 29% λιγότερες πιθανότητες για καρκίνο του παχέος εντέρου (Thirabunyanon et al., 2009). Οι Reyes et al., (2008), διαπίστωσαν ότι το γάλα που είχε υποστεί ζύμωση με *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., είχε προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του ήπατος. Σε μια άλλη έρευνα, οι άνδρες και οι γυναίκες που κατανάλωναν γάλα σε καθημερινή βάση είχαν 53% χαμηλότερο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ενώ σε μια έρευνα στη Σουηδία οι γυναίκες που κατανάλωναν τέσσερις μερίδες γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, εμφάνιζαν 13% μικρότερο κίνδυνο του παχέος εντέρου (Larsson et al., 2005). Η κατανάλωση άνω των 500ml γάλα σε καθημερινή βάση μείωσε σημαντικά τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Aune et al. 2012) στο 12% (Cho et al. 2004). Τα

άτομα που καταναλώναν μικρότερη ποσότητα γάλακτος είχαν υψηλότερες πιθανότητες για καρκίνο του παχέος εντέρου (Alvarez-León, Román-Vinas, and Serra-Majem 2006).

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια του γάλακτος έχουν δείξει αντικαρκινικές ιδιότητες (Rodrigues et al. 2008). Για παράδειγμα, η λακτοφερρίνη είναι ευρέως γνωστή για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (Tsuda et al. 2010). Η από του στόματος χορήγηση λακτοφερρίνης που προέρχεται από βόειο γάλα μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο αρκετών τύπων καρκίνου (Tsuda et al. 2002). Οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος μπορούν να προστατεύουν από τον καρκίνο του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη (Parodi 2007). Η αντικαρκινική ικανότητα των καζεϊνών και των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος, μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης της γλουταθειόνης, η οποία είναι ευρέως γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση (Tsuda et al. 2010). Οι ανοσοσφαιρίνες όπως οι Ig1, IgM, IgA, IgG2 έχουν αντιμικροβιακές και ενισχυτικές δράσεις της γλουταθειόνης που είναι το σημαντικό αντιοξειδωτικό του κυττάρου (Mehra, Marnila, and Korhonen 2006). Η πρόσληψη 54g πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε καθημερινή βάση για μία περίοδο 12 εβδομάδων μείωσε τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση (Pal and Ellis, 2010). Οι Xu et al. 2008, παρατήρησαν ως ισχυρή συσχέτιση στη συγκέντρωση βιοδραστικών πεπτιδίων που παράγονται από τις δραστηριότητες της μικροχλωρίδας και των γαστρεντερικών ενζύμων που υπάρχουν σε αφθονία στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Boelsma and Kloek 2008).

Η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων διατροφικής πρόσληψης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων με την θνητότητα λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων αξιολογήθηκε και δε βρέθηκε συσχέτιση (O'Sullivan et al. 2013). Επιπλέον σε μεταγενέστερη μελέτη ωστόσο βρέθηκε μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων και της μη θανατηφόρας καρδιαγγειακής νόσου (Qin et al. 2015).

## **1.8 Γιαούρτι και οφέλη στην υγεία**

Το γιαούρτι είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν που καταναλώνεται ευρέως λόγω του γεγονότος ότι καλύπτει τις τρέχουσες διατροφικές ανάγκες και η κατανάλωση του έχει αναφερθεί ότι είναι σε θέση να ασκήσει μια σειρά από οφέλη για την υγεία (Farvin et al. 2010). Προηγούμενες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η τακτική κατανάλωση γιαουρτιού σχετίζεται με πολλά οφέλη για την υγεία, όπως η κατασταλτική οξεία φλεγμονή του εντέρου (που υποδεικνύεται από τη μειωμένη απτοσφαιρίνη στα κόπρανα) (Matsumoto, Ohishi, and Benno 2001), 18% χαμηλότερο κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 (M. Chen et al.

2014), 17% μειωμένο κίνδυνο υψηλής αρτηριακής πίεσης (Buendia et al. 2018) και 21% μείωση του κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (Buendia et al., 2018). Περαιτέρω έρευνα έχει δείξει ότι η ζύμωση που ακολουθείται από την πέψη με πεψίνη βοηθά στην απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων (Fitzgerald and Murray 2006).

Οι διατροφική αξία και τα οφέλη για την υγεία από το γιαούρτι έναντι του γάλακτος μπορούν πιθανότατα να αποδοθούν τόσο στην αλληλεπίδραση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (καλλιέργειες εκκίνησης γιαουρτιού) με το έντερο και τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Adolfsson, Meydani, and Russell 2004; Freitas 2017), και τα βιοενεργά πεπτίδια που παράγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης, καθώς και εκείνα τα πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά τη γαστρεντερική πέψη του ζυμωμένου προϊόντος (Chabance et al. 1998).

## **1.9 Σύνθεση όξινου ορού γιαουρτιού**

Με τη βοήθεια της σύγχρονης τεχνολογίας έχει γίνει μια αυξανόμενη συνειδητοποίηση ότι ο όξινος ορός γιαουρτιού είναι ένας πολύτιμος γαλακτοκομικός «θησαυρός», με λειτουργικές πρωτεΐνες και πεπτίδια, λακτόζη, λιπίδια, βιταμίνες και μέταλλα (Bylund 2015). Η σύνθεση του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η πηγή του γάλακτος, το είδος του γιαουρτιού που επεξεργάζεται, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος και η αποθήκευση μετά την άμελξη (Lucas et al. 2006). Ακόμη και ο όξινος ορός που συλλέγεται από την ίδια πηγή κάτω από ίδιες συνθήκες επεξεργασίας μπορεί να έχει διαφορετική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ανά τις εποχές (Lievore et al. 2015), για παράδειγμα οι Ozrenk and Inci 2008, βρήκαν υψηλότερα λιπαρά γάλακτος, πρωτεΐνες και ολικά στερεά στο γάλα που συλλέγεται το χειμώνα σε σύγκριση με το καλοκαίρι. Τέτοιες εποχιακές διακυμάνσεις στο γάλα, έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν το ιξώδες, τον διαχωρισμό του ορού και την οξύτητα στην παραγωγή γιαουρτιού (Sodini and Tong 2006). Για παράδειγμα το γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά μπορεί να είναι πιο επιρρεπές στη συναίρεση, ενώ το γιαούρτι που παρασκευάζεται από γάλα πλήρες σε λιπαρά διατηρούσε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ορού στη δομή του που φαίνεται ότι μειώνει τη συναίρεση (Brennan and Tudorica 2008).

### **1.9.1 Πρωτεϊνικό περιεχόμενο του όξινου ορού**

Τα τελευταία χρόνια οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος έχουν χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα λόγω των πολλαπλών οφελών για την υγεία (Arla Foods Ingredients, 2019). Η βιοδραστικότητα των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σχετίζεται άμεσα με τις δομικές τους ιδιότητες. Μπορούν να δράσουν ως πλήρες μόριο ή ως μερικώς υδρολυμένα ή μικρά βιοενεργά πεπτίδια. Τα αποτελέσματα βιοδραστικότητας και η αποτελεσματικότητα των

πρωτεϊνών ορού γάλακτος έχουν μελετηθεί τόσο σε ζωικά όσο και σε ανθρώπινα μοντέλα. Αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα, περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων βελτιωμένη πεπτικότητα και μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της τεχνολογικής επεξεργασίας για την παρασκευή του γιαουρτιού αλλά και της βακτηριακής ζύμωσης από τις καλλιέργειες εκκίνησης το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του όξινου ορού αποτελείται κυρίως από πεπτίδια που προέρχονται από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, ωστόσο υπάρχουν και αναφορές για απομόνωση ακέραιων πρωτεϊνών (α-γαλακταλβουμίνη και λακτοφερρίνη) από τον όξινο ορό (Rocha-Mendoza et al. 2021). Για αυτούς τους λόγους, οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια του όξινου ορού γάλακτος έχουν πιθανές εφαρμογές για εμπορευματοποίηση στην αγορά. Η ποικιλία στις εφαρμογές και στα οφέλη για την υγεία προβλέπουν περισσότερα προϊόντα με βάση τον όξινο ορό γάλακτος στο μέλλον.

### **β- Γαλακτογλοβουλίνη (β-Lactoglobulin, β-Lg)**

Η β-γαλακτογλοβουλίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού γάλακτος, αποτελώντας το ήμισυ της περιεκτικότητας στις πρωτεΐνες του ορού (το 50%), σε αντίθεση με το ανθρώπινο γάλα απ' όπου και απουσιάζει. Είναι πηγή τόσο βασικών όσο και διακλαδισμένων αμινοξέων. Μια πρωτεΐνη που εξαιτίας της μεγάλης υδροφοβίας μπορεί να δεσμεύει μη πολικά μόρια όπως η ρετινόλη (Βιταμίνη Α) και τα λιπαρά οξέα, ένας φορέας μικρών υδρόφοβων μορίων συμπεριλαμβανομένου του ρετινοϊκού οξέος υπάρχει στη δομή της β-γαλακτογλοβουλίνης. Αυτή η πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τις λεμφικές αποκρίσεις (Gurpta 2012; Yolken et al. 1985).

Έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 11 γενετικές παραλλαγές της με τις πιο συχνές τις Α και Β, με μοριακό βάρος περίπου 18.000 Da και 162 αμινοξέα στο μόριο τους (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009; Μάντης κ.α., 2015) επιπλέον, η β- γαλακτογλοβουλίνη είναι η πιο αλλεργιογόνος πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος (Μάντης κ.α., 2015). Οι Le Maux et al. 2012 απέδειξαν ότι η β-γαλακτογλοβουλίνη δρα ως μόριο φορέας που μεταβάλλει την βιοπροσβασιμότητα του λινελαϊκού και λινολεϊκού οξέος. Παρέχει αντίσταση κατά της γαστρικής και προσομοιωμένης δωδεκαδακτυλικής πέψης. Χρησιμεύει επίσης ως πιθανώς φορέας για τη χορήγηση γαστρικών ασταθών υδρόφοβων φαρμάκων. Έτσι, έχει μεγάλες δυνατότητες να χρησιμεύσει ως ρεαλιστική υποψήφια πρωτεΐνη για ασφαλή χορήγηση και προστασία των ευαίσθητων στο pH φαρμάκων στο στομάχι (Mehraban et al. 2013).

### **α- Γαλακταλβουμίνη (α- Lactalbumin, α- La)**

Η α-γαλακταλβουμίνη περιλαμβάνει περίπου το 13 έως 19% των συνολικών πρωτεϊνών του όξινου ορού. Αυτή η πρωτεΐνη αποτελείται από απαραίτητα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης

της λυσίνης, της τρυπτοφάνης, της λευκίνης και των θειούχων αμινοξέων (κυστεΐνη και μεθειονίνη). Έχουν αναφερθεί οφέλη για την υγεία από την α-La (των βοοειδών). Για παράδειγμα η α-La μπορεί να συνδεθεί με το ελαϊκό οξύ, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που ονομάζεται BAMLET, και στη περίπτωση της ανθρώπινης πρωτεΐνης HAMLET. Αυτά τα σύμπλοκα αναφέρεται ότι έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω της θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων, της επαγωγής της λυσοσωμικής αποσταθεροποίησης και της προώθησης της οδού κυτταρικού θανάτου (Rammer et al. 2010). Επιπλέον, η α-La συμβάλλει στη διατροφή των βρεφών και ενηλίκων. Στο βρεφικό γάλα η α-La βελτιώνει την ανοσολογική απόκριση, προάγει την υγεία του εντέρου και αυξάνει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ιδιαίτερα του σιδήρου και του ψευδαργύρου. Στους ενήλικες η πρωτεόλυση α-La παράγει βιοενεργά πεπτίδια με αντιβακτηριακές και πρεβιοτικές ιδιότητες και επίσης αυξάνει την πρωτεΐνη στους σκελετικούς μύες (Layman, Lönnerdal, and Fernstrom 2018).

#### **Λακτοφερρίνη ή Γαλακτοσιδερίνη (Lactoferrin, LF)**

Η λακτοφερρίνη είναι μια σφαιρική γλυκοπρωτεΐνη που αντιπροσωπεύει μεταξύ 1 και 2% των πρωτεϊνών του όξινου ορού γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες του γάλακτος με πολυλειτουργικές δραστηριότητες (Smithers 2015; Guo and Wang 2016). Η λακτοφερρίνη είναι επίσης γνωστό ότι είναι ένα σημαντικό αμυντικό μόριο του ξενιστή και εκτελεί μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες όπως αντιμικροβιακή και αντική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, ανοσορυθμιστική και αντιοξειδωτική δράση (Gupta and Parkash, 2016). Οι αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες αποδίδονται στη δέσμευσή και αποτελεσματική μεταφορά του σιδήρου, με ικανότητα δέσμευσης 2 ατόμων σιδήρου ανά μόριο, ο οποίος αφενός μεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη πολλών ειδών βακτηριών και ιών, αφετέρου προκαλεί οξειδωτική βλάβη των νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκινωμάτων, καθώς και την αδρανοποίηση ορισμένων επιβλαβών μικροοργανισμών (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009; Μάντης κ.α., 2015). Μια άλλη βιολογική λειτουργία της λακτοφερρίνης, είναι η παροχή μιας αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης δέσμευσης σιδήρου στους ιστούς, και ενδεχομένως της προώθησης της ανάπτυξης των ζωικών κυττάρων όπως λεμφοκύτταρα και εντερικά κύτταρα (Losnedahl et al. 1998).

#### **Αλβουμίνη του ορού (Bovine Serum Albumin, BSA)**

Η αλβουμίνη του ορού είναι ένα μεγάλο μακρόστενο μόριο με 582 αμινοξέα, αποτελώντας μια πηγή όλων των βασικών απαραίτητων αμινοξέων. Οι βιολειτουργικές ιδιότητες των

πεπτιδίων που προέρχονται από την αλβουμίνη είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητες. Αποτελεί περίπου το 6% των οροπρωτεϊνών. Έχει τις ίδιες φυσικές και ανοσογενετικές ιδιότητες με την αλβουμίνη του ορού του αίματος και η παρουσία της στο γάλα θεωρείται ότι οφείλεται στη διαρροή του από το αίμα του ζώου. Η πιο σημαντική ιδιότητα της αλβουμίνης του ορού είναι η ικανότητά της να δεσμεύεται σε διάφορους συνδέτες αναστρέψιμα. Είναι ο κύριος μεταφορέας των λιπαρών οξέων και μπορεί να συνδεθεί και με ελεύθερα λιπαρά οξέα και άλλα λιπίδια καθώς και με αρωματικές ενώσεις. Συνδέεται επίσης και με τα λιπαρά οξέα που είναι αποθηκευμένα στο ανθρώπινο σώμα συμμετέχοντας και έτσι στη σύνθεση των λιπιδίων. Το BSA αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου λόγω της ρύθμισης των δραστηριοτήτων των αυτοκρινών ρυθμιστικών παραγόντων ανάπτυξης και διαθέτει αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009; Μάντης κ.α., 2015; Gupta and Prakash 2017).

### **Ανοσογλοβουλίνες ή ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, Igs)**

Το κλάσμα του ορού του γάλακτος περιέχει σημαντική ποσότητα ανοσοσφαιρινών, η οποία αποτελεί περίπου το 10-15% των οροπρωτεϊνών του γάλακτος (El-Loly 2007). Είναι γλυκοπρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους που παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Διακρίνονται πέντε επιμέρους τάξεις ανοσοσφαιρινών από τις οποίες στο γάλα απαντώνται μόνο οι τρεις από αυτές, οι IgG (IgG<sub>1</sub> και IgG<sub>2</sub>), IgA και IgM. Η βασική δομική μονάδα είναι ίδια για όλες τις ανοσοσφαιρίνες και αποτελείται από δύο βαριές (heavy) και δύο ελαφριές (light) αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η IgG βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο γάλα με μοριακό βάρος 150.000 Da και αποτελείται από μια τέτοια δομική μονάδα. Η IgM είναι ένα εξαιρετικά μεγάλο μόριο (περίπου 900.000 Da μοριακό βάρος) και αποτελεί ένα πενταμερές συστατικών τύπου IgG. Τα αντισώματα αυτά θεωρούνται ως αγλουτινίνες ή συγκολλητίνες, επειδή προκαλούν συσσωμάτωση σωματιδίων όπως είναι οι ιοί και τα βακτήρια, αφού πρώτα προσκολληθούν στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών μεμβρανών. Στις IgM του γάλακτος περιλαμβάνονται και οι λακτενίνες L1 και L3, οι οποίες είναι αντισώματα έναντι μερικών στελεχών του *Lactococcus lactis*, επίσης η IgM περιλαμβάνει μια κρυογλοβουλίνη, η οποία συσσωματώνει τα λιποσφαίρια. Η IgA είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο δομικές μονάδες, που συνδέονται μεταξύ τους με το εκκριτικό συστατικό και την J- αλυσίδα και έχει μοριακό βάρος περίπου 385.000 Da (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009; Μάντης κ.α., 2015).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει το θεραπευτικό δυναμικό των ανοσοσφαιρινών. Είναι γνωστό ότι έχουν ζωτικές βιολογικές ιδιότητες. Σε μία *in vitro* μελέτη καταδείχθηκε ότι η IgG καταστέλλει την πολλαπλασιαστική απόκριση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε συγκεντρώσεις μόλις 0,3 mg/ml. Εξήχθη περαιτέρω και το συμπέρασμα πως η IgG του βόειου γάλακτος με συγκέντρωση 0,6- 0,9 mg/ml προσδίδει ανοσία που μεταδίδεται στον άνθρωπο (El-Loly 2007).

### Πρωτεόζες – πεπτόνες (Proteose-Peptide, PP)

Οι πρωτεόζες- πεπτόνες διαφέρουν σημαντικά από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού, με χαρακτηριστικό την ανθεκτικότητα στη θέρμανση. Το κλάσμα αυτό αποτελεί περίπου το 12% των οροπρωτεϊνών και είναι διαλυτό σε όξινες συνθήκες (pH 4,6). Είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα πεπτιδίων, τα περισσότερα από τα οποία παράγονται με ενζυμική διάσπαση της β-καζεΐνης από τη δράση της ενδογενούς πλασμίνης, ενώ μερικά είναι αυτόχθονα συστατικά του γάλακτος (Μάντης κ.α., 2015). Στην ομάδα αυτή εντάσσεται και το συστατικό PP3, που είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των λιποσφαιρίων (Καμιναρίδης και Μουάτσου, 2009). Επιπλέον, παράγεται κατά τη ζύμωση του άπαχου γάλακτος και ενισχύει την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων από κύτταρα ανθρώπινου υβριδώματος (Krissansen 2007).

**Πίνακας 1.3:** Σύνθεση πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε αγελαδινό, αίγιο και πρόβειο γάλα

Παράμετροι	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αίγιο
Πρωτεΐνες ορού γάλακτος (g/L)	6,46	10,76	6,14
β-γαλακτογλοβουλίνη (%)	59,3	61,1	54,2
α-γαλακταλβουμίνη (%)	16,2	10,8	21,4
Ανοσοσφαιρίνη (%)	15,0	20,0	11,5
Αλβουμίνη του ορού/ λακτοφερρίνη (%)	9,5	8,1	12,8

(Khan et al. 2019)

### 1.9.2 Λακτόζη

Το σάκχαρο του γάλακτος, η λακτόζη, είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο αιγοπρόβειο και αγελαδινό γάλα. Συντίθεται από τη γλυκόζη στο μαστικό αδένα με την απαιτούμενη ενεργή



συμμετοχή της πρωτεΐνης του γάλακτος α-γαλακταλβουμίνη (Larson and Smith 1974). Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, τα οποία μπορεί να υπάρχουν σε μικρές ελεύθερες ποσότητες (Young W Park 2017).

Η λακτόζη είναι μείζονος σημασίας για τη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας μεταξύ της ροής του αίματος και των κυψελιδικών κυττάρων του μαστικού αδένου κατά τη σύνθεση του γάλακτος και της έκκρισης στον κυψελιδικό αυλό και στο σύστημα αγωγών του μαστού (Larson and Smith, 1974). Η λακτόζη βρίσκεται σε διάφορες συγκεντρώσεις στο γάλα όλων των θηλαστικών και είναι ένα πολύτιμο θρεπτικό συστατικό επειδή ευνοεί την εντερική απορρόφηση ασβεστίου, μαγνησίου και φωσφόρου και τη χρήση της βιταμίνης D (Campbell and Marshall, 1975). Η λακτόζη στα μηρυκαστικά είναι χαμηλότερη στην αρχή της γαλουχίας, στο πρωτόγαλα και προς το τέλος της γαλουχίας, σε αντίθεση με τη συμπεριφορά των περιεχόμενων σε λίπος και πρωτεΐνες στο γάλα (Pulina and Bencini 2004; Haenlein and Wendorff 2006).

### **1.9.3 Άλατα**

Το γάλα περιέχει οργανικά και ανόργανα άλατα, με περιεκτικότητα περίπου 0,9%, τα οποία βρίσκονται ή μπορούν να βρεθούν στο γάλα ως ιόντα ή σε ισορροπία με ιόντα. Η σύσταση τους επηρεάζεται από το είδος του ζώου, καθώς και για το ίδιο είδος του ζώου επηρεάζεται από τη φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, τη διατροφή και τη κατάσταση υγείας του μαστού (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009). Χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τα κύρια άλατα που υπάρχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο γάλα και τα δευτερεύοντα ή ιχνοστοιχεία. Στα κύρια άλατα ανήκουν το κάλιο, το νάτριο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο, με φωσφορικές, κιτρικές, χλωριούχες, θεικές και ανθρακικές ρίζες. Ενώ στα ιχνοστοιχεία ανήκουν ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, ο σίδηρος, ο μόλυβδος, το μαγγάνιο, το βρώμιο, το ιώδιο κ.λπ. δεν βρίσκονται όλα τα άλατα σε διαλυτή μορφή στον ορό. Ορισμένα όπως τα χλωριούχα και τα άλατα του νατρίου και του καλίου έχουν υψηλή διαλυτότητα και βρίσκονται σχεδόν εξολοκλήρου στον ορό του γάλακτος. Ενώ το ασβέστιο και ο φώσφορος ένα μόνο μέρος τους βρίσκεται στον ορό (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Το γάλα και το γιαούρτι παρόλο που έχουν παρόμοιες μεταλλικές συνθέσεις, ορισμένα μέταλλα όπως το ασβέστιο και ο φώσφορος είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμα στο γιαούρτι παρότι στο γάλα. Γενικά το γιαούρτι έχει λιγότερη λακτόζη και περισσότερο γαλακτικό οξύ, γαλακτόζη, πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα και ελεύθερα λιπαρά οξέα από το γάλα (Rasic and Kurmann 1978; Shahani and Chandan 1979). Η ζύμωση του γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα τη

πλήρη διαλυτοποίηση του ασβεστίου, του μαγνησίου και του φωσφόρου και τη μερική διαλυτοποίηση των ιχνοστοιχείων (Terre, 1985). Ως εκ τούτου η ζύμωση του γάλακτος μπορεί να ασκήσει κάποια επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των ανόργανων στοιχείων (Balasubramanya, Natarajan, and Rao 1984).

Ο ορός του γάλακτος έχει υψηλή θρεπτική αξία, χωνεύεται και αφομοιώνεται εύκολα. Είναι μια πλούσια πηγή μετάλλων όπως ασβέστιο, φώσφορο, νάτριο, κάλιο, χλώριο, σίδηρο, χαλκός ψευδάργυρος και μαγνήσιο, καθώς και βιταμίνες του συμπλέγματος Β. Ο όξινος ορός σε σύγκριση με τον γλυκό ορό, έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε μέταλλα, (7,5-7,9 g/L και 5,0-5,2 g/L, αντίστοιχα) (Papademas and Kotsaki 2019).

#### **1.9.4 Λίπος όξινου ορού γάλακτος**

Ο όξινος ορός γαλακτοκομικών προϊόντων αν και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα έχει σημαντικές δυνατότητες ως πολύτιμη πηγή φωσφολιπιδίων γάλακτος που προάγουν την υγεία. Στον όξινο ορό τα φωσφολιπίδια βρίσκονται με τη μορφή θραυσμάτων μεμβράνης λιποσφαιρίων, μικρών σφαιριδίων λίπους και λιποπρωτεϊνών (Rombaut, Dejonckheere, and Dewettinck 2007). Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει άμεσα τα οφέλη για την υγεία του λιπιδικού κλάσματος. Ωστόσο, αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι τα φωσφολιπίδια του γάλακτος, προσφέρουν σημαντικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, όπως στην ανάπτυξη και υγεία των νευρώνων, στη λειτουργία του εντερικού φραγμού, την απορρόφηση της χοληστερόλης και στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στη φλεγμονή, στην υγεία του δέρματος και στις ιδιότητες καταπολέμησης του καρκίνου (Fontecha et al. 2020; Anto et al. 2020).

#### **1.9.5 Οργανικά οξέα**

Πολλά οργανικά οξέα μπορούν να βρεθούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ωστόσο ένα από τα πιο χαρακτηριστικά του όξινου ορού είναι το γαλακτικό οξύ μια ένωση που λαμβάνεται από τη ζύμωση της λακτόζης από βακτηριακές καλλιέργειες κατά την παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού και όχι μόνο (G. Q. Chen et al. 2016). Ο όξινος ορός γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να περιέχει έως και 16 φορές τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που βρίσκεται στον γλυκό ορό γαλακτοκομικών προϊόντων (Rodríguez, Martínez, and Urista 2011). Παραδοσιακά, το γαλακτικό οξύ θεωρείται ως μεταβολίτης που μπορεί να επηρεάσει τις οργανοληπτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των τροφίμων. Ωστόσο η έρευνα έχει δείξει ότι μπορεί να έχει πολλές βιοδραστικές ιδιότητες.

Το γαλακτικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε μακροφάγα κύτταρα όπως τα THP-1. Αυτή η αντιφλεγμονώδης δράση δεν σχετίζεται με την μείωση του

pH του γαλακτικού οξέος αλλά με μια παρέμβαση στις φλεγμονώδεις οδούς σηματοδότησης (Watanabe et al. 2009) και μειωμένα επίπεδα νιτρικού οξέος και των ιντερλευκινών IL-6 και IL-10 (Kellum, Song, and Li 2004).

### **1.9.6 Αντιοξειδωτικά ένζυμα του ορού γάλακτος**

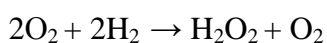
Ο ορός του γάλακτος περιέχει και άλλα πρωτεϊνικά συστατικά μεταξύ των οποίων πολλούς τύπους ενζύμων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009; (Gupta and Prakash 2017).

#### **Καταλάση (Catalase, CAT)**

Η καταλάση του γάλακτος είναι μια πρωτεΐνη αίμης και το μοριακό τους βάρος είναι 200 kDa με ισοηλεκτρικό pH 5.5. Αυτό το ένζυμο είναι σταθερό σε ένα ευρύ φάσμα pH 5-10 και ωστόσο χάνει γρήγορα την δραστηριότητα από αυτό το εύρος pH (Abbas et al. 2014). Οι περισσότερες από τις καταλάσες περιέχουν αίμη και προκαλούν τη διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μια χημική αντίδραση κατά την οποία το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί οξείδωση των άλλων μορίων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, κατά συνέπεια το ένα μετατρέπεται σε O<sub>2</sub> και τα άλλα δυο μετατρέπονται σε μόρια έλξης H<sub>2</sub>O) (Silanikove, Merin, and Leitner 2006). Μια πολογραφική μέθοδος έδειξε ότι η μέση δραστηριότητα καταλάσης στο αγελαδινό γάλα ήταν 1,95 U/ml (Niklowitz et al. 2005). Η συγκέντρωση καταλάσης στο ανθρώπινο γάλα είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από το αγελαδινό γάλα (Tijerina- Sáenz, Innis, and Kitts 2009).

#### **Δισμουτάση των υπεροξειδίων (Superoxide Dismutase, SOD)**

Η δισμουτάση των υπεροξειδίων καταλύει την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών του υπεροξειδίου (O<sub>2</sub>) και προστατεύει τα κύτταρα από επιβλαβείς επιδράσεις με την ακόλουθη αντίδραση :



Η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ή άλλοι αναγωγικοί παράγοντες μετατρέπουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O, το υπεροξειδίο του υδρογόνου που σχηματίζεται από το O<sub>2</sub> και οι οξειδάσες, αποβάλλονται από τις καταλάσες και τις υπεροξειδάσες (Patrick F Fox, McSweeney, and Paul 1998). Το κυτοσολικό Cu/Zn-SOD, το μιτοχονδριακό Mn-SOD και το εξωκυτταρικό EC-SOD είναι οι κύριες μορφές του SOD (Matés, Pérez-Gómez, and De Castro 1999). Το SOD μπορεί να αναστείλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Στο αγελαδινό γάλα το SOD υπάρχει αποκλειστικά στο κλάσμα του αποβουτυρωμένου γάλακτος, με συγκέντρωση από 0,15 mg έως 2,4 mg/ Lt (Fang, Yang, and Wu 2002). Το ανθρώπινο γάλα έχει 2 έως 2,3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση SOD από το αγελαδινό γάλα.

## **Υπεροξειδάση γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GSHPx)**

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο και παρέχει προστασία από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Καταλύει η διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων (R-OOH) από τη γλουταθειόνη (γGlu.Gys.Gly), σύμφωνα με την επόμενη χημική αντίδραση (Torres et al., 2003).



Περισσότερο από το 90% της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης υπάρχει στο γάλα ως εξωκυτταρικό ένζυμο και είναι το μόνο ένζυμο που καθορίζει το σελήνιο (περίπου το 30% του συνόλου). Η συγκέντρωσή του ποικίλλει μεταξύ των θηλαστικών και η συγκέντρωσή του είναι της τάξης του ανθρώπου > αιγοειδών > βοοειδών (P F Fox and Kelly 2006). Η συγκέντρωση της GSHPx στο αγελαδινό γάλα κυμαίνεται από 12 έως 30 U/ml και η δράση του εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση σεληνίου. Η αντιοξειδωτική δράση και η περιεκτικότητα σε σελήνιο μειώνονται με την πάροδο της γαλακτικής περιόδου (Quiles et al. 2006).

### **1.10 Αντιοξειδωτική δράση**

#### **1.10.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων και μηχανισμός δράσης**

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται στα αμινοξέα που περιέχουν θείο όπως η κυστεΐνη, στις βιταμίνες A και E, στα καροτενοειδή, στα ενζυμικά συστήματα, στη δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), στη καταλάση και στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Usta and Yilmaz-Ersan 2013).

Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης που προκαλείται από την πρωτεΐνη ορού του γάλακτος έχει αποδοθεί στη συνεργική δράση των σουλφυδρυλικών ομάδων, στη σάρωση των ελεύθερων ριζών από συγκεκριμένα αμινοξέα και την χηλοποίηση του σιδήρου (Tong et al. 2000). Τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια θα μπορούσαν να βρουν κατάλληλες εφαρμογές για συγκεκριμένους πληθυσμούς όπως οι ηλικιωμένοι λόγω του αυξημένου κινδύνου σαρκοπενίας και οξειδωτικού στρες με τη γήρανση (Power, Jakeman, and FitzGerald 2013).

#### **1.10.2 Αντιοξειδωτικά συστατικά**

Τα αντιοξειδωτικά είναι χημικές ουσίες που μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες παράγονται συνεχώς στο σώμα (Yazdanparast and Ardestani 2007). Για την παραγωγή ενέργειας, η οξείδωση είναι απαραίτητη στον ζωντανό οργανισμό για τις βιολογικές διεργασίες. Ωστόσο το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει σοβαρή βλάβη

στα βιολογικά συστήματα. Είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι στο ανθρώπινο σώμα παράγονται αδιάκοπα ROS. Οι ανεξέλεγκτες ελεύθερες ρίζες στο σώμα μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αθηροσκλήρωση, διαβήτη, επιτάχυνση της γήρανσης, καρδιαγγειακές παθήσεις και διάσπαση ζωτικών βιοχημικών ενώσεων (Kris-Etherton et al. 2002). Η πρόσληψη αντιοξειδωτικών με τη μορφή αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε αντιοξειδωτικά μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες και τις βλάβες (Y.-C. Wang, Yu, and Chou 2006).

Οι μεταβολικές ασθένειες συσχετίζονται στενά με τον τρόπο ζωής και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής έχουν μεγάλο αντίκτυπο στα πρότυπα των ασθενειών, περίπου πριν από 20-30 χρόνια, οι μολυσματικές ασθένειες ήταν περισσότερες από τις μη μεταδοτικές ασθένειες, αλλά τώρα οι μη μεταβολικές/ μεταβολικές ασθένειες βρίσκονται στην υψηλότερη πλευρά. Τα υγιεινά/ λειτουργικά τρόφιμα θα πρέπει να επιλέγονται ώστε να αποφεύγονται ή να ελαχιστοποιούνται οι μη μεταδοτικές ασθένειες, όπως ο διαβήτης, οι καρκίνοι και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Jiang et al. 2007). Οι ζήτηση για τρόφιμα που περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά αυξάνεται σε όλο τον κόσμο. Μεγάλος αριθμός τροφίμων και γαλακτοκομικών προϊόντων συμπληρώνεται με φυσικά αντιοξειδωτικά (Santillo et al. 2009).

Οι ρίζες υπεροξειδίου και οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν να ανασταλούν από τα αντιοξειδωτικά συστήματα του γάλακτος (Tong et al. 2000). Το ανθρώπινο σώμα διαθέτει μηχανισμούς για την εξουδετέρωση των ROS. Η σημαντική γραμμή άμυνας έναντι των ROS αποτελείται από ένζυμα όπως το υπεροξειδίο της γλουταθειόνης, η καταλάση και το υπεροξειδίο της δισμουτάσης, η ουβικινόλη και το ουρικό οξύ (Karakaya AA Taş S 2001). Επιπλέον, η οξείδωση των λιπιδίων είναι ο κύριος λόγος για την χημική αλλοίωση των τροφίμων και των γαλακτοκομικών και οδηγεί στην παραγωγή αλλαγών στη θρεπτική αξία, τη γεύση και την υφή των τροφίμων (Erel 2004).

### **1.10.3 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού του γάλακτος**

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε εφαρμογές τροφίμων και μη εδώδιμων αυξάνεται σε όλο τον κόσμο. Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος έχουν υψηλή βιολογική αξία, παρόλα αυτά περίπου το 30-35% του ορού των γαλακτοκομικών προϊόντων εξακολουθεί να απορρίπτεται (O'keeffe et al., 2017). Στις βιομηχανίες τροφίμων, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές, πηκτωματοποιητές και διογκωτικοί παράγοντες. Η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος είναι επιστημονικά τεκμηριωμένη και τα αντιοξειδωτικά του ορού γάλακτος μπορούν να

αναστείλουν αποτελεσματικά την οξειδωση των λιπιδίων (Akhtar et al., 2018). Η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος οφείλεται στη χηλοποίηση των μετάλλων μετάπτωσης από τη λακτοφερρίνη και στη σάρωση των ελεύθερων ριζών απόθειούχα αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη και η τυροσίνη (Πίνακας 1.4) (Borkoná and Snášelová 2005; Lorenzo et al. 2018; Santos-Sánchez et al. 2017; Lippolis and Nally 2018). Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, ενισχύουν το επίπεδο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η οποία θεωρείται ως ένα από τα πιο σημαντικά υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά που παράγονται στο σώμα (Clouatre 1999; Pais Chanfrau et al. 2017).

Η αντιοξειδωτική δράση στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση οφείλεται κυρίως στα βιοενεργά πεπτίδια που απελευθερώνονται από την  $\alpha$ -γαλακταλβουμίνη, την  $\beta$ -γαλακτογλοβουλίνη και την  $\alpha$ -καζεΐνη (Park and Nam, 2015). Η λακτοφερρίνη και η καζεΐνη μπορούν να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τη δημιουργία ριζών υπεροξειδίου, τις ουσίες που αντιδρούν μεθειοβαρβιτουρικό οξύ, την πρόσληψη οξυγόνου και ελεύθερων ριζών οξειδίου του σιδηρού (J. Chen, Lindmark-Månsson, and Åkesson 2000). Τα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες του ορού γάλακτος έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (J. Chen, Lindmark-Månsson, and Åkesson 2000). Η προσθήκη πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε γαλάκτωμα σογιέλαιου αύξησε την οξειδωτική σταθερότητα (Benzie and Devaki 2018). Τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του γαλακτώματος ελαίου σολομού αυξήθηκαν ως συνάρτηση της προσθήκης πρωτεϊνών ορού γάλακτος (Fardet and Rock 2018).

Οι ιδιότητες των αντιοξειδωτικών πεπτιδίων οφείλονται στα χηλικά ιόντα μετάλλων, στην αναστολή των ελεύθερων ριζών, στην από-οξυγόνωση και στην αναστολή της ενζυμικής και μη ενζυμικής υπεροξειδωσης των λιπιδίων (El-Fattah et al., 2018). Σε διάφορα πεπτίδια με αντιοξειδωτική δράση η παρουσία τυροσίνης, τρυπτοφάνης μεθειονίνης, λυσίνης και κυστεΐνης στην πεπτιδική αλληλουχία είναι ένα καλό χαρακτηριστικό, επειδή αυτά τα αμινοξέα είναι σε θέση να ανάγουν τα ιόντα  $Fe^{+3}$  έως  $Fe^{+2}$  και να συμπλοκοποιήσουν τα μεταλλικά ιόντα  $Fe^{+2}$  και  $Cu^{+2}$  (Carrasco-Castilla et al. 2012; Huang et al. 2010). Το προφίλ των αμινοξέων του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος παρουσιάζονται στον πίνακα 1.4.

**Πίνακας 1.4:** Προφίλ των αμινοξέων του αγελαδινού ,αίγειου και πρόβειου γάλακτος

Αμινοξέα (%)	Αγελαδινό	Αίγαιο	Πρόβαιο
Ασπαρτικό οξύ	7,8	7,4	6,5
Θρεονίνη	4,5	5,7	4,4
Σερίνη	4,8	5,2	3,4
* Γλουταμινικό οξύ	23,2	19,3	14,5
Προλίνη	9,6	14,6	16,2
* Κυστεΐνη	0,6	0,6	0,9
Γλυκίνη	1,8	2,1	3,5
Αλανίνη	3,0	3,6	2,4
* Βαλίνη	4,8	5,7	6,4
* Μεθειονίνη	1,8	3,5	2,7
* Ισολευκίνη	4,2	7,1	4,6
* Λευκίνη	8,7	8,2	9,9
* Τυροσίνη	4,5	4,8	3,8
Φαινυλαλανίνη	4,8	6,0	4,3
* Ιστιδίνη	3,0	5,0	6,7
Λυσίνη	8,1	8,2	7,8

\*: αμινοξέα που έχουν αντιοξειδωτική δράση στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

(Khan et al. 2019)

### 1.11 Αντιμικροβιακή δράση συστατικών του γάλακτος

Το γάλα είναι μια καθιερωμένη και υγιεινή πηγή ενέργειας, πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων. Εκτός από την αξία του ως πηγή θρεπτικών συστατικών, έχει προκύψει ενδιαφέρον για την αντιμικροβιακή ικανότητα του γάλακτος και για το πως αυτή μπορεί να βρει εφαρμογές στον έλεγχο της μαστίτιδας, την ανθρώπινη υγεία και τα λειτουργικά τρόφιμα για τους ανθρώπους. Ένας αριθμός πρωτεϊνών που βρίσκονται στο γάλα υπό διάφορες συνθήκες παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση.

Το γάλα είναι ένα πρότυπο παράδειγμα μοριακού συστήματος που περιέχει ουσίες με εξαιρετική ικανότητα πρόληψης και αναστολής μικροβιακών λοιμώξεων (Floris et al. 2003). Η συνολική αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα του γάλακτος που προκύπτει από τη συνεργική δράση των πεπτιδίων γάλακτος και των πρωτεϊνών εκτός των ανοσοσφαιρινών, όπως η λακτοφερρίνη, η γαλακτοϋπεροξειδάση και η λυσοζύμη, είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη των μεμονωμένων μορίων (Clare and Swaisgood 2000). Τα αντιμικροβιακά συστατικά

του γάλακτος μπορεί να παρουσιάσουν αντιβιοτική δράση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια φυσική εναλλακτική λύση για τα αντιβιοτικά (Mills et al. 2011).

### **1.11.1 Αντιμικροβιακές ουσίες**

Οι αντιμικροβιακές ουσίες είναι ενώσεις που είτε είναι συστατικά του γάλακτος (ενδογενείς), είτε εισέρχονται σε αυτό. Στην πρώτη κατηγορία βρίσκουμε τις ανοσοσφαιρίνες (Ig), την ξανθίνη-οξειδάση (XO), τις συγκολλητίνες (αγλουτινίνες), τα φαγοκύτταρα, τη λυσοζύμη που λύει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, την λακτοφερρίνη και την τρανσφερρίνη (Transferrin, Tf) που δεσμεύουν τον απαραίτητο για τα μικρόβια σίδηρο (Fe), διάφορες πτητικές ουσίες, τη γαλακτοϋπεροξειδάση που καταλύει τις αντιδράσεις στις οποίες μετέχουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και οι θειοκυανιούχες ρίζες. Στη δεύτερη κατηγορία των εισερχόμενων ανασταλτικών ουσιών ανήκουν τα διάφορα αντιβιοτικά, απολυμαντικά, αντισηπτικά, η νισίνη που παράγεται από ορισμένα στελέχη του *Lactococcus lactis* κ.ά. (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Ενώσεις όπως οι ανοσοσφαιρίνες, η λακτοφερρίνη, η γαλακτοϋπεροξειδάση, μπορούν να επιβιώσουν μετά το πέρασμα τους από το στομάχι και το λεπτό έντερο και να ασκούν τις βιολογικές τους επιδράσεις στο παχύ έντερο. Τα σημαντικά συστατικά του ορού γάλακτος που παρέχουν αντιμικροβιακή δράση στην εντερική οδό είναι οι ανοσοσφαιρίνες όπως οι IgG, IgM και IgA (Gupta and Prakash 2017).

### **1.11.2 Πρωτεΐνες του όξινου όρου με αντιμικροβιακή δράση**

#### **Ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα)**

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι προστατευτικές πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για τη μεταφορά της παθητικής ανοσίας από τη μητέρα στο νεογνό. Τα νεογνήνητα από πολλά είδη θηλαστικών δεν γεννιούνται με αποτελεσματικό ανοσοποιητικό σύστημα. Οι ανοσοσφαιρίνες προστατεύουν το νεογνό από λοιμώξεις, μέχρι να αναπτυχθεί το δικό του ανοσοποιητικό σύστημα. Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούν συστατικό του φυσικού αμυντικού μηχανισμού (Losnedahl et al. 1998). Συντίθενται ως απόκριση στη παρουσία ξένων σωματιδίων, όπως βακτήρια και ιοί. Η διαδικασία σύνθεσης είναι ειδική για το ξένο σωματίδιο που υπάρχει, με αποτέλεσμα μια δομή ανοσοσφαιρίνης είναι ικανή να αναγνωρίζει το ξένο σωματίδιο και να το αποβάλλει από το σώμα. Οι ανοσοσφαιρίνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο γάλα (Losnedahl et al. 1998).

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούν μια σύνθετη ομάδα στοιχείων που παράγονται από Β λεμφοκύτταρα και η συγκέντρωσή τους στον ορό είναι 0,7g/L, από τις βασικές κατηγορίες των Igs, η IgG αντιπροσωπεύει έως και το 80% (w/w) όλων των Igs στο γάλα ή τον ορό



γάλακτος, έχει μελετηθεί εκτενώς και χρησιμεύει ως μοντέλο βασικής δομικής μονάδας όλων των Igs (Madureira et al. 2007; De Wit 1989).

Υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν δείξει το θεραπευτικό δυναμικό των ανοσοσφαιρινών, καθώς διαθέτουν πολλές σημαντικές αντιμικροβιακές και αντικές ιδιότητες. Η φυσιολογική λειτουργία της Ig είναι να παρέχει ανοσία στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, παρέχουν προστασία από ασθένειες στα νεογέννητα μέσω παθητικής ανοσίας. Επιπλέον το γάλα με ανοσοσφαιρίνες είναι μια εξαιρετική πηγή μείωσης της αρτηριακής πίεσης (Sharma 2019; Sharpe, Gamble, and Sharpe 1994; Ormrod and Miller 1991; Staples, Freeman, and Gertjan 2006).

### **Λακτοφερρίνη ή Γαλακτοσιδερίνη (LF)**

Ο όξινος ορός γαλακτοκομικών προϊόντων ως παραπροϊόν είναι μια καλή πηγή λακτοφερρίνης ως αντιμικροβιακό συστατικό (Ward and Paz 2005). Η λακτοφερρίνη (LF) είναι γνωστή και ως αντιμικροβιακή πρωτεΐνη δέσμευσης σιδήρου της οικογένειας των τρανσφερινών, υπάρχει σε εξωκρινείς εκκρίσεις όπως το γάλα, τα δάκρυα, το σάλιο και τα περισσότερα άλλα εξωκρινή σωματικά υγρά. Απελευθερώνει το ισχυρό αντιμικροβιακό πεπτίδιο λακτοφερρικίνη (Lfcin) μέσω υδρόλυσης με πεψίνη. Η αντιμικροβιακή δράση των LF και Lfcin έχει μελετηθεί καλά (Murata et al. 2013). Η λακτοφερρικίνη, ένα μικρό κατιονικό πεπτίδιο, το οποίο είναι αρκετές φορές πιο ενεργό από τη λακτοφερρίνη (Ward and Paz 2005). Αν και δεν είναι φυσικό πεπτίδιο, η τεχνητή παραγωγή του μικρού πεπτιδίου λακτοφερρικίνης από λακτοφερρίνη δείχνει ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης ενάντια σε ζυμομύκητες, μύκητες, ιούς, πρωτόζωα, gram θετικά και gram αρνητικά βακτήρια (Haney et al. 2009). Έχει αποδειχθεί ότι η υδρολυμένη με πεψίνη λακτοφερρίνη (LF- hyd) έχει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από την άπεπτη (Bellamy et al. 1992). Γενικά, η συμπλήρωση λακτοφερρίνης στη διατροφή αυξάνει το ενεργειακό ισοζύγιο και το μεταβολισμό και μειώνει το λίπος (Zapata et al. 2017).

Η λακτοφερρίνη είναι μια έμφυτη αμυντική πρωτεΐνη και συστατικό του γάλακτος. Σε προηγούμενες μελέτες η λυσοζύμη και η IgA, έχει αναφερθεί ότι έχουν συνεργατικές επιδράσεις με την λακτοφερρίνη για την αναστολή της ανάπτυξης του *Escherichia coli* (Rogers and Synge 1978; Ellison 3rd and Giehl 1991). Η λακτοφερρίνη θεωρείται ότι παίζει αμυντικό ρόλο του ξενιστή στις επιφάνειες των βλεννογόνων. Εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση κατά των *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* και ποικίλων άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Arnold, Brewer, and Gauthier 1980). Έχει επίσης την τάση να προκαλεί βακτηριακό θάνατο αφού μπορεί και συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών

κατά gram βακτηρίων αναγνωρίζοντας μόρια όπως το LPS, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του λιποσακχαρίτη (Ellison 3rd, Giehl, and LaForce 1988) και μόρια όπως το λιποτειχοϊκό οξύ σε gram θετικά στελέχη (Rosa et al. 2017).

Έχει καταστεί προφανές ότι η από του στόματος χορήγηση λακτοφερρίνης ασκεί διάφορες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, όπως αντιμολυσματικές ιδιότητες όχι μόνο σε βρέφη, αλλά και σε ενήλικα ζώα και ανθρώπους (Wakabayashi, Yamauchi, and Takase 2006; Mamoru Tomita et al. 2009). Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα και ανθρώπους, δείχνουν ότι η από του στόματος χορήγηση μόνο της λακτοφερρίνης αποδείχθηκε ότι βελτιώνει την βακτηριακή εντερική χλωρίδα (Roberts et al. 1992; Teraguchi, Shin, Ozawa, et al. 1995; Teraguchi, Shin, Ogata, et al. 1995).

### **1.11.3 Ένζυμα όξινου ορού με αντιμικροβιακή δράση**

#### **Γαλακτοϋπεροξειδάση**

Ένα άλλο σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό που προέρχεται από τον ορό γάλακτος είναι το ένζυμο γαλακτοϋπεροξειδάση και αντιπροσωπεύει το 0,25-0,5% της συνολικής πρωτεΐνης που βρίσκεται στον ορό του γάλακτος και είναι το πιο άφθονο ένζυμο στον ορό του γάλακτος μετά την διαδικασία της πήξης. Είναι ανθεκτικό στη θερμότητα και επομένως η γαλακτοϋπεροξειδάση δεν αδρανοποιείται κατά τη διαδικασία παστερίωσης του γάλακτος, υποδηλώνοντας έτσι την σταθερότητά της ως συντηρητικό (Gupta and Prakash 2017).

Η γαλακτοϋπεροξειδάση παρέχει αμυντικό σύστημα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών από το πεπτικό σύστημα των νεογνών. Έχει την ιδιότητα να καταλύει ορισμένα μόρια και να μειώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αυτό το ενζυμικό σύστημα καταλύει την υπεροξειδωση του θειοκυανικού και ορισμένων αλογονιδίων (όπως το ιώδιο και το βρώμιο), το οποίο τελικά παράγει προϊόντα που αναστέλλουν ή/ και σκοτώνουν μια σειρά βακτηριακών ειδών. Το ένζυμο LPO λειτουργεί ως μη ανοσοποιητικό βιολογικό αμυντικό σύστημα των θηλαστικών και καταλύει την οξειδωση του θειοκυανικού ιόντος στο αντιβακτηριακό υποθειοκυανικό, το οποίο είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (Reiter and Perraudin 1991). Τα υποθειοκυανικά ιόντα διαταράσσουν τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό το «σύστημα γαλακτοϋπεροξειδάσης» χρησιμοποιείται επομένως σε ένα σύστημα συντήρησης γάλακτος. Τα φωσφολιπίδια που προέρχονται από ορό γάλακτος, όπως τα σφιγγολιπίδια, μεταβολίζονται στον γαστρεντερικό σωλήνα και παράγουν σφιγγοσίνη και λυσοσφιγγομυελίνη. Αυτές οι ενώσεις διαθέτουν ισχυρούς βακτηριοκτόνους παράγοντες *in vitro* (Gupta and Prakash 2017).

Η βιολογική σημασία αυτού του ενζύμου είναι ότι διαθέτει ένα φυσικό σύστημα προστασίας από την εισβολή μικροοργανισμών. Εκτός από την αντική του δράση προστατεύει τα ζωικά κύτταρα από διάφορες βλάβες και υπεροξειδωτικές επιδράσεις (De Wit and VAN HOOYDONK 1996). Σε μια μελέτη, η από του στόματος χορήγηση γαλακτοϋπεροξειδάσης εξασθένησε την πνευμόνια σε μολυσμένα με τον ιό της γρίπης ποντικά όπου κατέστειλε την διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στους πνεύμονες (Shin et al. 2005). Έτσι η κύρια μορφή της γαλακτοϋπεροξειδάσης είναι ένας προστατευτικός παράγοντας έναντι μολυσματικών μικροβίων.

### **Λυσοζύμη (N-Ακετυλομουραμική-Γλυκάνη – Υδρολάση)**

Η λυσοζύμη είναι μια από τις δευτερεύουσες πρωτεΐνες του γάλακτος που έχει προσελκύσει αυξημένη προσοχή λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής δράσης έναντι ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών και ως εκ τούτου της δυνατότητας στη συντήρηση και την ασφάλεια των τροφίμων. Η λυσοζύμη είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο που είναι ευρέως κατανεμημένο στη φύση και εμφανίζεται σε πολλά σωματικά υγρά και ιστούς ζωντανών οργανισμών (P F Fox and Kelly 2006). Λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας της προέλευσης και των δομικών, αντιγονικών, χημικών και ενζυμικών ιδιοτήτων των μορίων λυσοζύμης, έχουν ταξινομηθεί σε διαφορετικές κατηγορίες/ τύπους. Ο πιο μελετημένος τύπος είναι η c- λυσοζύμη που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ασπράδι του αυγού και των πτηνών και απομονώθηκε επίσης από διάφορους ιστούς και εκκρίσεις θηλαστικών, όπως γάλα, σάλιο, δάκρυα, ούρα, αναπνευστικές και τραχηλικές εκκρίσεις (Benkerroum 2008).

Παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση μόνο έναντι των θετικών κατά gram βακτηρίων. Καταλύει την διάσπαση των πολυμερών πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος στο δεσμό β1-4 μεταξύ του N- ακετυλομουραμικού οξέος και των ουσιών N-ακετυλογλυκοζαμίνης λύοντας έτσι ευαίσθητα βακτήρια (Benkerroum 2008). Η αντιβακτηριακή δράση της λυσοζύμης ως μέρους του μη ειδικού έμφυτου αμυντικού μηχανισμού είναι καλά τεκμηριωμένη. Δρα είτε ανεξάρτητα με τη λύση βακτηρίων, είτε ως συστατικό σύνθετων ανοσολογικών αντιδράσεων για την ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης των βακτηρίων από τα μακροφάγα (Varaldo et al. 1989). Συμβάλει έτσι στην έμφυτη προστασία από βακτηριακές λοιμώξεις ενώ βρίσκεται ακόμα στο μαστό και καθυστερεί την αλλοίωση του γάλακτος μετά τη λήψη, δηλαδή την περίοδο βακτηριοστάσεως (Benkerroum 2008). Η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης έχει αποδειχθεί εκτενώς *in vitro* ή σε φυσιολογικά υγρά και εκκρίσεις συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος, του ορού αίματος, του σάλιου και των ούρων (Martinez and Carroll 1980; Lee-Huang et al. 1999; Sexton et al. 1996). Αν και η λυσοζύμη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιμικροβιακή δράση προς τα βακτήρια, μύκητες,

πρωτόζωα και ιούς (Reddy, Yedery, and Aranha 2004; S. Wang et al. 2005; Lee-Huang et al. 2005), είναι ουσιαστικά γνωστή για την αντιβακτηριακή της δράση και έχει χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη βάση για τη συντήρηση τροφίμων. Αυτό το ένζυμο έχει ευρύτερες βιομηχανικές εφαρμογές ως πρόσθετο τροφίμων, στη ιατρική διαγνωστική, τη φαρμακολογία και την κτηνιατρική. Χρησιμοποιείται επίσης για την θεραπεία βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων, δερματικών και οφθαλμικών παθήσεων, περιοδοντίτιδας, λευχαιμίας και καρκίνου (Leśnierowski 2009; Benkerroum 2008).

### **Ξανθίνη οξειδάση**

Μέχρι πρόσφατα η ξανθίνη-οξειδάση θεωρείτο ότι είναι μια πρωτεΐνη δομικής λειτουργίας στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων του γάλακτος. Θεωρήθηκε ότι η λειτουργία του εξαρτάται μόνο από τη δομή των πρωτεϊνών του, όπως η ολοκλήρωση της διαδικασίας που οδηγεί την έκκριση λιπιδίων στο γάλα, ανεξάρτητα από την ενζυμική του δράση. Ωστόσο, οι Björck and Claesson 1979 πρότειναν ότι το  $H_2O_2$  που προέρχεται από την ξανθίνη-οξειδάση ασκεί τις αντιμικροβιακές του επιδράσεις δρώντας ως υπόστρωμα για το σύστημα της γαλακτοϋπεροξειδάσης στο γάλα.

#### **1.11.4 Οργανικά οξέα με αντιμικροβιακή δράση**

Τα οργανικά οξέα διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ιδιαίτερα κατά του *E. Coli* στο έντερο. Τα οργανικά οξέα βοηθούν στη μείωση του pH του εντέρου που βοηθά στην έκκριση χολικών χυμών, στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και επίσης στη μείωση της συγκέντρωσης της παθογόνου μικροχλωρίδας στο έντερο (Desjeux 2000).

#### **1.12 Πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση**

Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών του γάλακτος περιέχουν διάφορα μοτίβα που μπορούν να απελευθερωθούν κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης για την αύξηση του αντιμικροβιακού δυναμικού των πρωτεϊνών του γάλακτος (Chan and Li-Chan 2006; Z. Wang and Wang 2004). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν φυσική πηγή βιοδραστικών πεπτιδίων με ποικίλλες φυσιολογικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η δράση τους αποκαλύπτεται μετά από ενζυμική πρωτεόλυση ή μετά από ζύμωση που περιλαμβάνει πρωτεολυτικούς μικροοργανισμούς. Με την επιφύλαξη πρωτεολυτικών συνθηκών, μπορεί να ληφθεί ένας ποικίλος συνδυασμός βιοδραστικών πεπτιδίων που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος αλλά μόνο λίγα πεπτίδια έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηρισθεί για την αντιμικροβιακή τους δράση (Floris et al. 2003; Pellegrini 2003; Dashper, Liu, and Reynolds 2007; Hayes et al. 2006; Expósito and Recio 2006; Minervini et al. 2003; M Tomita et al. 2002). Επιπλέον, αρκετά πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος παρουσιάζουν

περισσότερους από έναν τύπους δραστηριότητας και αναφέρονται ως πολυλειτουργικά πεπτίδια (M Tomita et al. 2002; López-Exposito et al. 2007).

### **1.12.1 Βιοενεργά πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση**

Η βιολογική δραστηριότητα των πεπτιδίων εξαρτάται από τη σύνθεσή τους σε αμινοξέα και τη θέση τους στην αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών. Τα πεπτίδια αυτά μπορούν να σχηματιστούν με ενζυμική υδρόλυση πρωτεολυτικών ενζύμων κατά τη πέψη του γαστρεντερικού σωλήνα, ζύμωση από ανοσοβακτηρίδια όπως οι γαλακτοβάκιλλοι ή/και κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι μικρά, κατιονικά και αμφίφυλα πεπτίδια που παράγονται από διάφορους πόρους ζωικών, φυτικών κ.λπ. πηγών και έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων, μυκήτων, ιών και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Barbosa Pelegri et al. 2011), για παράδειγμα *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* και *Helicobacter*, ζυμομύκητες και νηματώδεις μύκητες. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό στόχο, οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις των πεπτιδίων ποικίλουν. Έχουν τέσσερα κοινά χαρακτηριστικά: 1) Συνήθως 12-1.000 αμινοξέα, 2) είναι συχνά θετικά φορτισμένα, 3) περισσότερο από το 50% από αυτά είναι υδρόφοβα αμινοξέα και 4) επηρεάζουν τη λειτουργία των βακτηριακών κυττάρων με διάφορους τρόπους. Δεδομένου ότι αυτά τα πεπτίδια είναι συχνά διπολικά, εμφανίζουν παρόμοια αντιμικροβιακή λειτουργία. Αυτές οι ενώσεις αναστέλλουν τη σύνθεση μεγάλων μορίων, αλληλοεπιδρούν με ενδοκυτταρικές ενώσεις και επηρεάζουν τη λειτουργία των μικροβιακών κυττάρων (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Διάφορες εμπορικές πρωτεάσες φυτικής, μικροβιακής και ζωικής προέλευσης όπως η θρυψίνη, η πεψίνη, η βρωμελίνη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων. Ο τύπος του ενζύμου που χρησιμοποιείται στη διαδικασία της υδρόλυσης είναι πολύ σημαντικός επειδή καθορίζει το μοτίβο της θραύσης του πεπτιδικού δεσμού (Shahidi and Alasalvar, 2011). Η πεψίνη με μοριακό βάρος 36 kDa είναι ένα σημαντικό ένζυμο που ανήκει στη κατηγορία των ασπαρτικών πρωτεασών και στην τρίτη κατηγορία η υδρολάση και προκαλεί την υδρόλυση των πρωτεϊνών. Οι πεπτιδικοί δεσμοί διασπώνται εύκολα, και υπό όξινες συνθήκες οι πρωτεΐνες διασπώνται από αυτό το ένζυμο (Halдар, Mitra, and Chattopadhyay 2010; L. Zhao et al. 2011). Ο αριθμός των αμινοξέων σε πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι μικρότερος από 50, και τα περισσότερα από αυτά έχουν αμφιπαθητική, υδρόφοβη και κατιονική τρισδιάστατη δομή. Τα πεπτίδια που περιέχουν βασικά αμινοξέα όπως η λυσίνη και η αργινίνη έχουν θετικό ηλεκτρικό φορτίο και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Shahidi and Zong, 2008). Τα απομονωμένα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι συχνά πλούσια σε αμινοξέα λευκίνης και γλυκίνης. Η παρουσία της αργινίνης

στη πεπτιδική αλληλουχία παίζει σημαντικό ρόλο στη αντιμικροβιακή δραστηριότητα και λόγω των κατιονικών ιδιοτήτων της αυξάνει την αντίδραση με το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα. Στη πραγματικότητα, τα κατιονικά πεπτίδια διασπών τους μικροοργανισμούς αυξάνοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Tang et al. 2015). Γενικά, οι παράγοντες όπως η υδροφοβικότητα, το pH, η θερμοκρασία, οι επιφανειοδραστικές ουσίες, η πεπτιδική προέλευση, η σύνθεση αμινοξέων, το πεπτιδικό φορτίο, το μέγεθος και η δευτερεύουσα δομή του πεπτιδίου μπορούν να επηρεάσουν τη αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Valdivia-Nájjar et al. 2017).

Οι Mamoru Tomita et al. 1991, ανέφεραν για πρώτη φορά την ενζυμική απελευθέρωση αντιβακτηριακών πεπτιδίων με πιο ισχυρή δραστηριότητα από τη πρόδρομη λακτοφερρίνη. Λίγο αργότερα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα αντιβακτηριακά πεπτίδια βόειας LF f(17-41) και ανθρώπινης προέλευσης LF f(1-47), που ονομάζονται αντίστοιχα βόεια και ανθρώπινη Lfcin (Bellamy et al. 1992). Αυτά τα πεπτίδια έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, έναντι ενός ευρέος φάσματος gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων (Wakabayashi et al., 2003). Η υδρόλυση της λακτοφερρίνης των αιγών και των προβάτων από την πεψίνη είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντιβακτηριακών προϊόντων υδρόλυσης, και ένα ομόλογο πεπτίδιο με τη λακτοφερρίνη, που αντιστοιχεί στο θραύσμα f(14-42) ταυτοποιήθηκε στο υδρόλυμα αίγαιας λακτοφερρίνης. Η λακτοφερρίνη των αιγών έδειξε χαμηλότερη αντιβακτηριακή δράση από τη λακτοφερρίνη των βοοειδών έναντι του *Escherichia coli*.

Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις των διάφορων αντιμικροβιακών συστατικών του γάλακτος φαίνεται να προστίθενται με συνεργατικό τρόπο, καθώς η συνολική αντιμικροβιακή επίδραση στο γάλα αναφέρθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη από το άθροισμα των επιμέρους συνεισφορών των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (Clare and Swaisgood 2000). Συγκεκριμένα, η εκκριτική ουσία του γάλακτος, ανοσογλοβουλίνη και η λακτοφερρίνη, αποδείχθηκε ότι ενισχύουν σημαντικά τη δραστηριότητα της λυσοζύμης έναντι των τροφοζωιτών της *Entamoeba histolytica* (León-Sicairos et al. 2006). Επιπλέον, η λυσοζύμη αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ιοντική ισχύ και τη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων στο γάλα και στα εργαστηριακά μέσα (Priyadarshini and Kansal 2003)

Η παρουσία ενεργών ειδών οξυγόνου και ελεύθερων ριζών στα τρόφιμα προκαλεί υποβάθμιση της ποιότητας και μείωση της διάρκειας ζωής από την οξειδωση των λιπιδίων (Li et al. 2013). Είναι γνωστό ότι τα αμυντικά συστήματα των οργανισμών πολλές φορές δεν είναι αρκετά για να αποτρέψουν την οξειδωτική βλάβη. Μερικοί ερευνητές έχουν δηλώσει

ότι τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια που υπάρχουν στο τροφικό σύστημα παίζουν ζωτικό ρόλο στη διατήρηση των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων στον οργανισμό αποτρέποντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και τα ενεργά είδη οξυγόνου, ενώ άλλοι συνέστησαν ακόμη και την συμπλήρωσή τους (Chang et al., 2013; Gupta et al., 2009). Ένας αυξανόμενος αριθμός προϊόντων υδρόλυσης πρωτεϊνών τροφίμων και αντιοξειδωτικών πεπτιδίων, έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (Hernández-Ledesma et al. 2005).

## Σκοπός

Σκοπός της διατριβής είναι να ερευνηθούν τα βιολειτουργικά συστατικά του όξινου ορού γιαουρτιού που προκύπτουν από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, ως προς την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους ικανότητα. Τα είδη ζωικής προέλευσης του γάλακτος από τα οποία παρασκευάστηκαν τα στραγγιστά γιαούρτια απ' όπου και προήλθαν τα δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού που εξετάστηκαν εκτός του αγελαδινού που είναι το πιο ευρέως καταναλούμενο, ήταν το αίγαιο, το πρόβειο και μίγμα από αίγαιο και πρόβειο γάλα. Η εξερεύνηση δευτερευόντων γαλακτοπαραγωγών ειδών όπως είναι και το πρόβατο με την αίγα, αύξησε πρόσφατα το αυξανόμενο ενδιαφέρον για βιοενεργά πεπτίδια μεταξύ των ερευνητών. Ως εναλλακτική λύση στο αγελαδινό γάλα, λόγω της υψηλότερης θρεπτικότητας και άλλων θρεπτικών στοιχείων, το γάλα από μικρά γαλακτοπαραγωγά είδη έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι πιο υγιεινό για τα βρέφη και τους ηλικιωμένους. Ως εκ τούτου, αναγνωρίστηκε η σημασία του γάλακτος από τέτοιους οργανισμούς και προωθήθηκε το ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων (S. Guha and Majumder 2019).

Οι όξινοι οροί χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με το ζωικό είδος προέλευσης, λυοφιλοποιήθηκαν και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, όπου μέσω των γαστρεντερικών ενζύμων πεψίνης και παγκρεατίνης οι πρωτεΐνες του όξινου ορού γιαουρτιού αποικοδομούνται σε βιοενεργά πεπτίδια. Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές πειραματικές δοκιμασίες. Η πρώτη αφορά την δοκιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών οξυγόνου με την μέθοδο ORAC σε δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού, όπου μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού ως προς τη ζωική προέλευση του γάλακτος και ως προς την εποχή (χειμώνας- καλοκαίρι). Η δεύτερη αφορά την έκθεση του όξινου ορού γιαουρτιού σε καρκινικά διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα THP-1, όπου

εξετάσθηκε η σχετική έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων ως προς την ζωική προέλευση των δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού καθώς και ως προς την εποχή (χειμώνας- καλοκαίρι).

Για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα του όξινου ορού γιαουρτιού έγινε δοκιμή σε δείγματα λυοφιλοποιημένα πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης στα στελέχη των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli O157:H7* και ως control τα στελέχη των ωφέλιμων μη παθογόνων μικροοργανισμών του *Lactobacillus Plantarum*. Αρχικά αξιολογήθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού με τη μέθοδο έγχυσης συγκεκριμένης ποσότητας όξινου ορού σε βοθρία σε τρυβλία Petri όπου είναι ενσωματωμένα όλα τα στελέχη από κάθε μικροοργανισμό με κατάλληλο θρεπτικό υλικό, επώαση αυτών σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης και παρατήρηση σχηματισμού ζώνης διαύγασης στις 24h και 48h. Σε δεύτερο χρόνο εξετάσθηκε η πιθανή επίδραση του όξινου ορού γιαουρτιού στη μείωση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε πιάτα 96 βοθρίων ενσωματωμένα με κατάλληλο θρεπτικό υλικό και συγκεκριμένη ποσότητα όξινου ορού γιαουρτιού, επώασή τους για 16h σε κατάλληλη για τον κάθε μικροοργανισμό θερμοκρασία και καταγραφή της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών.



## Κεφάλαιο 2°

### 2.1 Συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συλλογή όξινων ορών γιαουρτιού από αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο και αιγοπρόβειο γάλα, από διάφορες ελληνικές βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων από το ηπειρωτικό τμήμα Ελλάδας. Στη συνέχεια, τα δείγματα λυοφιλοποιήθηκαν στον ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ και ακολούθησε η εκτίμηση της πρωτεΐνης με τη διαδικασία της μεθόδου Kjeldahl (πίνακας 2.1) εκφρασμένη σε ποσοστό %. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα ενυδατώθηκαν με νερό και χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με βάση το πιο αραιό δείγμα ως προς την πρωτεΐνη, το οποίο υπολογίστηκε σε 0,9 %.

**Πίνακας 2.1:** Ζωική προέλευση όξινου ορού γιαουρτιού και μέση τιμή πρωτεΐνης.

<b>Ζωική προέλευση</b>	<b>Μέση τιμή πρωτεΐνης (N-ουχες*6,28)</b>
Αγελαδινό	0,279
Αγελαδινό	0,252
Αγελαδινό	0,286
Αγελαδινό	0,223
Αγελαδινό	0,267
Αγελαδινό	0,273
Αγελαδινό	0,223
Αγελαδινό	0,201
Αγελαδινό	0,245
Αγελαδινό	0,330
Αγελαδινό	0,402
Αγελαδινό	0,091
Αγελαδινό	0,182
Αγελαδινό	0,151
Αγελαδινό	0,129
Αγελαδινό	0,424
Αγελαδινό	0,276
Αγελαδινό	0,562
Αγελαδινό	0,458
Αγελαδινό	0,179

Αίγιο	0,713
Αίγιο	0,355
Αίγιο	0,352
Αίγιο	0,534
Αίγιο	0,239
Αίγιο	0,374
Αιγοπρόβειο	0,358
Αιγοπρόβειο	0,600
Πρόβειο	0,641
Πρόβειο	1,243
Πρόβειο	0,593
Πρόβειο	0,531
Πρόβειο	1,218
Πρόβειο	0,343
Πρόβειο	0,590

### **2.1.1 Στατική *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού**

Βασικό βήμα για την λήψη των αποτελεσμάτων του πειράματος είναι η *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των δειγμάτων όξινου ορού γιαούρτης, στα οποία ακολουθείται το πρωτόκολλο του Brodtkorb et al. 2019 με κάποιες τροποποιήσεις.

Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται σε μια διεθνή συναίνεση που αναπτύχθηκε από δίκτυο COST INFOGEST. Είναι μια απλή μέθοδος στατικής πέψης όπου απαιτείται τυπικός εργαστηριακός εξοπλισμός και χρησιμοποιεί σταθερές αναλογίες τροφής προς τα πεπτικά υγρά και σταθερό pH για κάθε βήμα της πέψης. Οι όξινοι οροί υποβάλλονται σε διαδοχική στοματική, γαστρική και εντερική πέψη, στοχεύοντας στη προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα, Το τελικό προϊόν που θα προκύψει μετά την πέψη θα οδηγηθεί σε περαιτέρω διαδοχικές διεργασίες προκειμένου να ληφθεί το τελικό αποτέλεσμα.

#### **Πειραματικός σχεδιασμός:**

Αρχικά γίνεται ο προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων που θα χρησιμοποιηθούν στην *in vitro* πέψη (πεψίνη, παγκρεατίνη) καθώς και των χολικών οξέων. Στη συνέχεια, γίνεται η παρασκευή των διαλυμάτων αλάτων και τέλος ακολουθεί η διαδικασία της *in vitro* πέψης των όξινων ορών γιαούρτης.

**Παρασκευή διαλυμάτων αλάτων SSF – SGF και SIF, προσομοιωμένα στα γαστρεντερικά υγρά πέψης:**

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- KCL (Sigma- Aldrich 31248)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma- Aldrich P5655)
- $\text{NaHCO}_3$  (Sigma- Aldrich S5761)
- NaCl (Sigma- Aldrich 746398)
- $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  (Sigma- Aldrich M2393)
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (Sigma- Aldrich 207861)
- $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (Sigma- Aldrich 31307)
- HCl 6M
- Mili Q  $\text{H}_2\text{O}$  (δισ απεσταγμένο νερό)

Απαιτούμενος εξοπλισμός:

- Σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου Falcon με βιδωτό πώμα των 50ml
- Eppendorf tubes 2 mL
- Ηλεκτρονικός αναρροφητήρας πιπετών (accu- jetpro)
- Γυάλινες πιπέτες των 10 και 25 mL
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Tips
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 500 και 1000 mL
- Γυάλινα δοχεία Duran των 500 mL και 1000 mL
- Χωνί
- Σπάτουλα
- Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνήτες (Stuart- Scientific)
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius TE214S)

**Πίνακας 2.2:** Ποσότητες χρησιμοποιηθέντων αλάτων για την παρασκευή διαλυμάτων για κάθε στάδιο πέψης SSF, SIF, SGF σε όγκο 400 mL

Διαλύματα αλάτων	Συγκεντρώσεις		SSF (pH 7)		SIF (pH 3)		SGF (pH 7)	
			Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4/L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση άλατος στο SSF (mM)	Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4/L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση άλατος στο SIF (mM)	Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4/L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση άλατος στο SGF (mM)
	(g/L)	(M)	(ml)	(mM)	(ml)	(mM)	(ml)	(mM)
KCL	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12	1.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
HCl		6	0.09	1.1	1.3	15.6	0,7	8.4

Το CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> προστίθεται κατά τη διάρκεια του πειράματος της *in vitro* πέψης για να αποφευχθεί η καθίζηση κατά την αποθήκευση των προσομοιωμένων γαστρικών υγρών.

#### Αναλυτική πορεία:

Για την παρασκευή διαλυμάτων πέψης SSF, SIF και SGF ζυγίστηκαν οι αντίστοιχες απαιτούμενες ποσότητες των διαλυμάτων αλάτων όπως αναγράφονται στον πίνακα 2.2 και μεταφέρθηκαν σε δοχεία Duran των 1000 mL και διαλύθηκαν σε δις απεσταγμένο νερό Mili Q μέχρι τελικού όγκου 800 mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ρύθμιση του pH των τριών διαλυμάτων ξεχωριστά με την προσθήκη του αναγραφόμενου στον πίνακα HCl 6M.

#### **Διαδικασία *in vitro* προσομοίωσης της γαστρεντερικής πέψης**

##### Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Δείγματα όξινων ορών γιαούρτης
- Mili Q H<sub>2</sub>O
- CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>
- Προσομοιωμένα υγρά πέψης:
  - SSF, Simulated Salivary Fluid (στοματική φάση)
  - SGF, Simulated Gastric Fluid (γαστρική φάση)
  - SIF, Simulated Intestinal Fluid (εντερική φάση)
- Ένζυμα και χολικά άλατα:
  - Πεψίνη (Sigma- Aldrich, P7012)
  - Παγκρεατίνη (Sigma- Aldrich, P3292)
  - Χολικά άλατα (Bile extract porcine, Sigma- Aldrich B8631)
- Tris 10mM buffer (Duchefa biochemie, T1501.1000)

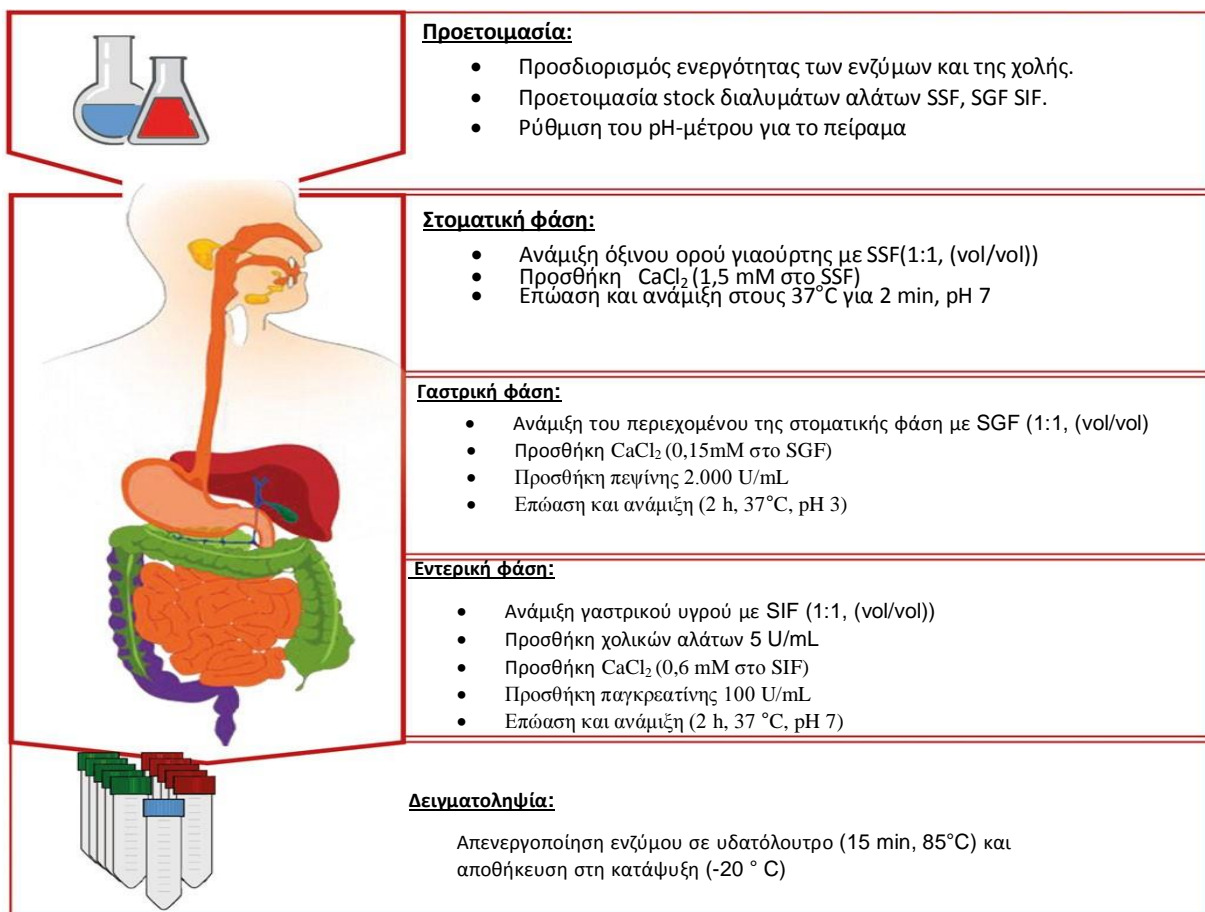
- NaCl 150mM (Sigma- Aldrich 746398-500G)
- NaOH και HCl (1M και 5M)

Απαιτούμενα αναλώσιμα:

- Σπάτουλα εργαστηρίου
- Falcon των 50ml
- Ηλεκτρονικός αναρροφητήρας πιπετών (accu- jetpro)
- Γυάλινες πιπέτες των 10 ml
- Αυτόματες πιπέτες προσαρμοσμένου όγκου (0,5-10  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L)
- Πλαστικά ρύγχη ανάλογα με τον όγκο της πιπέτας
- Γυάλινο ποτήρι ζέσεως
- Στατώ
- Πάγος
- Κάδος απορριμμάτων

Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Ζυγαριά ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius TE214S)
- Επιτραπέζιο pHμέτρο (BANTE instruments 920)
- Vortex
- Επωαστήρας (Mettler)
- Περιστρεφόμενος τροχός
- Ψηφιακό χρονόμετρο



**Εικόνα 2.1:** Αναπαράσταση χρόνου και ροής της μεθόδου *in vitro* πέψης όξινου ορού γιαούρτης INFOGEST 2.0.

### Αναλυτική πορεία:

Αρχικά ρυθμίζεται το υδατόλουτρο και ο επωαστικός θάλαμος στους  $37^\circ\text{C}$  και στο υδατόλουτρο τοποθετούνται τα διαλύματα SSF, SGF και SIF.

Έπειτα ζυγίζονται τα ένζυμα και χολικά άλατα ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα υποστούν *in vitro* πέψη. Αφού ζυγιστεί η πεψίνη, μεταφέρεται σε falcon των 50 mL και διαλύεται με Tris (10 mM) NaCl (150 mM), στη συνέχεια γίνεται καλή ανάδευση και τοποθετείται σε πάγο. Αντίστοιχα, ζυγίζεται το ένζυμο της παγκρεατίνης, μεταφέρεται σε falcon των 50 mL, διαλύεται με Milli Q  $\text{H}_2\text{O}$ , αναδεύεται καλά και τοποθετείται σε πάγο. Η τοποθέτηση των ενζύμων απευθείας σε πάγο γίνεται με σκοπό τη διατήρηση της δραστηριότητάς τους στο ελάχιστο. Στη συνέχεια ζυγίζονται τα χολικά άλατα (biles), μεταφέρονται σε falcon των 50 mL και διαλύονται με Milli Q  $\text{H}_2\text{O}$ , γίνεται καλό vortex και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους  $37^\circ\text{C}$ .

Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια και απουσίας αμύλου στον όξινο ορό γιαούρτης, κατά τη διαδικασία της *in vitro* πέψης δεν πραγματοποιήθηκε η προσθήκη γαστρικής λιπάσης και αμυλάσης αντίστοιχα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του (Brodkorb et al. 2019).

#### **Oral phase (Στοματική φάση)**

Για το στάδιο της στοματικής φάσης σε falcons των 50 mL μεταφέρονται αρχικά οι απαιτούμενες ποσότητες όξινου ορού γιαούρτης, τα οποία και αραιώνονται με Mili Q H<sub>2</sub>O προκειμένου να έχουν όλα τα δείγματα την ίδια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τελικό όγκο μετά την αραιώση 2,5 mL.

Έπειτα προστίθενται 2 mL SSF και 12,5  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>, ακολουθεί η ρύθμιση του pH στο 7 με NaOH 1M ή 5M, και η συμπλήρωσή τους με νερό μέχρι τελικού όγκου στη στοματική φάση τα 5 mL. Τέλος πραγματοποιείται η επώαση τους σε κίνηση στο υδατόλουτρο στους 37 °C για 2 λεπτά.

Μαζί με τα δείγματα τα οποία θα υποστούν πέψη προετοιμάσθηκαν και κάποια δείγματα blanks χωρίς όξινο ορό γιαουρτιού αντικαθιστώντας τα με Mili Q H<sub>2</sub>O και ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία *in vitro* πέψης με τα δείγματα όξινου ορού γιαούρτης.

#### **Gastric phase (Γαστρική φάση)**

Αμέσως μετά την παρέλευση των 2 λεπτών προστίθεται στο μητρικό δείγμα και στα blanks των 5 mL, από 4 mL SGF σε κάθε falcon, 0,5mL πεψίνης (2.000 U/ mL) και 2,5  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>. Ρυθμίζεται το pH στο 3 με HCL 1M ή 5M και στη συνέχεια συμπληρώνεται με Mili Q H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 10mL. Έπειτα τοποθετούνται τα δείγματα σε επωαστικό θάλαμο με κινούμενο τροχό για να αναμιχθεί επαρκώς το πεπτικό μείγμα, με σκοπό την επώαση τους για 2 ώρες στους 37 °C.

#### **Intestinal phase (Εντερική φάση)**

Αφού τα δείγματα επωαστούν για 2 ώρες, για την εντερική φάση προστίθενται στο «γαστρικό χυμό» που έχει δημιουργηθεί 10 mL SIF, 2,5 mL (100 U/ mL) παγκρεατίνη, 20  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>, 1,435 mL biles και ακολουθεί η ρύθμιση του pH στο 7 με NaOH 1M ή 5M και συμπλήρωση τους με Mili Q H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 20 mL. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο σε κινητούς τροχούς για επώαση για 2 ώρες.

Μετά την ολοκλήρωση της εντερικής φάσης τα δείγματα οδηγούνται στο υδατόλουτρο στους 85 °C για 10 λεπτά με σκοπό την αδρανοποίηση της παγκρεατίνης και στη συνέχεια οδηγούνται στους – 20 °C μέχρι την επόμενη χρήση τους.

### 2.1.2 Φιλτράρισμα δειγμάτων

Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1200g για 5 λεπτά και ύστερα περάστηκαν από φίλτρο 0,22 μm προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν βακτήρια ή άλλα υλικά. Και κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πεπτιδίων με τη βοήθεια των φίλτρων τύπου Amicon. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 3 kDa (MWCO 3 kDa) για την απομάκρυνση πεπτιδίων υψηλού μοριακού βάρους. Τέλος, το διαπερατό κλάσμα που προέκυψε από την υπερδιήθηση, αποτελούμενο από πεπτιδία χαμηλού μοριακού βάρους (χαμηλότερο των 3 kDa), καθώς επίσης και τα τελικά προϊόντα της γαστρεντερικής πέψης αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

### 2.2 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών οξυγόνου με την μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των προϊόντος διατροφής είναι ένα θέμα αυξανόμενου ενδιαφέροντος, διότι μπορεί να παρέχει μια ποικιλία πληροφοριών όπως αντοχή στην οξείδωση, ποσοτική συμβολή των αντιοξειδωτικών ουσιών, ή την αντιοξειδωτική δραστηριότητα που μπορεί να παρουσιάζουν στο εσωτερικό του οργανισμού κατά την κατάποση (Zulueta, Esteve, and Frígola 2009). Πολυάριθμες *in vitro* μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) των τροφίμων. Κάθε αξιολόγηση γίνεται με διάφορες συνθήκες οξείδωσης και διαφορετικές μεθόδους μέτρησης. Η δοκιμασία αντιοξειδωτικής ικανότητας ριζών οξυγόνου (ORAC) είναι μια από τις πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους HAT (hydrogen atom transfer), που βασίζεται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου. Η μέθοδος ORAC αναπτύχθηκε αρχικά από τους Cao, Alessio, and Cutler 1993 και συνίσταται στη μέτρηση της μείωσης του φθορισμού μιας πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα της απώλειας της διάπλάσής της όταν υφίσταται οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από μια πηγή ριζών υπεροξειδίου (ROO·). Η μέθοδος μετρά την ικανότητα των αντιοξειδωτικών στο δείγμα να προστατεύουν την πρωτεΐνη-στόχο (φλουορεσκεΐνη) από οξειδωτική βλάβη (Zulueta, Esteve, and Frígola 2009).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το γάλα και άλλα κλάσματα του γάλακτος, όπως είναι ο ορός του γάλακτος, οι καζεΐνες, η λακτοφερίνη και η αλβουμίνη του ορού έχουν αντιοξειδωτική δράση (Zulueta, Esteve, and Frígola 2009). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των τροφίμων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κολλοειδών ιδιοτήτων των υποστρωμάτων, των συνθηκών και των σταδίων οξείδωσης και του εντοπισμού των αντιοξειδωτικών σε διάφορες φάσεις (Frankel and Meyer 2000).



## **Πειραματικό μέρος**

Χρησιμοποιήθηκαν 35 δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SIF), καθώς και τα προϊόντα της πέψης με πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3 kDa.

### Υλικά:

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), το οποίο είναι υδρόφιλο ανάλογο της βιταμίνης E (Sigma- Aldrich, 238813)
- AAPH [2,20-azobis (2- amidinopropane) dihydrochloride] (Sigma- Aldrich, 440914)
- Fluorescein (FL, άλας νατρίου φλουορεσκεΐνης) (Sigma- Aldrich, F6377)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS)
- Mili Q water

### Αναλώσιμα και εξοπλισμός:

- Πλάκες 96 wells
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Πολυκάναλη πιπέτα μεταβλητού όγκου
- Tips
- Eppendorfs tubes (1,5 mL και 2 mL)
- Falcons των 50 ml
- Κάδος απορριμμάτων
- Στατώ
- Μηχάνημα vortex
- Perkin Elmer VICTOR X3 MultiLabel Plate Reader

### **2.2.1 Δοκιμασία ORAC**

Η μέθοδος ORAC που χρησιμοποιήθηκε, με τη φλουορεσκεΐνη (FL) ως «φορίζοντα ανιχνευτή», ήταν αυτή που περιγράφεται από τους Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001). Ο αυτοματοποιημένος προσδιορισμός ORAC πραγματοποιήθηκε σε μετρητή πολλαπλών ετικετών Perkin Elmer VICTOR X3 MultiLabel Plate Reader, με φίλτρα φθορισμού για μήκος κύματος διέγερσης 485 nm και μήκος κύματος εκπομπής 535 nm. Οι μετρήσεις έγιναν σε πλάκα με 96 λευκά βοθρία με επίπεδο πυθμένα. Η αντίδραση διεξήχθη στους 37°C, καθώς

η αντίδραση ξεκίνησε με θερμική διάσπαση του AAPH σε 75 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS, pH 7,4), λόγω της ευαισθησίας της FL στο pH (Zulueta, Esteve, and Frígola 2009).

Η ανάλυση είναι εξαιρετικά ευαίσθητη επομένως τα δείγματα και τα υπόλοιπα διαλύματα αραιώθηκαν κατάλληλα πριν από την ανάλυση για την αποφυγή παρεμβολών. Σε όλα τα δοκιμασθέντα δείγματα όξινου ορού γιαούρτης, αρχικό λυοφιλοποιημένο, SIF και <3kDa, έγινε αραιώση 20 και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

- Παρασκευή φλουορεσκεΐνης (FL)

Παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα φλουορεσκεΐνης, τα οποία διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 75 mM, pH 7,4) και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε απόλυτο σκοτάδι σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης.

Το διάλυμα εργασίας (117 nM) παρασκευάστηκε καθημερινά με αραιώση 8,54:

- 100 μl του μητρικού διαλύματος FL σε 900μl PBS με δυο διαδοχικές αραιώσεις, ενώ στη 3<sup>η</sup> αραιώση έγινε μεταφορά 200 μl FL της 2<sup>ης</sup> αραιώσης σε 1,800 μl PBS, όπου για τη τελική συγκέντρωση των 117 nM σε ένα βαρκάκι με 11,25 ml PBS μεταφέρθηκαν από την 3<sup>η</sup> αραιώση 1,5 ml FL.

- Παρασκευή AAPH

Η ρίζα AAPH (40 mM) παρασκευαζόταν καθημερινά ζυγίζοντας 0,11g AAPH (400 mM) σε ζυγό ακριβείας και προσθέτοντάς τη σε eppendorf με 1ml PBS και κάνοντας καλό vortex. Για την τελική συγκέντρωση των 40 mM σε ένα βαρκάκι με 7,200 μl PBS μεταφέρθηκαν 800 μl AAPH.

- Παρασκευή πρότυπου αναφοράς (Trolox)

Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα Trolox, από το οποίο παρασκευάστηκε ένα αποθεματικό διάλυμα trolox 2mM, το οποίο διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη. Τα διαλύματα Trolox που χρειάζονται για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονταν καθημερινά με αραιώση 1:1 πριν από τη δοκιμασία ORAC.

- Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν διαλύματα trolox από το αποθεματικό (2mM) με συγκεντρώσεις 500 mM, 250mM, 125mM, 62,5 mM και 31,25 mM σε διαδοχικές αραιώσεις 1:1. Από το αποθεματικό διάλυμα trolox 500μl μεταφέρθηκαν σε eppendorf με 500 μl PBS και στη συνέχεια έγιναν 5 διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.

### **Πειραματικό μέρος:**

Αρχικά έγινε δοκιμή καθώς και 3 επαναλήψεις, των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού πριν την *in vitro* πέψη, αντίστοιχα μετά την *in vitro* πέψη και τέλος στα δείγματα με μοριακό βάρος πεπτιδίων < 3kDa. Χρησιμοποιήθηκαν 2 πλάκες για κάθε στάδιο με σκοπό να χωρέσουν όλα τα δείγματα, το trolox καθώς και το control.

Πριν την έναρξη της διαδικασίας ρυθμίζεται το μηχάνημα στο πρόγραμμα και στην επιθυμητή θερμοκρασία. Έπειτα σε ένα καθαρό πάγκο εργασίας τοποθετούνται τα απαραίτητα αναλώσιμα. Στη συνέχεια σε μια πλάκα των 96 βοθρίων προστίθεται περιμετρικά 150 μl mili Q H<sub>2</sub>O. Αμέσως μετά γίνεται η προσθήκη 20μl στα βοθρία από τα δείγματα όξινου ορού αφού πρώτα γίνει καλό vortex των δειγμάτων. Γίνεται και η προσθήκη του trolox 20 μl με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις με σκοπό τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και τέλος προστίθενται 20μl PBS ως control.

Σε απόλυτο σκοτάδι γίνεται προσθήκη της φλουορεσκεΐνης 120μl σε όλα τα δείγματα, στα trolox και στα control και αμέσως τοποθετείται στο μηχάνημα με σκοπό να θερμανθεί πριν την προσθήκη του AAPH για 15 λεπτά. Στο χρόνο αυτό γίνεται η ετοιμασία του AAPH και αφού η πλάκα ζεσταθεί γίνεται προσθήκη 60μl, για να ξεκινήσει η αντίδραση, σε όλα τα βοθρία εκτός από τα περιμετρικά και οδηγείται στο μηχάνημα με σκοπό να ξεκινήσει η μέτρηση. Οι μετρήσεις γίνονται κάθε 2 λεπτά για 80 λεπτά συνολικά έως ότου η σχετική ένταση φθορισμού (FL%) είναι μικρότερη από το 5% της αρχικής ένδειξης.

## **2.3 Γονιδιακή έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού**

### **2.3.1 Κυτταρική σειρά**

Για την επίτευξη του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά THP-1 που προσφέρθηκε από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

### **Μονοκυτταρική σειρά THP – 1**

Η κυτταρική σειρά THP-1 απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα άρρενα ασθενή 1 έτους που πάσχει από οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία. Αυτή η κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως *in vitro* μοντέλο ανθρώπινων μονοκυττάρων και μακροφάγων σε μελέτες φλεγμονωδών ασθενειών. Από καιρό πιστεύεται ότι τα φλεγμονώδη μονοκύτταρα στρατολογούνται και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα στο σημείο της μόλυνσης. Τα

μονοκύτταρα είναι κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα, ενώ τα μακροφάγα μπορούν να βρεθούν μόνο στο σημείο της μόλυνσης/ φλεγμονής (τα λεγόμενα μακροφάγα που προέρχονται από φλεγμονώδη μονοκύτταρα) ή στους ιστούς/ λεμφαδένες (τα λεγόμενα μακροφάγα που κατοικούν στο ιστό). Λόγω της κυκλοφορίας των μονοκυττάρων σε όλο το σώμα, αυτά τα κύτταρα μπορούν αν έχουν εύκολα πρόσβαση στο σημείο της μόλυνσης και να ανταποκρίνονται γρήγορα στην αναγνώριση των εισβολέων ή ουσιών που προέρχονται από παθογόνους παράγοντες (Chanput, Mes, and Wichers 2014).

Σε πειράματα *in vitro* σε αυτά τα κύτταρα η κατάσταση ενεργοποίησης μπορεί πραγματοποιηθεί διεγείροντας τα κύτταρα THP-1 με φλεγμονώδεις ενεργοποιητές, όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) ή προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Chanput, Mes, and Wichers 2014). Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού των μονοκυττάρων THP-1 είναι περίπου 35-50 ώρες. Δεν υπάρχουν αναφερόμενες ενδείξεις για την παρουσία μολυσματικών ιών ή τοξικών προϊόντων στα κύτταρα THP-1, καθιστώντας αυτή τη κυτταρική σειρά σχετικά εύκολη και ασφαλή στη χρήση. Η THP-1 είναι μια απαθανατισμένη κυτταρική σειρά που μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro*. Το ομοιογενές γενετικό υπόβαθρο της THP-1 ελαχιστοποιεί τον βαθμό μεταβλητότητας στον κυτταρικό φαινότυπο, γεγονός που διευκολύνει την επαναληψιμότητα των ευρημάτων (Chanput, Mes, and Wichers 2014).

### **2.3.2 Καλλιέργεια κυττάρων**

Η καλλιέργεια των κυττάρων διεξήχθη κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow), σε ξεχωριστό χώρο του εργαστηρίου για την αποφυγή επιμολύνσεων.

#### Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Biosera), θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων και στο οποίο προστέθηκαν:

- 1% Πυροσταφυλικό Νάτριο (Sodium Pyruvate, BioFroxx 1565ML)
- 1 % Μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-Essential Amino Acids, NEAA, HIMEDIA ACL002)
- 1% L- Γλουταμίνη (Sigma-Aldrich G7513, L- Glutamine)
- 1% Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (Sigma- Aldrich P4333, Pencillin- Streptomycin)
- 10% Βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum- FBS, gibco)

#### Απαιτούμενα υλικά και εξοπλισμός:

- Falcon των 15ml
- Αυτόματη πιπέτα προσαρμοσμένου όγκου 0,5-1μL
- Πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη (tips)
- Ηλεκτρονικός αναρροφητήρας πιπετών
- Γυάλινες πιπέτες των 10 ml
- Πλαστικές φιάλες καλλιέργειας κυττάρων (φλάσκες)
- RPMI 1640 (θρεπτικό μέσο)
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος (Hettich UNIVERSAL 2)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK 2)
- Επωαστήρας

#### Αναλυτική πορεία:

Αρχικά απομακρύνονται τα κύτταρα από το υγρό άζωτο και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C. Έπειτα προστίθενται θρεπτικό μέσο RPMI 1640 και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1500g. Η φυγοκέντρηση γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού μέσου DMSO (Dimethyl sulfoxide) για τα κύτταρα, το μέσο αυτό σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι θερμοκρασίες του υγρού αζώτου (-196 °C) αποτρέπει το σπάσιμο των κυττάρων, όμως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως αυτήν των 37°C είναι τοξικό για τα κύτταρα επομένως η διαδικασία απομάκρυνσης του πρέπει να είναι σχετικά σύντομη.

Μετά την φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και κρατείται το ίζημα (κύτταρα), όπου επαναδιαλύεται σε RPMI 1640 και διαμοιράζεται σε μικρές φλάσκες. Τέλος, γίνεται έλεγχος των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα με υγρανση και CO<sub>2</sub> 5%.

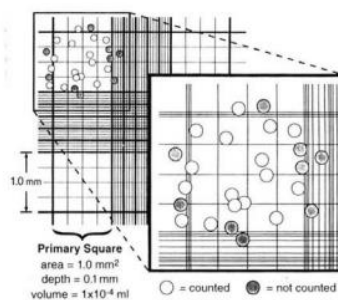
Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε 2-3 ημέρες. Στόχος της ανακαλλιέργειας είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων της φλάσκας. Κατά το στάδιο αυτό παρατηρούνται διάφορες αλλαγές των κυττάρων όπως είναι το μέγεθος καθώς και η αναστολή ανάπτυξης τους όταν το θρεπτικό μέσο εξαντλείται. Επιπλέον, αλλαγές παρατηρούνται και με γυμνό μάτι στο θρεπτικό μέσο RPMI 1640, όπου από φωτεινό κόκκινο χρώμα θολώνει και γίνεται ανοιχτό πορτοκαλί, αυτό οφείλεται λόγω των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων και των

προϊόντων ανταλλαγής της ύλης όπου μπορούν να καταστούν βλαβερά για τη ζωτικότητα των κυττάρων

### 2.3.3 Έλεγχος της βιωσιμότητας και της πυκνότητας των κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων όπως επίσης και η βιωσιμότητά τους υπολογίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια πλάκας Neubauer (ή αιμοκυτταρόμετρο) και της χρωστικής trypan blue. Ο υπολογισμός γίνεται με ένα μικρό δείγμα κυττάρων που περιέχεται στο εναιώρημα και στη συνέχεια υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που περιέχεται στο αρχικό δείγμα.

Η πλάκα Neubauer είναι κατασκευασμένη από ειδικό γυαλί όπου στο μέσο της επιφάνειάς του υπάρχει ένα πολύ μικρό πλέγμα, στο οποίο βρίσκεται και η περιοχή μέτρησης των κυττάρων, πάνω από αυτό τοποθετείται η ειδική καλυπτρίδα της πλάκας πριν την τοποθέτηση του προς μέτρηση δείγματος (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2:** Ενδεικτική περιοχή μέτρησης των κυττάρων.

(Πηγή:<https://nemertes.library.upatras.gr/jspui/handle/10889/4761>)

#### Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Trypan blue 0,2% (w/v) (Sigma- Aldrich T6146-5G)
- PBS (Phosphate Buffer) (TAKARA)

#### Αναλυτική πορεία:

Μεταξύ των ανακαλλιιεργειών των κυττάρων και αφού φυγοκεντρηθούν και επαναιωρηθούν σε καινούργιο RPMI 1640, για την εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους στη πλάκα Neubauer γίνεται 1:10 αραιώση των κυττάρων με PBS μαζί με τη χρωστική. Στη συνέχεια μετριέται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων καθώς και το ποσοστό βιωσιμότητάς τους.

Η χρωστική trypan blue έχει την ιδιότητα να χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα. Δεν μπορεί να εισχωρήσει στα ζωντανά κύτταρα λόγω της κυτταρικής τους μεμβράνης όπου δεν μπορεί να τη διαπεράσει.

**Η βιωσιμότητα υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:**

$$\text{Βιωσιμότητα \%} = \frac{\text{ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων}}{\text{ολικό αριθμό των κυττάρων}} \times 100$$

Η βιωσιμότητα των κυττάρων πρέπει να είναι >85%.

**Και η πυκνότητα των κυττάρων υπολογίζεται από την κάτωθι εξίσωση:**

$$\text{Αριθμός κυττάρων/mL} = \text{Μέσος όρος αριθμού κυττάρων ανά τετράγωνο} \times \text{αραίωση} \times 10^4$$

### **2.3.4 Διαφοροποίηση των TH1-1 μονοκύτταρων σε μακροφάγα**

Η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα έγινε με την προσθήκη διαλύματος phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Κατά την διάρκεια του πειράματος χρειάστηκε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες έκθεσης των κυττάρων στο PMA, που είναι απαραίτητες ώστε τα μονοκύτταρα να εμφανίσουν μια σωστή μορφολογική κατάσταση με έντονη προσκολλητική ικανότητα στο πιάτο καλλιέργειας και σε μεγάλο ποσοστό κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Έτσι, έγιναν διάφορες δοκιμές στην έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του PMA και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (Chanput, Mes, and Wichers 2014).

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- PMA
- LPS (Bacterial Lipopolysaccharides) από το βακτήριο Escherichia coli (TLR4 agonist, Sigma O111:B4) διαλυμένο σε 1x PBS (phosphate buffer saline, TAKARA)
- PBS αποστειρωμένο (TAKARA)

Απαιτούμενος εξοπλισμός και όργανα:

- Ηλεκτρονικός αναρροφητήρας πιπετών
- Γυάλινες πιπέτες των 5mL- 10 mL- 25mL
- Falcons των 50mL
- Πιάτα κυτταρικής καλλιέργειας 6 οπών
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK 2)

Το PMA είναι ο πιο αποτελεσματικός παράγοντας διαφοροποίησης για τη λήψη ώριμων μακροφάγων που προέρχονται από μονοκύτταρα THP-1. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν πλήρως σε μακροφάγα μετά από 48 ώρες επώαση σε συγκέντρωση 100 ng/ml (Chanput, Mes, and Wichers 2014). Μετά τις 48 ώρες, το εναιώρημα απορρίφθηκε και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, προκειμένου να καθαριστούν τα κύτταρα. Έπειτα, προστέθηκε φρέσκο RPMI 1640 στα κύτταρα και αυτά επώαστηκαν για ακόμη 24 ώρες (rest phase-φάση «ξεκούρασης»).

Διάφορα φαινοτυπικά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα κατά τη διέγερση με PMA όπως η κυτταρική προσκόλληση, η υψηλή φαγοκυτταρική ικανότητα και η έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας που εξαρτώνται από τη διαφοροποίηση, η αλλαγή της μορφολογίας τους σε επίπεδο με αμοιβοειδές σχήμα με καλά ανεπτυγμένες συσκευές Golgi, τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και μεγάλους αριθμούς ριβοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα (Chanput, Mes, and Wichers 2014).

### **2.3.5 Διέγερση κυττάρων με LPS**

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS, lipopolysaccharide [ενδοτοξίνη]), είναι το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποσαφηνίσει πως το LPS αναγνωρίζεται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο LPS και ανταποκρίνονται εκφράζοντας τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η υπερβολική αντίδραση στη παρουσία LPS μπορεί να οδηγήσει σε σήψη, σηπτικό σοκ ή σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (M. Guha and Mackman 2001).

Τα κύτταρα THP-1 έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως *in vitro* μοντέλο ανθρώπινων μονοκυττάρων και μακροφάγων σε μελέτες φλεγμονωδών ασθενειών. Πιστεύεται ότι τα φλεγμονώδη μονοκύτταρα στρατολογούνται και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα στο σημείο της μόλυνσης, σε πειράματα *in vitro* τα κύτταρα περιγράφονται ως σε κατάσταση ενεργοποίησης, η οποία μπορεί να ληφθεί διεγείροντας κύτταρα THP-1 με φλεγμονώδεις ενεργοποιητές όπως το LPS. Για τον λόγο αυτό γίνεται διέγερση των κυττάρων με 100ng/ ml για 3 ώρες, για ήπια φλεγμονή και τη συνέχεια εκτίμηση του αποτελέσματος

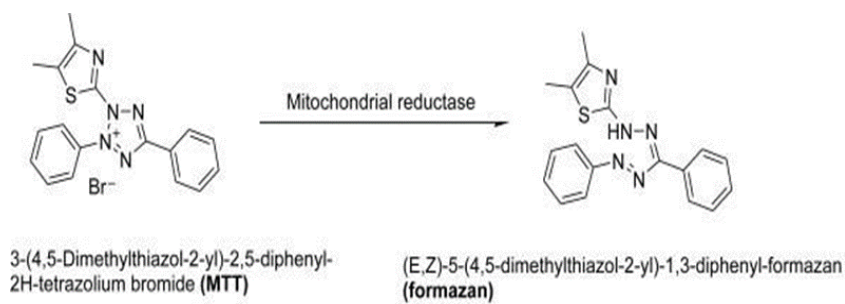
### **2.3.6 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT**

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης του όξινου ορού γιαούρτης χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), με την οποία αξιολογείται η μεταβολική δραστηριότητα και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, καθώς και η κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η μέγιστη συγκέντρωση του



όξινο ορό γιαούρτης που έχει υποστεί πέψη μετά από την έκθεσή τους στα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Merck με το σκεύασμα MTT Cell Growth Kit.

Τη μέθοδο αυτή περιέγραψε πρώτος ο (Mosmann 1983) και στηρίζεται στην ικανότητα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (ζωντανών κυττάρων) που παρουσιάζουν συνεχή μιτοχονδριακή δραστηριότητα και της ικανότητας του μιτοχονδριακού ενζύμου της αφυδρογονάσης, να ανάγουν το αδιάλυτο κιτρικό άλας τετραζολίου MTT σε διαλυτούς ιώδεις κρυστάλλους φορμαζάνης. Το αποτέλεσμα αυτό επιτυγχάνεται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικά ενεργά, συνεπώς η παραγωγή ενδοκυτταρικά κρυστάλλων φορμαζάνης, αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Η αδιάλυτη φορμαζάνη διαλυτοποιείται με τη προσθήκη οργανικού διαλύτη DMSO (dimethylsulphoxide) και η οπτική πυκνότητα του παραχθέντος χρώματος υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 570 nm, όπου και σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων.



**Εικόνα 2.3:** Ενζυμική αναγωγή MTT σε φορμαζάνη (Babacan et al. 2021).

#### Αναλυτική πορεία:

Αρχικά γίνεται επίστρωση των κυττάρων σε πλάκα μικροτιλοδότσης 96 βοθρίων με πυκνότητα 80.000 κύτταρα ανά βοθρίο (80.000 cells/ 100  $\mu$ L) με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 και προσθήκης 10% (v/v) FBS, το οποίο παρέχει στα κύτταρα απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες και στη συνέχεια επωάζονται με σκοπό την διαφοροποίησή τους για 48 ώρες στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Έπειτα, ακολουθεί η φάση της ανάπαυσης των κυττάρων, όπου απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, γίνεται καθαρισμός των κυττάρων με PBS και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό με σκοπό να παραμείνουν για 24 ώρες ακόμα στον επωαστικό θάλαμο (συνθήκες: 37°C , 5% CO<sub>2</sub>). Μετά την φάση της ανάπαυσης απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο, το οποίο αντικαθίσταται με διαφορετική περιεκτικότητα των 10%, 20% και 40%, του προϊόντος πέψεως όξινο ορό γιαούρτης με το κλάσμα που περιείχε τα πεπτίδια < 3 kDa και στη συνέχεια τα βοθρία συμπληρώνονται με RPMI 1640 και οδηγούνται στον

επωαστικό κλίβανο με χρόνο έκθεσης των κυττάρων στον όξινο ορό 24 ώρες. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται ο όξινος ορός καθώς και το RPMI 1640 και σε όλα τα βοθρία με τα κύτταρα προστίθεται 0,5 mg/mL MTT. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται για 3 ώρες στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, με σκοπό να πραγματοποιηθεί η χρωμοαντίδραση. Δείκτης για τον ικανοποιητικό μεταβολισμό του MTT στα βοθρία αποτελεί ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης ενδοκυτταρικά, επομένως η μετατροπή του MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης αποτελεί ένδειξη για την μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων.

Μετά την οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό και προστίθεται 100μL DMSO σε κάθε βοθρίο με σκοπό την διαλυτοποίηση των σχηματισμένων ενδοκυτταρικών κρυστάλλων φορμαζάνης και σχηματισμού του ιώδους χρώματος. Τέλος, ακολούθησε η φωτομέτρηση της πλάκας σε μήκος κύματος 570 nm (TECAN INFINITE 200 PRO). Το DMSO χωρίς κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα χωρίς την προσθήκη όξινου ορού. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

Βιωσιμότητα% = (απορρόφηση δείγματος - απορρόφηση DMSO) / (απορρόφηση μάρτυρα - απορρόφηση DMSO) x 100

## **2.4 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας**

### **2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA**

Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL (Macherey- Nagel, Germany) που έχει σχεδιαστεί για την απομόνωση ολικού RNA (μικρού και μεγάλου RNA) σε ένα ενιαίο ή χωριστό κλάσμα από μια ποικιλία υλικών δειγμάτων, όπως κύτταρα, ιστοί και υγρά ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, βακτήρια, ζυμομύκητες, φυτά, ιογενή υλικά και άλλες πηγές. Ακολουθεί η αναλυτική διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA με βάση τις οδηγίες του αντιδραστηρίου:

#### Απαιτούμενα αναλώσιμα:

- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρησης (eppendorf tubes) των 1,5 mL
- Στατώ σωληναρίων eppendorfs
- Αυτόματες πιπέτες προσαρμοσμένου όγκου (0,5-10 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL)
- Πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη (tips) ανάλογες με τον όγκο της πιπέτας
- Πλαστικά βιδωτά σωληνάρια τύπου falcon των 50mL
- Στατώ σωληναρίων falcon
- Κάδος για την απόρριψη υγρών

- Κάδος για την απόρριψη των tips
- Χάρτινα ή πλαστικά κουτιά αποθήκευσης φυγοκεντρικών σωλήνων 1,5 mL αντίστοιχο καπάκι
- Ψηφιακό χρονόμετρο

#### Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- NucleoZOL (Macherey- Nagel)
- Δις απεσταγμένο νερό (Depc water)
- Isopropanol (Ισοπροπανόλη) (Sigma- Aldrich 33539- 2,5L)
- Διάλυμα αιθανόλης 80%

#### Απαιτούμενα μηχανήματα:

- Αναδευτήρας Vortex (Scientific Industries, Vortex genie 2)
- Φυγόκεντρος εργαστηρίου (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)
- Θερμοαντιδραστήρας (thermoblock)

### **Πειραματική διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA:**

#### **Ομογενοποίηση**

Αρχικά αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκαν 400μL NucleoZOL σε κάθε βοθρίο για την λύση των προσκολλημένων κυττάρων.

Διασφαλίσθηκε η πλήρης λύση των προσκολλημένων κυττάρων με επαναλαμβανόμενο “πιπετάρισμα” (up and down) σε κάθε μεριά του βοθρίου περίπου ένα λεπτό για το κάθε βοθρίο. Αρχικά παρατηρείται ότι το ίζημα αποκτά βλεννώδη μορφή και με το συνεχόμενο “πιπετάρισμα” και λύση των κυττάρων αυτό ομογενοποιείται, στη συνέχεια το κάθε προϊόν λύσης μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα αναγραφόμενα erpendorfs.

#### **Κατακρήμνιση ρύπων**

Σε κάθε erpendorf που περιείχε τα αντίστοιχα προϊόν λύσης προστέθηκαν 120μL DEPC Rnase – free H<sub>2</sub>O. Έπειτα, γίνεται καλή ανάδευση αυτών στο μηχάνημα vortex και επώαση τους σε θερμοκρασία δωματίου (RT: room temperature) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12.000g σε θερμοκρασία δωματίου (στο υπερκείμενο

διαλυτοποιείται το RNA, ενώ στο ίζημα έχουν καθιζάνει το DNA, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες).

Το υπερκείμενο 400μL, μεταφέρεται σε νέο eppendorf.

### **Καθίζηση ολικού RNA**

Προστέθηκαν 400μL, ίση ποσότητα με το υπερκείμενο, ισοπροπανόλης προκειμένου να καταβυθιστεί το RNA. Έγινε καλό vortex, επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 12.000g.

### **Πλύση RNA**

Το υπερκείμενο απορρίφθηκε με προσοχή και έγινε πλύση του ιζήματος με αιθανόλη 80%, 2 φορές. Προστέθηκαν 500mL ET-OH 80% και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 12.000g. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο με προσοχή και επαναλήφθηκε η πλύση για ακόμα μια φορά. Με την ολοκλήρωση και της δεύτερης πλύσης και την αφαίρεση του υπερκείμενου στα δείγματα γίνεται air dry για λίγα λεπτά έως ότου γίνει η εξολοκλήρου εξάτμιση της αιθανόλης που ενδεχομένως να έχει απομείνει.

### **Ανασύσταση RNA (επαναδιάλυση)**

Το ίζημα RNA διαλύθηκε με την προσθήκη 30μL DEPC H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια έγινε καλό vortex για την αποτελεσματική διαλυτοποίησή του RNA και έπειτα μεταφορά των tubes στο thermoblock για 5 λεπτά στους 65 °C.

Τα eppendorfs αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

### **Έλεγχος ποιότητας και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων με NanoDrop**

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης του ολικού RNA και πριν επέλθει το επόμενο πειραματικό στάδιο, (DNase treatment), γίνεται έλεγχος των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop. Όπου εκεί αξιολογείται:

Η **καθαρότητα** των νουκλεϊκών οξέων (RNA και DNA) με αναλογία απορρόφησης μήκους κύματος 260/280nm.

Η **καθαρότητα** του RNA με αναλογία απορρόφησης 260/230 nm.

Η **συγκέντρωση** του RNA.

## Μέτρηση στο NanoDrop

### Απαιτούμενος εξοπλισμός και υλικά:

- Πάγος
- Στατώ
- Αυτόματη πιπέτα προσαρμοσμένου όγκου 0,5-1μL
- Πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη (tips)
- DEPC H<sub>2</sub>O
- Μαλακό διηθητικό χαρτί
- Μηχάνημα Vortex
- Μηχάνημα spin down
- Nanodrop- UV- Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)

### Αναλυτική διαδικασία μέτρησης:

Αρχικά αφού βγουν τα δείγματα από την βαθιά κατάψυξη αφήνονται να ξεπαγώσουν ομαλά στο πάγο, στη συνέχεια γίνεται ένα καλό vortex και spin down, για να γίνει η μέτρησή τους παραμένουν στον πάγο καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων.

Προτού ξεκινήσει η μέτρηση ρυθμίζεται η συσκευή για τη φωτομέτρηση του RNA και έπειτα γίνεται ο μηδενισμός της συσκευής (blank measurement), όπου τοποθετείται 1μL DEPC H<sub>2</sub>O στην ακίδα μέτρησης, αμέσως μετά τον μηδενισμό της συσκευής γίνεται καθαρισμός και τον δύο ακίδων με απαλούς χειρισμούς. Στη συνέχεια ξεκίνα η μέτρηση των δειγμάτων μεταφέροντας για κάθε μέτρηση 1μL από το κάθε δείγμα και με την ολοκλήρωση της μέτρησης γίνεται καθαρισμός των ακίδων πριν την μεταφορά του επόμενου δείγματος.

Μετά από κάθε μέτρηση για κάθε δείγμα εμφανίζονται στην οθόνη του υπολογιστή τα αποτελέσματα όπου καταγράφεται η συγκέντρωση του RNA (ng/μL), η οπτική πυκνότητα (OD= Optical Density), η απορρόφηση δηλαδή των μορίων ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στα μήκη κύματος 230nm 260nm και 280nm και αντίστοιχα τους λόγους:

O.D.<sub>260</sub>/ O.D.<sub>280</sub>. Μια αναλογία με εύρος από 1,8- 2,2 είναι γενικά αποδεκτή ως «καθαρή» για το RNA. Τιμές χαμηλότερες από το εύρος αυτό υποδηλώνουν την παρουσία πρωτεΐνης, που απορροφάτε έντονα κοντά ή στα 280nm.

Και O.D.<sub>260</sub>/ O.D.<sub>230</sub> με εύρος 2,0- 2,2. Τιμές χαμηλότερες του εύρους υποδηλώνουν την παρουσία EDTA, φαινόλης, υδρογονανθράκων ή άλλων ρύπων που απορροφούνται κοντά στα 230nm.

#### **2.4.2 DNase Treatment- καθαρισμός ολικού RNA με DNase I**

Για την προετοιμασία μιας καλής ποιότητας RNA για το πείραμα είναι απαραίτητο να γίνει ο καθαρισμός του, διότι κατά τη διάρκεια απομόνωσης του ολικού RNA, υπάρχει πιθανότητα ενδεχομένως να παραμείνουν υπολείμματα γονιδιωματικού DNA στα δείγματα, όπου αυτό θα οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα στη qPCR.

Ο καθαρισμός του ολικού RNA επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση I (Dnase I) υπεύθυνου για την αποδόμηση του DNA. Το ένζυμο αυτό είναι μια ενδονουκλεάση που «χωνεύει» το μονόκλωνο και δίκλωνο DNA, και η οποία υδρολύει επιλεκτικά φωσφοδιεστερικούς 3'- 5' δεσμούς μεταξύ των νουκλεοτιδίων (που συνδέουν τα νουκλεοτίδια) του DNA και παράγοντας μόνο- και ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδια με 5'- φωσφορικές και 3'-OH ομάδες, αυτό επιτυγχάνεται κατά την επώασή των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται το EDTA, (Ethylene Diamine Tetracetic Acid: εδετικό οξύ), ένας χηλικός παράγοντας, το οποίο προστατεύει το RNA σε υψηλές θερμοκρασίες (δεσμεύοντας μέταλλα όπως  $Mg^{+2}$   $Ca^{+2}$ ) και τοποθετούνται πάλι στο θερμικό κυκλοποιητή τα δείγματα στους 75°C για 10 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου Dnase I.

#### Απαιτούμενα υλικά:

- Dnase I Reaction buffer 10x (New England Biolabs, B030S)
- Dnase I ένζυμο (Rnase free) (New England Biolabs, M030L)
- DEPC (Rnase free) H<sub>2</sub>O
- Mili Q H<sub>2</sub>O
- EDTA (0,5 M)
- Γλυκογόνο
- Οξικό αμμώνιο (5M AA, με τελική συγκέντρωση 0,3M και pH 5,2)
- Διάλυμα αιθανόλης 100%

#### Απαιτούμενα αναλώσιμα:

- Αυτόματες πιπέτες προσαρμοσμένου όγκου (0,5-10μL και 20-200μL)
- Πλαστικά αποστειρωμένα tips
- Eppendorfs (Rnase free) tubes των 0,5mL και 1,5mL

- Στατώ σωληναρίων erpendorfs
- Erpendorf pcr cooler
- Κάδος απορριμμάτων

Απαιτούμενος εξοπλισμός:

- Μηχάνημα ανάδευσης- vortex(Scientific Industries, Vortex genie 2)
- Φυγόκεντρος (Biofuge pico, Heraeus instruments)
- Θερμικός κυκλοποιητής
- NanoDrop- UV- Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)

**Αναλυτική πορεία καθαρισμού ολικού RNA:**

Βασικό βήμα πρώτου ξεκινήσει η διαδικασία καθαρισμού του ολικού RNA είναι η αραίωση των δειγμάτων ούτως ώστε να έχουν όλα περίπου την ίδια συγκέντρωση (5.000g). Υπολογίσθηκαν 5.000g (τουλάχιστον 2.000g) για κάθε δείγμα και συμπληρώθηκαν με DEPC H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος να είναι 35μL, τα οποία τοποθετούνται σε tubes των 0,5 mL.

Στη συνέχεια σε ένα erpendorf των 1,5ml το οποίο διατηρείται σε παγοθήκη, δημιουργείται το master mix της Dnase I:

- 4μl Rnase I reaction buffer
- 1μl Rnase I ένζυμο

Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπολογίζεται ένα +10% του αντιδραστηρίου λόγω των απωλειών που ενδεχομένως να προκύψουν κατά το πιπετάρισμα.

Μεταφέρονται σε κάθε δείγμα 5μl του mix, τα οποία διατηρούνται και αυτά πλέον σε παγοθήκη. Αμέσως μετά επωάζονται σε θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 20 λεπτά. Έπειτα προστίθενται από 1μl EDTA και τέλος επωάζονται ξανά στους 75°C για 10 λεπτά.

**Ethanol precipitation**

Σε erpendorf του 1,5 ml και ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπολογίζοντας ένα +10% για τυχόν απώλειες δημιουργείται ένα mix:

- 4μl οξικό αμμώνιο (5M)
- 1μl γλυκογόνο

Τα δείγματα αρχικά μεταφέρονται σε eppendorfs των 1,5ml και σε κάθε δείγμα μεταφέρονται 5μl από το mix και στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 100μl ET-OH 100%. Τα δείγματα τοποθετούνται στη βαθιά κατάψυξη στους – 80 °C για 2 ώρες ή όλο το βράδυ.

Έπειτα βγαίνουν από την κατάψυξη και στη συνέχεια γίνεται ένα καλό vortex ακολουθώντας η φυγοκέντρωση τους για 20 λεπτά στα 12.000g και απορρίπτεται προσεκτικά το υπερκείμενο αφήνεται να στεγνώσει (air dry) το pellet και επαναιωρούντε τα δείγματα με mili Q H<sub>2</sub>O και τέλος γίνεται εκ νέου ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA των δειγμάτων στο NanoDrop.

### **2.4.3 Αντίδραση αντίστροφής μεταγραφής– Δημιουργία cDNA**

Η αντίστροφη μεταγραφή (reverse transipitation, RT) είναι μια ενζυμική διαδικασία κατά την οποία το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) συντίθεται έχοντας ως καλούπι (εκμαγείο) μια αλληλουχία RNA με τη δράση RNA – εξαρτώμενων DNA πολυμερασών, δηλαδή την αντίστροφη μεταγραφάση. Απαιτεί ένα μικρό ολιγονουκλεοτιδικό DNA – εκκινητή. Υπάρχουν διάφοροι εκκινητές συμπεριλαμβανομένων των ειδικών για το γονίδιο – στόχο (εκκινητών αντιστροφής) (GSRP), των όλιγο (d)Ts και των τυχαίων εξαμερών (random 6 mers). Οι GRSPs (Gene- Specific Reverse Primers, GRSPs) είναι ειδικά διαμορφωμένοι για το cDNA που πρόκειται να συντεθεί και το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για την επιλεκτική αντίστροφη μεταγραφή τμήματος RNA. Τα όλιγο πεπτίδια (oligo- deoxythymidine, oligo dTs), εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης, αποτελούνται από μικρά τμήματα θυμινών και στοχεύουν επιλεκτικά σε τμήματα RNA με πολυA + ουρά ή οποιοδήποτε τμήμα πολυA αλληλουχιών. Τα εξαμερή είναι μίγματα εκκινητών με τυχαίες αλληλουχίες, μήκους 6 ζευγών βάσεων με ποικίλες αλληλουχίες, τα οποία συνδέουν τυχαία τις συμπληρωματικές αλληλουχίες RNA (Bookout and Mangelsdorf 2003).

Μετά από τον καθαρισμό του RNA ακολουθεί η δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA), κατά την οποία το απομονωμένο RNA χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση του cDNA. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι απαραίτητη για να ακολουθήσουν στη συνέχεια οι αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω RT- PCR (Real Time Reverse transcription polymerase chain reaction). Για το στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time της εταιρίας Takara Bio Inc και το πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας.

#### **Απαιτούμενα αναλώσιμα και εξοπλισμός:**

- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου



- Tips
- Eppendorf tubes (0,2 mL και 1,5 mL)
- Παγοθήκες για τα tubes
- Θερμικός κυκλοποιητής

**Πίνακας 2.3:** Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5X Prime Script Buffer (for Real Time)	2 $\mu$ L	1x
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0,5 $\mu$ L	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	50 pmol
Rnase Free dH <sub>2</sub> O-Mili Q	= 6,5 $\mu$ L – total RNA	
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>	

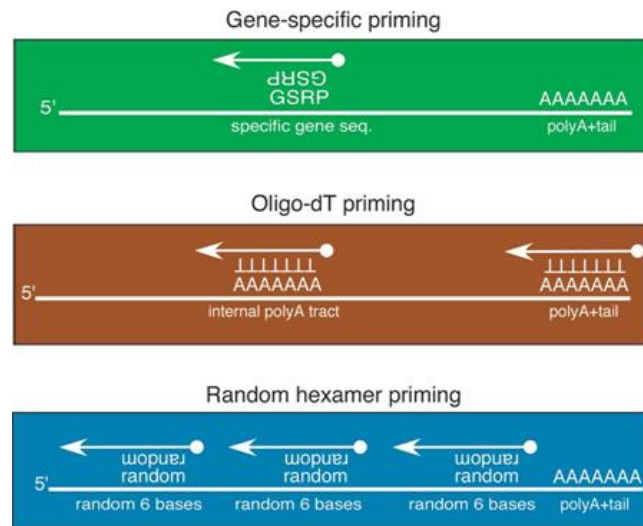
Πειραματική πορεία:

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας το RNA που χρησιμοποιείται ως καλούπι θα πρέπει να έχει συγκέντρωση 500 ng για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το μίγμα με τα αντιδραστήρια που περιέχονται στον πίνακα 2.3, το οποίο και διατηρήθηκε σε παγοθήκες και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στα eppendorf tubes που περιείχαν το RNA, τοποθετημένα και αυτά σε παγοθήκες. Ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος θα πρέπει να είναι 10  $\mu$ L.

Στη συνέχεια τα tubes με το μίγμα οδηγήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή όπου και επωάστηκαν στις ακόλουθες συνθήκες:

1. 37°C για 15 min (αντίστροφη μεταγραφή)
2. 85°C για 5 sec (απενεργοποίηση αντίστροφης μεταγραφάσης με θερμική επεξεργασία)
3. 4°C (ψύξη των cDNA δειγμάτων)

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους -20°C.



**Εικόνα 2.4:** Είδη εκκινητών για αντίστροφη μεταγραφή του RNA (Bookout and Mangelsdorf 2003).

#### 2.4.4 Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR)

Η βάση του qPCR, είναι η παρακολούθηση της διαδικασίας ενίσχυσης του DNA καθοδηγούμενη από την DNA- πολυμεράση, η οποία είναι γνωστή και ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε «πραγματικό χρόνο». Σε μια αντίδραση PCR ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο DNA πολυμεράση, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA συμπληρωματικών προς την αλληλουχία του DNA – στόχου. Στην αντίδραση, αυτό το ένζυμο αναμιγνύεται με το εκμαγείο DNA (αρχικό γενετικό υλικό που περιέχει την αλληλουχία-στόχο cDNA), με τους εμπρόσθιους και αντίστροφους εκκινητές (μικρά κομμάτια μονόκλωνου DNA που έχουν σχεδιαστεί για να συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο του DNA και να επιτρέπουν τη σύνθεση του DNA και προς τις δύο κατευθύνσεις) και τα νουκλεοτίδια (μεμονωμένες μονάδες των βάσεων DNA γνωστές ως τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτιδικά [dNTPs]) (Kuang et al. 2018).

Η αντίδραση προχωρά μέσα από τρεις κυκλικά επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις σε κάθε κύκλο:

- **Αποδιάταξη** (διαχωρισμός κλώνων). Η επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA – στόχου σε μονόκλωνο και να τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής σε μονόκλωνο DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται η υψηλότερη θερμοκρασία που μπορεί να αντέξει η DNA πολυμεράση, 95°C.
- **Υβριδισμός** (δέσμευση εκκινητή). Κατά τη διάρκεια της ανόπτησης, τα δείγματα ψύχονται σε θερμοκρασίες συνήθως 50-60 °C, θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η αποδιάταξη των εκκινητών με σκοπό στη συνέχεια τη δέσμευση τους με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονόκλωνου DNA- στόχου.

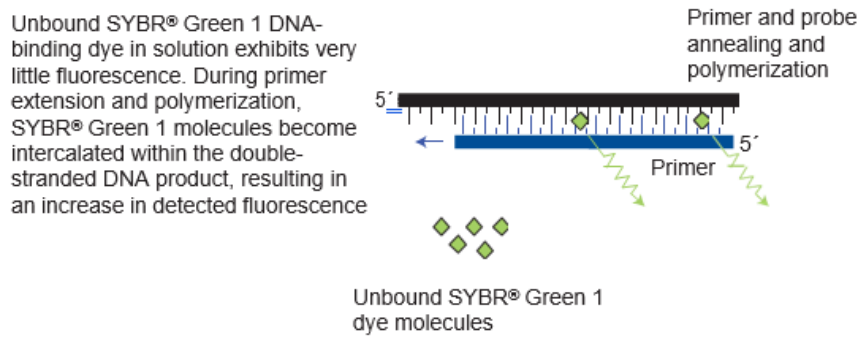
- **Επέκταση** (σύνθεση νέου κλώνου). Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-72 °C όπου η δραστηριότητα της DNA- πολυμεράσης είναι βέλτιστη και η αντιγραφή του εκκινητή εμφανίζεται με ρυθμούς έως και 100 βάσεις ανά δευτερόλεπτο.

Έτσι επιτυγχάνεται η σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με την πρόσδεση των εμπρόσθιων εκκινητών (Forward) στο 5' άκρο της αλυσίδας DNA, και αντίστοιχα των αντίστροφων εκκινητών (Reverse) που προσδένονται στο 3' άκρο της αλυσίδας. Το αμπλικόνιο για το προϊόν PCR θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερο, συνήθως 50-150 bp. Τα μικρότερα αμπλικόνια ενισχύονται πιο αποτελεσματικά και είναι πιο ανεκτικά στις συνθήκες αντίδρασης. Το βέλτιστο μήκος για μονόκλωνους εκκινητές είναι 15-20 νουκλεοτίδια με περιεκτικότητα σε G/C βάσεων 20-80%. Τα μικρότερα μόρια είναι πιο ανθεκτικά στις συνθήκες αντίδρασης και πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη απόδοση (Arya et al. 2005).

Η αποτελεσματικότητα της σύνδεσης είναι εξαρτώμενη και από τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης, όπου προσδένει τα τμήματα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Για να επιτευχθεί υψηλή αποτελεσματικότητα (αύξηση του αριθμού των αντιγράφων PCR ανά κύκλο), τόσο η συγκέντρωση των εκκινητών όσο και η συγκέντρωση του cDNA πρέπει να βελτιστοποιηθούν για διάφορα γονίδια στόχους που πρόκειται να μελετηθούν (Arya et al. 2005).

Στο τέλος της αντίδρασης PCR, η αλληλουχία στόχος θα ενισχυθεί σε δισεκατομμύρια αντίγραφα (amplicons PCR). Η qPCR είναι σε θέση να ανιχνεύσει την ενίσχυση των δισεκατομμυρίων αντιγράφων της PCR στο τέλος κάθε κύκλου ενίσχυσης, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα φθορίζουσας βαφής και έναν θερμοκυκλοποιητή με ικανότητα ανίχνευσης φθορισμού (Kuang et al. 2018).

Μια από τις πιο δημοφιλείς και οικονομική χρησιμοποιούμενη χημική ουσία qPCR για την ανίχνευση των αμπλικονίων της PCR (amplicons PCR) είναι η χρωστική ουσία SYBR Green I (βρωμιούχο αιθίδιο) η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιαδήποτε συνδιασμό εκκινητών για οποιοδήποτε γονίδιο- στόχο και η οποία φθορίζει μόνο όταν συνδέεται με δίκλωνο DNA (Kuang et al. 2018). Στη παρούσα εργασία η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι η IC Green (Fast Gene IC Green 2 x qPCR Universal Mix, Nippon Genetics).



**Εικόνα 2.5:** Σύνδεση της χρωστικής ουσίας SYBR Green I με το δίκλωνο μόριο DNA (Arya et al. 2005).

### Melting curve (καμπύλη αποδιάταξης)

Η δημιουργία και η σύγκριση καμπυλών αποδιάταξης των μορίων DNA, που απεικονίζουν τον φθορισμό ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, είναι μια μέθοδος αύξησης της ειδικότητας της αντίδρασης. Μια χαρακτηριστική κορυφή αποδιάταξης στη θερμοκρασία αποδιάταξης ( $T_m$ ) των πολλαπλασιαζόμενων μορίων cDNA (αμπλικονίων) εμφανίζονται ως διακριτές κορυφές. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας τον φθορισμό πάνω από τη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών. Η εμφάνιση μιας μονό κορυφής στην καμπύλη υποδηλώνει την ενίσχυση του σωστού προϊόντος (Argy et al. 2005).

**Πίνακας 2.4:** Εκκινητές των υπό μελέτη γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Αποδοτικότητα (%)	Συγκέντρωση (nM)
NrF2	5'-GATCTGCCAACTACTCCCA-3'	3'-GCCGAAGAAACCTCATTGTC-5'	90	200
CAT	5'-TGCCTATCCTGACACTCACC-3'	3'-GAGCACCACCCTGATTGTC-5'	92	300
SOD	5'-CGAGCAGAAGGAAAGTAATGG-3'	3'-CCAAGTCTCCAACATGCC-5'	95	300
HMOX1	5'-GCTTCAAGCTGGTGATGG-3'	3'-AGCTCTTCTGGGAAGTAGAC-5'	90	400

## Πειραματικό στάδιο:

### Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου και filter tips
- Eppendorf tubes (0,2 και 0,5 mL)
- Πλάκες 96 θοθρίων (Splash free support base SG 09 A5- 1A)
- Καλύμματα για τις πλάκες (Optical Adhesive Film , Applied Biosystems)
- Εργαλείο επίστρωσης καλυμμάτων (MicroAmp Adhesive Film Applicator, SG 13A7- 3B)
- Παγοθήκες eppendorf tubes

### Απαιτούμενα όργανα:

- Φυγόκεντρος (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific)
- Θερμικός κυκλοποιητής (Real Time PCR Systems 7500, Applied Biosystems)

### Αναλυτική πορεία:

Πραγματοποιήθηκε η μελέτη της διακύμανσης της έκφρασης των γονιδίων Nuclear factor 2 (NRF2), (Superoxide Dismutase) SOD1, (Catalase) CAT και Heme Oxygenase-1 (HMOX1) τα οποία σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαούρτης. Η πειραματική διαδικασία εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Fast Gene IC Green 2 x qPCR Universal Mix, NIPPON Genetics.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε παγοθήκες και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη real time PCR καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία ακολουθούν τον πίνακα 2.5.

**Πίνακας 2.5:** Αναλογίες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του master mix

Συστατικά	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
<b>Forward Primer</b> <b>(10 μM)</b> <b>(F)</b>	0,15	150 nM
	0,2	200 nM
	0,3	300 nM
<b>Reverse Primer</b> <b>(10μM)</b> <b>(R)</b>	0,15	150 nM
	0,2	200 nM
	0,3	300 nM

2 x Fast Gene IC Green	5	x1
dH <sub>2</sub> O	9 – (5+F+R)	
Τελικός Όγκος	9 $\mu$ L	

**Πίνακας 2.6:** Συνθήκες Real Time qPCR

Στάδια	Θερμοκρασία °C	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	2 min	1
Αποδιάταξη	95	5 sec	40
Υβριδισμός εκκινητών/ πολυμερισμός	60	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95	15 sec	1
	60	1 min	
	60°C-αυξάνεται ανά 0,3°C/ sec	15 sec	

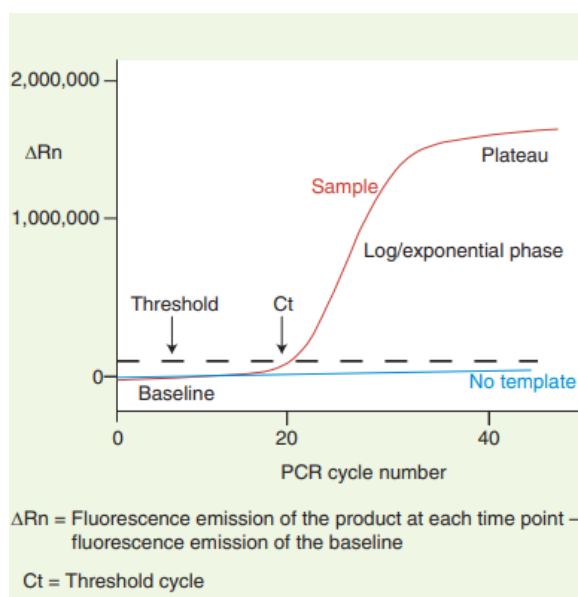
Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων:

Η εικόνα 2.6 δείχνει ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα ενίσχυσης, το οποίο φανερώνει την αύξηση της εκπομπής φθορισμού κατά την αντίδραση με την πάροδο του χρόνου, από το λογισμικό του θερμικού κυκλοποιητή σε πραγματικό .

- **Baseline (Βασική γραμμή- Έναρξη):** Αυτή η φάση αντιστοιχεί στο αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού, όπου στους κύκλους της PCR συσσωρεύεται ένα φθορίζον σήμα αναφοράς και βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Το λογισμικό του υπολογιστή ορίζει ως γραμμή βάσης από τον 3<sup>ο</sup> έως τον 15<sup>ο</sup> κύκλο (Argy et al. 2005).
- **$\Delta Rn$ :** είναι ένα πρόγραμμα λογισμικού του υπολογιστή το οποίο υπολογίζει το  $\Delta Rn$  χρησιμοποιώντας την εξίσωση  $Rn = Rnf - Rnb$ , όπου  $Rnf$  είναι η εκπομπή φθορισμού του προϊόντος σε κάθε χρονικό σημείο και  $Rnb$  είναι η εκπομπή φθορισμού στην έναρξη (baseline). Οι τιμές  $\Delta Rn$  σχεδιάζονται σε σχέση με τον αριθμό του κύκλου, κατά τους πρώτους κύκλους της ενίσχυσης PCR οι τιμές  $\Delta Rn$  δεν υπερβαίνουν τη βασική γραμμή (Argy et al. 2005).
- **Threshold (κατώφλι):** είναι ένα αυθαίρετο κατώφλι που υπολογίζεται από τους υπολογιστές με βάση τη μεταβλητότητα της γραμμής βάσης. Ένα σήμα φθορισμού

που ανιχνεύεται πάνω από αυτό το όριο (κατώφλι), θεωρείται πραγματικό σήμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του κύκλου κατώφλιού (Ct, threshold cycle) για ένα δείγμα (Arya et al. 2005).

- **Ct:** ορίζεται ως ο κλασματικός αριθμός κύκλου PCR στον οποίο ο φθορισμός αναφοράς είναι μεγαλύτερος από το ελάχιστο επίπεδο δέσμευσης, δηλαδή το κατώφλι. Η Ct είναι μια βασική αρχή της PCR σε πραγματικό χρόνο και αποτελεί βασικό στοιχείο για την παραγωγή ακριβών και αναπαραγωγίμων δεδομένων. Η Ct εμφανίζεται πάντα κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης πολλαπλασιασμού. Καθώς τα συστατικά της αντίδρασης περιορίζονται, ο ρυθμός ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου μειώνεται έως ότου η αντίδραση PCR δεν παράγει πλέον εκμαγείο με εκθετικό ρυθμό (plateau phase) και υπάρχει μικρή ή καμία αύξηση στο προϊόν PCR. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης κανένα από τα συστατικά δεν είναι περιορισμένα και επομένως οι τιμές Ct είναι πολύ αναπαραγωγικές για επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις με τον ίδιο αρχικό αριθμό αντιγράφου (Arya et al. 2005).



**Εικόνα 2.6:** Μοντέλο γραφικής παράστασης που απεικονίζει την ονοματολογία που χρησιμοποιείται συνήθως στη ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Arya et al. 2005).



## 2.5 Αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού

Για τον πειραματικό προσδιορισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού χρησιμοποιήθηκε μείγμα τριών στελεχών των μικροοργανισμών *Salmonella enterica subsp. enterica* που ανήκουν στους οροτύπους *Typhimurium* και *Enteritidis*, μείγμα τριών στελεχών του *Escherichia coli* O157:H7 και μείγμα τεσσάρων στελεχών του *Lactobacillus plantarum*. Ελήφθησαν από την συλλογή του εργαστηρίου του Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η πιθανή αντιμικροβιακή δράση εξετάστηκε με εμβολιασμό των διαφορετικών ειδών όξινου ορού γιαουρτιού, από αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο και μίγμα από αίγαιο και πρόβειο γάλα με τα διαφορετικά μείγματα των μικροοργανισμών σε τρυβλία με οπές σε στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα και σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων.

### Απαιτούμενα υλικά:

- BHI Agar (OXOID, CM1136)
- BHI Broth (NEOGEN Culture Media, NCM0016A)
- MRS Agar (Condalab, 1043.00)
- MRS Broth (NEOGEN Culture Media, NCM0079A)
- Απεσταγμένο νερό
- Ringer tablets (1/4 strength) (NEOGEN Culture Media, NCM0191K)

### Απαιτούμενα αναλώσιμα:

- Πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Tips
- Ηλεκτρικός αναρροφητήρας πιπετών
- Γυάλινες πιπέτες των 10 και 25 mL
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Κουτάλι για το ζύγισμα
- Αποστειρωμένα στρογγυλά τρυβλία Petri
- Αποστειρωμένοι κρίκοι εμβολιασμού μιας χρήσης
- Duran

### Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Κλίβανος αποστείρωσης θρεπτικών υλικών και αναλώσιμων
- Laminar Air Flow

- Vortex
- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνήτης
- Επωαστικοί θάλαμοι με ιδανικές συνθήκες για κάθε μικροοργανισμό

### **2.5.1 Παρασκευή απαιτούμενων θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων**

Για το πείραμα χρειάστηκε να παρασκευαστούν B.H.I. (Brain Heart Infusion) Broth και Agar, M.R.S (Man Rogosa Sharpe) Broth και Agar και Ringer solution. Η προετοιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας των υλικών σε δοχεία Duran σε ποσότητες ανάλογες με την απαιτούμενη για το πείραμα και διάλυσή αυτών σε απεσταγμένο νερό. Αποστειρώνονται σε αυτόκαστο πριν τη χρήση στους 121° C για 15 min και όταν η θερμοκρασία τους πέσει γύρω στους 43 με 44 °C μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

### **2.5.2 Επανάκτηση των απομονωμένων στελεχών των τριών μικροοργανισμών και προετοιμασία εμβολίων**

Τα στελέχη των μικροοργανισμών διατηρούνται σε stock φιαλίδια με 20% γλυκερόλη και υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα BHI ή MRS Broth, ανάλογα τον μικροοργανισμό, σε συνθήκες κατάψυξης (-22°C). Η ενεργοποίηση και η ανανέωση τους καθώς και όλη η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες.

Για τις ανανεώσεις στελεχών, λαμβάνονται 100 μL από κάθε κατεψυγμένο στέλεχος και προστίθενται σε 10 mL υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα BHI ή MRS Broth ανάλογα με τον μικροοργανισμό, γίνεται καλή ανάδευση και στη συνέχεια επωάζονται στις ιδανικές συνθήκες για κάθε μικροοργανισμό, στους 37°C για *Salmonella enterica subsp. enterica* που ανήκουν στους ορότυπους *Typhimurium* και *Escherichia coli O157:H7* και στους 30°C για *Lactobacillus plantarum*, για την πρώτη ανανέωση τα στελέχη επωάζονται για 24h, ενώ για την δεύτερη με φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα για 18h.

### **2.5. 3 Έλεγχος καθαρότητας**

Κατά τη διάρκεια των ανανεώσεων πραγματοποιούνται έλεγχοι με streaking των στελεχών σε τρυβλία με BHI και MRS Agar. Οι αποικίες των στελεχών θα πρέπει να είναι ομοιόμορφες, να έχουν ίδιο χρώμα και ίδιο μέγεθος.

### **2.5.4 Δημιουργία slant**

Με την ολοκλήρωση της Β' ανανέωσης, σε τρυβλία με BHI και MRS Agar για τα στελέχη των *E. Coli*, *Salmonella* και *Lactobacillus plantarum* αντίστοιχα, πραγματοποιείται γραμμική

εξάπλωση (streaking) των κυττάρων. Η καλλιέργεια μπορεί να συντηρηθεί έως και τρεις εβδομάδες σε θερμοκρασία 4 °C, απ' όπου δίνεται και η δυνατότητα λήψης μονής βακτηριακής αποικίας και μεταφορά της σε falcon με 10 mL αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο με σκοπό την ανανέωση της καλλιέργειας κοκ.

## **2.6 Έλεγχος της αντιμικροβιακής ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού μέσω της μεθόδου έγχυσης σε τρυβλία με άγαρ**

Το είδος δειγμάτων του όξινου ορού γιαούρτης που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία είναι, το αρχικό δείγμα όξινου ορού, τα λυοφιλοποιημένα πριν την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, τα δείγματα μετά την *in vitro* πέψη (SIF) και τα control που είναι τα δείγματα χωρίς όξινο ορό μετά την *in vitro* πέψη.

### **2.6.1.1 Καθαρισμός των στελεχών**

Μετά τη πάροδο της δεύτερης κυτταρικής ανανέωσης των καλλιεργειών, πραγματοποιείται καθαρισμός αυτών με αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer solution με σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και τον καθαρισμό των προϊόντων μεταβολισμού των μικροβίων. Σε πρώτη φάση γίνεται διαχωρισμός των μικροβιακών κυττάρων και του θρεπτικού μέσου με φυγοκέντριση τους σε 3600 rpm για 10 min στους 4°C. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα στελέχη επαναιωρούντε σε 10 mL αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer solution. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές και η τελική επαναιώρηση των κυττάρων γίνεται με 10mL υγρό θρεπτικό υλικό (BHI ή MRS) και η τελική συγκέντρωση των διαφορετικών στελεχών των μικροοργανισμών είναι 10<sup>9</sup> CFU/mL.

### **2.6.1.2 Ενσωμάτωση των στελεχών στο θρεπτικό υλικό και δημιουργία οπών**

Μετά τον καθαρισμό, σε duran των 250 mL με αποστειρωμένο υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα BHI και MRS Agar, προστίθενται μετά από καλή ανακίνηση 1% (2,5 mL) εμβόλιο στο αντίστοιχο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια για το mix των στελεχών, λαμβάνονται τα στελέχη από κάθε duran και μεταφέρονται σε ξεχωριστούς για τον κάθε μικροοργανισμό ουροσυλλέκτες. Στη συνέχεια, με μια ηλεκτρική πιπέτα μεταφέρονται από κάθε duran 17 mL θρεπτικού υλικού με το αντίστοιχο στέλεχος και τα mix των στελεχών, στα απαιτούμενα για το πείραμα τρυβλία. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται με δυο τεχνικές επαναλήψεις, για το κάθε στέλεχος των μικροοργανισμών καθώς και για τα mix των στελεχών. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε πυραμίδα για να κρυσώσουν και να σταθεροποιηθούν.

Αφού περάσει η απαιτούμενη ώρα, στα τρυβλία με τα στελέχη και τα mix τους, πραγματοποιείται η διάνοιξη των οπών υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια του λύχνου Bunsen και των pasteur, ανάλογα με τον απαιτούμενο αριθμό των δειγμάτων διαφορετικών

κατηγοριών του όξινου ορού γιαούρτης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ενσωμάτωση σε κάθε οπή 20  $\mu\text{L}$  των δειγμάτων του όξινου ορού γιαούρτης από κάθε κατηγορία. Σε κάθε στέλεχος των μικροοργανισμών καθώς και στα mix αυτών έγινε έγχυση σε κάποιες οπές ως αρνητικού μάρτυρα 20  $\mu\text{L}$  από δείγματα controls και ως θετικού 20  $\mu\text{L}$  διάλυμα αντιβιοτικού. Τέλος οδηγούνται στον επωαστικό κλίβανο στις κατάλληλες για κάθε μικροοργανισμό συνθήκες για 48h. Στις 24h γίνεται η πρώτη παρατήρηση και στις 48h γίνεται η δεύτερη παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Με την παρατήρηση ελέγχεται ο σχηματισμός διαύγασης γύρω από την περιοχή των βοθρίων, που σήμαινε την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Μετά το πέρας των 24h καθώς και των 48h δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη διαύγασης, σε κανέναν μικροοργανισμό. Είτε ήταν εμβολιασμένο με ένα στέλεχος είτε με τα mix των στελεχών.

## **2.7 Έλεγχος πιθανής μείωσης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε plate 96 wells**

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας είναι η αξιολόγηση της ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού να αναστέλλει την ανάπτυξη στελεχών παθογόνων βακτηρίων συγκεκριμένα του μείγματος τριών στελεχών *Salmonella enterica subsp. enterica* που ανήκουν στους οροτύπους *Typhimurium* και *Enteritidis*, μείγμα τριών στελεχών του *Escherichia coli O157:H7* και μείγμα τεσσάρων στελεχών του *Lactobacillus plantarum*. Τα δείγματα όξινου ορού που εξετάστηκαν για την επίδραση στην ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων ήταν τα λυοφιλοποιημένα δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού, και τα λυοφιλοποιημένα δείγματα μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, από τα οποία συγκεκριμένη ποσότητα προστέθηκε σε πιάτα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων με θρεπτικό υλικό, στα οποία έχει ενσωματωθεί το mix των στελεχών από κάθε μικροοργανισμό. Επιπλέον, ως εμβόλια χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν mix στελεχών από κάθε μικροοργανισμό με προσθήκη απεσταγμένου νερού αντί για όξινο ορό, και ως μάρτυρες δείγματα που περιείχαν τα mix στελεχών με προσθήκη blanks μετά την *in vitro* πέψη. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστές πλάκες μικροτιτλοδότησης για τον κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά, καθώς και κάθε κατηγορία δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού που εξετάστηκαν. Η επίδραση του όξινου ορού στην ανάπτυξη των βακτηρίων εκτιμήθηκε με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε ειδικό όργανο μέτρησης.

#### Απαιτούμενα υλικά:

- BHI Agar (OXOID, CM1136)
- BHI Broth (NEOGEN Culture Media, NCM0016A)
- MRS Agar (Condalab, 1043.00)
- MRS Broth (NEOGEN Culture Media, NCM0079A)
- Ringer tablets (1/4 strength) (NEOGEN Culture Media, NCM0191K)
- Απεσταγμένο νερό

#### Απαιτούμενα αναλώσιμα:

- Πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Πολυκάναλη πιπέτα μεταβλητού όγκου
- Tips
- Ηλεκτρικός αναρροφητήρας πιπετών
- Γυάλινες πιπέτες των 10 και 25 mL
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Κουτάλι για το ζύγισμα
- Αποστειρωμένα στρογγυλά τρυβλία Petri
- Αποστειρωμένοι κρίκοι εμβολιασμού μιας χρήσης
- Αποστειρωμένα πιάτα 96 φρεατίων
- Συγκολλητική ταινία σφράγισης πιάτων 96 φρεατίων
- Duran
- Πάγος

#### Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Κλίβανος αποστείρωσης θρεπτικών υλικών και αναλώσιμων
- Laminar Air Flow
- Vortex
- Λύχνος Bunsen
- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνήτης
- Επωαστικοί θάλαμοι με ιδανικές συνθήκες για κάθε μικροοργανισμό
- Όργανο μέτρησης οπτικής πυκνότητας (Tecan Sunrise<sup>TM</sup> Absorbance Reader, Tecan GroupLtd, Männedorf, Ελβετία)

## **Αναλυτική πορεία**

Για την επανάκτηση όλων των στελεχών των μικροοργανισμών καθώς και για την Α' και Β' ανανέωσή τους, όπως και ο καθαρισμός τους με ¼ ringer solution, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρεται στις προηγούμενες παραγράφους. Για την εκπόνηση του πειράματος πραγματοποιήθηκαν διάφορα test με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στα mix των στελεχών με πληθυσμό  $10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4$  και  $10^3$ . Η αραιώση που τελικά χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν  $10^5$ .

Με την ολοκλήρωση της Β' ανανέωσης των στελεχών από κάθε μικροοργανισμό και των καθαρισμό τους με αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer solution, τα στελέχη επαναιωρήθηκαν με 10 mL καθαρό Broth. Για το mix των στελεχών, σε έναν ξεχωριστό αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη για κάθε μικροοργανισμό μεταφέρονται τα στελέχη με πληθυσμό  $10^9$ , στα οποία γίνεται καλή ανάδευση και στη συνέχεια δεκαδική αραιώση μέχρι τον πληθυσμό των  $10^7$ . Στη συνέχεια σε έναν αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη για κάθε μικροοργανισμό, μεταφέρονται 13 mL θρεπτικού υλικού BHI ή MRS Broth ανάλογα τον μικροοργανισμό και 2 mL από το mix των στελεχών με πληθυσμό  $10^7$  και γίνεται καλή ανάδευση.

Στην πλάκα μικροτιλοδότησης μεταφέρθηκαν ανάλογα με τον μικροοργανισμό, 150μL θρεπτικού μέσου με τα mix των στελεχών και 50μL δείγματος όξινου ορού γιαουρτιού, εμβολίων και δείγματα από τους μάρτυρες ανάλογα με την κατηγορία που εξετάστηκε, ανά δύο βοθρία για κάθε δείγμα. Για τον έλεγχο της μόλυνσης του υλικού χρησιμοποιήθηκαν 150μL μη εμβολιασμένου θρεπτικού υλικού (BHI ή MRS Broth) και 50 μL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Τέλος, το πιάτο υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια του λύχνου Bunsen σφραγίζεται με ειδική μεμβράνη και οδηγείται στο ειδικό μηχάνημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας.

Η οπτική πυκνότητα καταγράφηκε σε όλους τους μικροοργανισμούς στα 600nm. Ο χρόνος επώασης μικροοργανισμών ήταν 16h, οι μετρήσεις έγιναν κάθε 15min, πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν μια μέτρια ανακίνηση πλάκας για 5 sec. Η θερμοκρασία επώασης για τους παθογόνους μικροοργανισμούς ήταν  $37^{\circ}\text{C}$  ενώ για τον γαλακτοβάκιλλο  $30^{\circ}\text{C}$ .

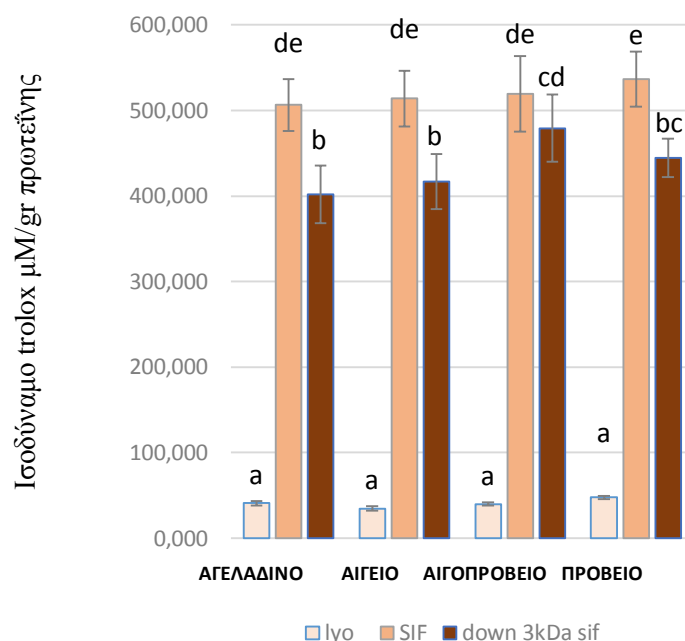
## **2.8 Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία όλων των αποτελεσμάτων διεξήχθη με τη χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics 2022 μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, one way ANOVA και για την κατάταξη των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του Duncan. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των μέσων τιμών ορίστηκε στο  $P < 0,05$ , ενώ η παρουσίαση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα αντικατοπτρίζοντας τον μέσο όρο και το τυπικό σφάλμα, έγινε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8.0.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα

#### 3.1 Αποτελέσματα ORAC



**Διάγραμμα 3.1:** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ORAC του όξινου ορού γιαουρτιού σε αρχικά λυοφιλοποιημένα δείγματα (lyo), μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SIF) και σε δείγματα με μοριακό βάρος κάτω των 3kDa μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (down 3kDa SIF). Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

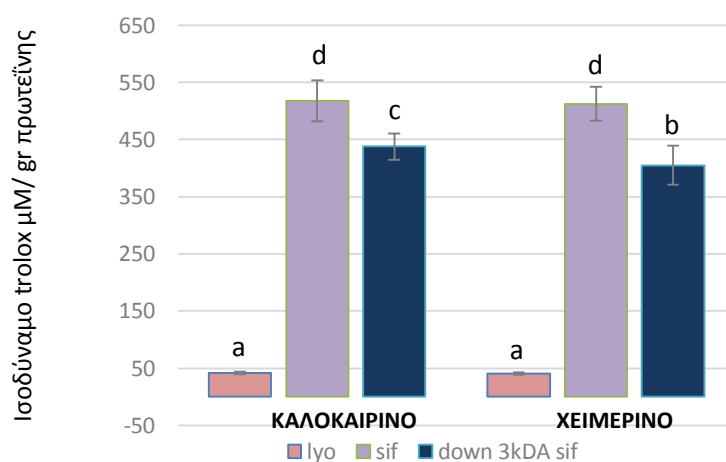
Στο διάγραμμα 3.1 παρατηρείται πως μεταξύ των ειδών τόσο στα λυοφιλοποιημένα δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού όσο και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης δεν παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των ειδών στο κλάσμα πεπτιδίων <3kDa παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των αιγοπρόβειων δειγμάτων σε σύγκριση με αυτά των δειγμάτων αίγειας και αγελαδινής προέλευσης.

Στον όξινο ορό γιαουρτιού που προέρχεται από αγελαδινό γάλα παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά (12X) μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, σε σχέση με τον αρχικό λυοφιλοποιημένο όξινο ορό γιαουρτιού. Επιπλέον, το 79,39% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος πέψης αντιστοιχεί στο κλάσμα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa.

Στον όξινο ορό γιαουρτιού που προέρχεται από αίγαιο γάλα παρατηρείτε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά (15X) μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, σε σχέση με τον αρχικό λυοφιλοποιημένο όξινο ορό γιαουρτιού. Επιπλέον, το 81,14% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος πέψης αντιστοιχεί στο κλάσμα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa.

Στον όξινο ορό γιαουρτιού που προέρχεται από αιγοπρόβειο γάλα παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά (13X) μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, σε σχέση με τον αρχικό λυοφιλοποιημένο όξινο ορό γιαουρτιού. Επίσης, το 92,29% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος πέψης να αντιστοιχεί στο κλάσμα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa.

Τέλος, στον όξινο ορό γιαουρτιού που προέρχεται από πρόβειο γάλα παρατηρείτε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά (11X) μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, σε σχέση με τον αρχικό λυοφιλοποιημένο όξινο ορό γιαουρτιού. Επιπλέον το 82,88% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος πέψης να αντιστοιχεί στο κλάσμα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa.



**Διάγραμμα 3.2:** Αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού ανά εποχή με την μέθοδο ORAC, σε λυοφιλοποιημένα δείγματα πριν την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (lyo), μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (sif) και σε δείγματα μετά την *in vitro* πέψη με μοριακό βάρος πεπτιδίων κάτω των 3kDa (down 3kDa sif) ανά εποχή. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

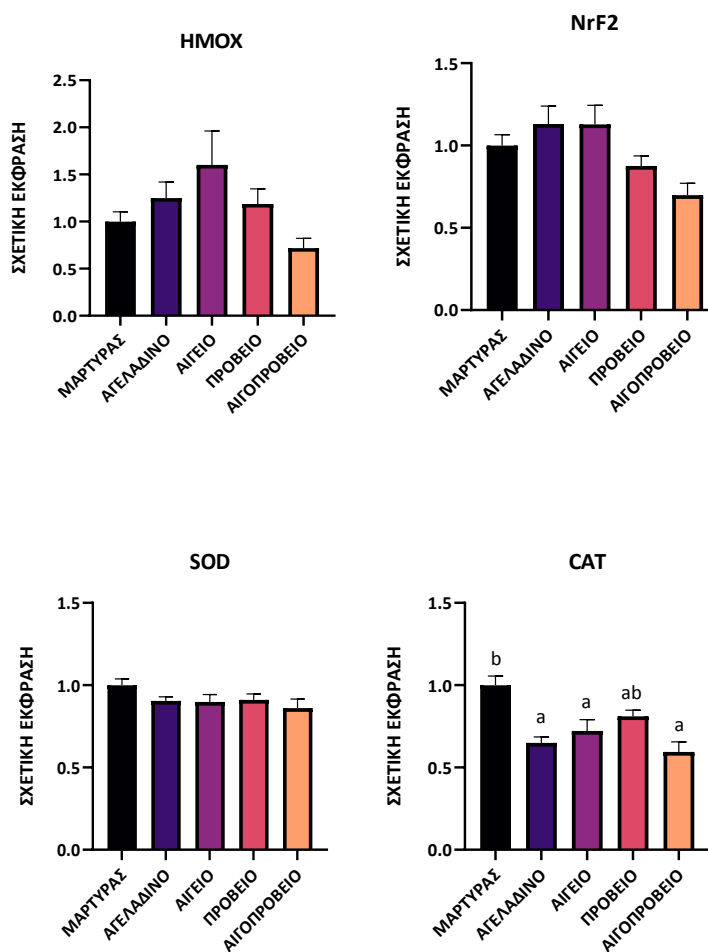
Σχετικά την εποχή του χρόνου από τα οποία προήλθαν τα ζωικά δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού στο διάγραμμα 3.2 παρατηρείται ότι τα καλοκαιρινά με τα χειμερινά δείγματα όσον αφορά τα λυοφιλοποιημένα δείγματα και τα προϊόντα της *in vitro* προσομοίωσης της γαστρεντερικής πέψης δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των εποχών. Αντιθέτως, για τα κλάσματα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa παρουσιάζεται



στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των εποχών, με το καλοκαιρινό να έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το χειμερινό.

### 3.2 Αποτελέσματα Real Time PCR της THP-1 κυτταρικής σειράς

Όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων HMOX, NRF2, SOD και CAT στην αντιοξειδωτική δράση του όξινου ορού γιαουρτιού προερχόμενο από αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο και αιγοπρόβειο γάλα, καθώς και του μάρτυρα (blank) στην έκθεσή τους σε κύτταρα THP-1 ενεργοποιημένα με LPS παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

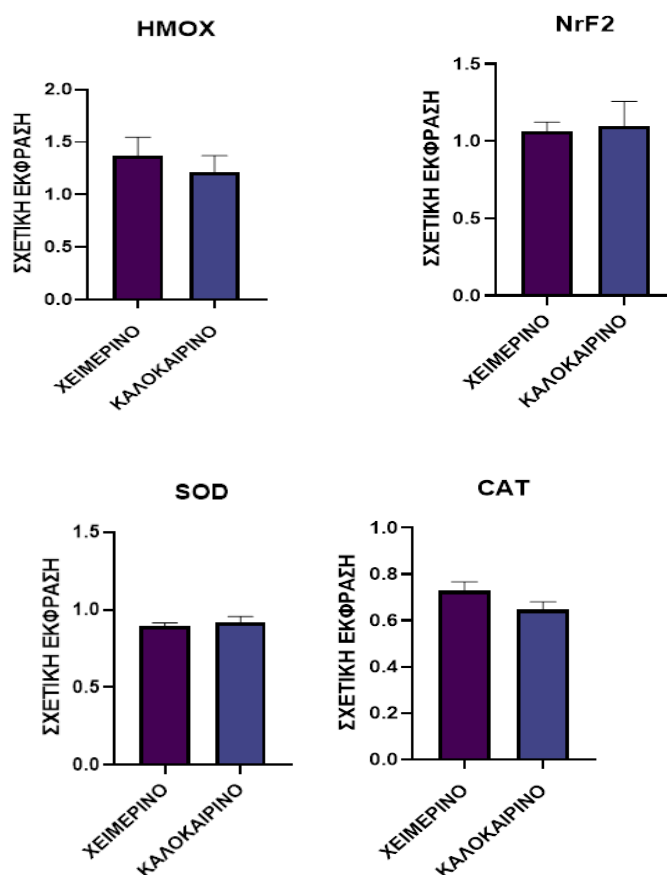


**Διάγραμμα 3.3:** Επίδραση της ζωικής προέλευσης του όξινου ορού γιαουρτιού μετά την έκθεσή τους σε THP-1 μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με LPS, στην σχετική έκφραση των γονιδίων HMOX, NRF2, SOD και CAT. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα κύτταρα παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου CAT στον μάρτυρα έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά με την έκφραση του γονιδίου στον όξινο ορό γιαουρτιού προερχόμενο από αγελαδινό, αίγαιο και αιγοπρόβειο γάλα, το γονίδιο στα είδη αυτά έχει χαμηλότερη σχετική έκφραση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου CAT δεν έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα

και του όξινου ορού γιαουρτιού από πρόβειο γάλα. Όπως και τα δείγματα όξινου ορού μεταξύ τους δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου.

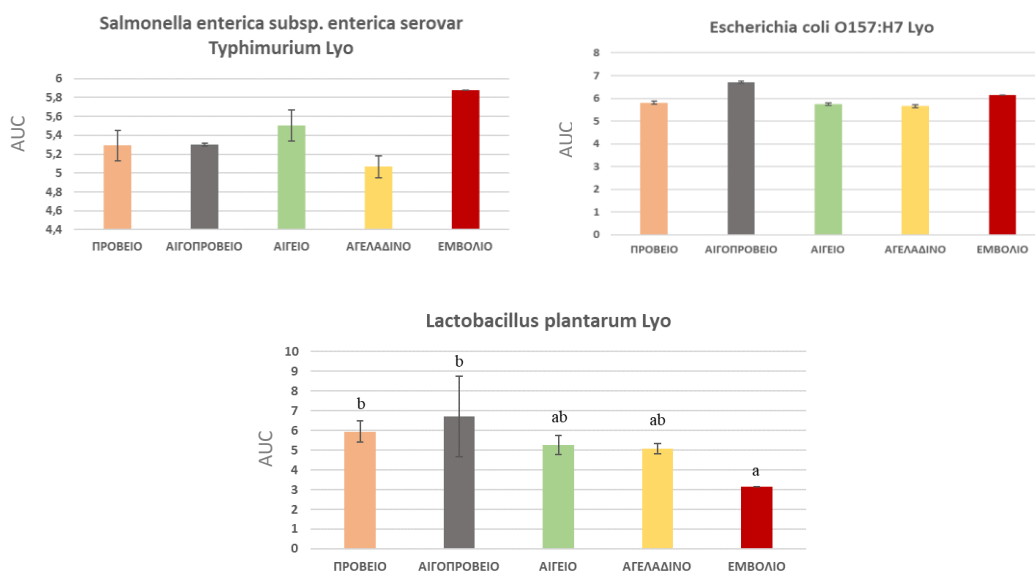
Σε αντίθεση με τα γονίδια HMOX, NRF2 και SOD δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των ειδών του γάλακτος από τα οποία προέρχονται τα δείγματα όξινων ορών γιαουρτιού. Όπως επίσης, σε κάθε γονίδιο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά και μεταξύ των ειδών.



**Διάγραμμα 3.4:** Επίδραση της εποχικότητας του όξινου ορού γιαουρτιού μετά την έκθεση των δειγμάτων σε THP-1 μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με LPS, στην σχετική στην σχετική έκφραση των γονιδίων HMOX1, NRF2, SOD και CAT.

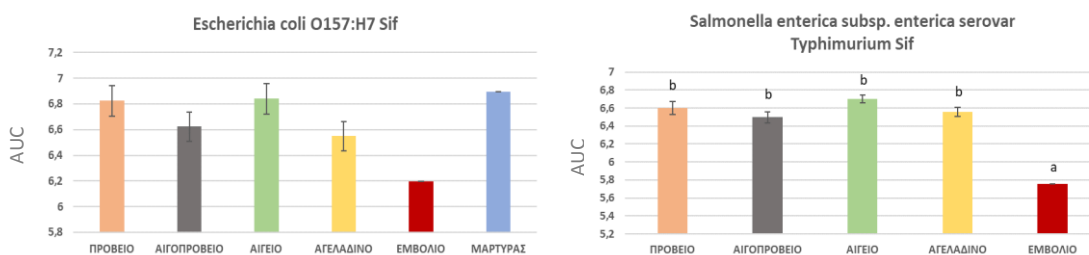
Σχετικά με την εποχή του χρόνου από τα οποία προήλθαν τα δείγματα του όξινου ορού γιαουρτιού στο διάγραμμα 3.4 παρατηρείται ότι σε όλα τα γονίδια δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την σχετική έκφραση των γονιδίων ανάλογα με την εποχή (χειμώνας- καλοκαίρι).

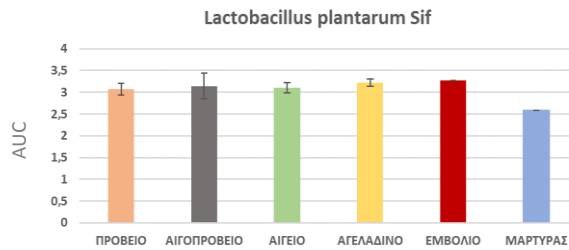
### 3.3 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής ικανότητας



**Διάγραμμα 3.5:** Αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών παρουσία λυοφιλοποιημένου όξινου ορού γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης μετά από 10 ώρες. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στο διάγραμμα 3.5 παρατηρείται στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Salmonella* πως δεν παρουσιάζονται στατικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του εμβολίου και των δειγμάτων όξινου ορού διαφορετικής ζωικής προέλευσης, όσο και μεταξύ των δειγμάτων όξινου ορού. Στον *Lactobacillus plantarum* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα δείγματα του όξινου γιαουρτιού από πρόβειο και αιγοπρόβειο γάλα σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ τα δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού από αίγειο και αγελαδινό γάλα δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο σε σχέση με το εμβόλιο όσο και με τα υπόλοιπα ζωικά είδη.





**Διάγραμμα 3.6:** Αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών παρουσία λυοφιλοποιημένου όξινου ορού γιαουρτιού μετά την προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης διαφορετικής ζωικής προέλευσης, μετά από 10 ώρες. Διαφορετικοί εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στο διάγραμμα 3.6 φαίνεται πως στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Lactobacillus plantarum* δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού από διάφορες ζωικές προελεύσεις. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές και μεταξύ των δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης σε αυτούς τους μικροοργανισμούς. Σε αντίθεση με τον *Salmonella*, όπου παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του εμβολίου και όλων των δειγμάτων όξινου ορού διαφορετικής ζωικής προέλευσης παρουσιάζοντας τα δείγματα υψηλότερη οπτική πυκνότητα, ενώ μεταξύ των δειγμάτων όξινου ορού δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά.

## Κεφάλαιο 4°

### Συζήτηση

Θα πρέπει να επισημανθεί πως η συζήτηση της παρούσας μελέτης στη πλειοψηφία της δεν αφορά ευρήματα σχετικά με τον όξινο ορό γιαουρτιού μόνο αλλά και από άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο όξινος ορός από φυσικοχημική σύσταση διαφέρει με τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. πρωτεΐνες ορού και υδρολύματά τους, τυριά, βουτυρόγαλα, κλπ.), ωστόσο ο σκοπός της μελέτης ήταν να μελετηθεί το κλάσμα των πρωτεϊνών του όξινου ορού γιαουρτιού που έχει προέλευση από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Λόγω των ελάχιστων ερευνών που διεξήχθησαν γύρω από τον όξινο ορό γιαουρτιού κρίθηκε σκόπιμο η συζήτηση να επεκταθεί και σε ευρήματα άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, στα οποία κυριαρχούν οι πρωτεΐνες του γάλακτος.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του γάλακτος εξαρτώνται έμμεσα από την β-γαλακτογλοβουλίνη, η οποία έχει προστατευτική δράση στη ρετινόλη και α-τοκοφερόλη. Με τη σύνδεση με τη β-γαλακτογλοβουλίνη οι βιταμίνες υφίστανται ελάχιστη οξείδωση κατά τη μεταφορά από το στομάχι στο λεπτό έντερο (Liang, Tremblay-Hébert, and Subirade 2011). Όλα τα πεπτίδια που σχηματίζονται από τη β-γαλακτογλοβουλίνη είναι “σαρωτές” ελεύθερων ριζών. Η ικανότητα απορρόφησης των παραγόμενων ριζών αποδίδεται στην παρουσία και τη θέση της τρυπτοφάνης, της τυροσίνης και της μεθειονίνης. Η ισοδύναμη συγκέντρωση ενός μίγματος των παραπάνω αμινοξέων χαρακτηρίζεται από χαμηλότερες τιμές ORAC, γεγονός που μαρτυρεί την σημασία της δευτεροταγούς δομής των αντιοξειδωτικών πεπτιδίων (Hernández-Ledesma et al. 2007). Ένα πεπτίδιο (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile) που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών σε σχέση με τη βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη και είναι ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και απομονώθηκε από τη β-γαλακτογλοβουλίνη. Η ενζυμική υδρόλυση άλλων πρωτεϊνών ορού γάλακτος οδηγεί επίσης στο σχηματισμό πεπτιδίων με υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης. Τα πεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους (>45 kDa) απενεργοποιούν αποτελεσματικότερα τα υπεροξειδία. Τα πεπτίδια Met-His-Ile-Arg-Leu και Tyr-Val-Glu-Glu-Leu είναι επίσης ισχυρά αντιοξειδωτικά λόγω της παρουσίας τυροσίνης και μεθειονίνης στη δομή τους (Hernández-Ledesma et al. 2005).

Σε μια έρευνα των Tavares et al. (2011), σε συμπυκνωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος βοοειδών η οποία είχε υδρολυθεί με υδατικά εκχυλίσματα αγριαγκινάρας έγινε η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο ORAC και αυτά που παρουσίασαν την

υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση είναι ο συμπυκνωμένος ορός από αγελαδινό γάλα και η α-γαλακταλβουμίνη σε σύγκριση με το καζεΐνομακροπεπίδιο. Οι Power-Grant et al. (2015), πραγματοποίησαν μια προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης συμπυκνωμένων πρωτεϊνών ορού γάλακτος και στη συνέχεια μέτρησαν την αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο ORAC. Η γαστρεντερική πέψη των συμπυκνωμένων πρωτεϊνών ορού γάλακτος αύξησε τις τιμές ORAC κατά 2,5 φορές σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα. Ωστόσο, όταν οι συμπυκνωμένες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος ήταν σε υδρολυμένη μορφή, η γαστρεντερική πέψη οδήγησε σε μείωση κατά 22% στις τιμές ORAC, κάτι που δείχνει ότι η βιοδραστικότητα των δειγμάτων υδρολυμένου ορού γάλακτος μειώθηκε κατά τη διέλευση του εντέρου. Η έρευνα αυτή έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα των Corrochano et al. (2018), οι οποίοι, παρατήρησαν με την μέθοδο ORAC, ότι οι απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος με ενζυμική υδρόλυση πριν την γαστρεντερική πέψη είχαν πολύ χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με αυτές μετά την πέψη. Όπως επίσης για την α-γαλακταλβουμίνη, β-γαλακτογλοβουλίνη, αλβουμίνη βόειου ορού και η λακτοφερίνη να έχουν πολύ υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μετά την πέψη τους σε σύγκριση με πριν, με την α-γαλακταλβουμίνη και την β-γαλακτογλοβουλίνη να εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση απ' όλες.

Σε μια έρευνα των Bučević- Popović et al. (2014), για την οξειδωτική σταθερότητα και αντιοξειδωτική δράση του αγελαδινού, πρόβειου, αίγειου και γαϊδουρινού γάλακτος, ακολουθώντας την μέθοδο ORAC για τον έλεγχο του ορού γάλακτος από κάθε ζωικό είδος πριν και μετά την *in vitro* πέψη, η δραστηριότητα του άπεπτου ορού γάλακτος και από τα τρία είδη ήταν χαμηλή, ενώ αυξήθηκε μετά από τη προσομοίωση της εντερικής πέψης. Επιπλέον, η υδρόλυση της β-γαλακτογλοβουλίνης και της α-γαλακταλβουμίνης έχει αναφερθεί ότι παράγει πεπτίδια με αντιοξειδωτική δράση που ανιχνεύονται με τη μέθοδο ORAC (Hernandez-Ledesma et al., 2007). Οι Conway, Gauthier, and Pouliot (2013), με τη μέθοδο ORAC παρατήρησαν ότι τα προϊόντα υδρόλυσης από πρωτεΐνη βουτυρογάλακτος, ήταν πιο αποτελεσματικά στη σάρωση των ελεύθερων ριζών από εκείνα των συμπυκνωμένων πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Αν και το βουτυρόγαλα είναι απίθανο να περιέχει μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών του ορού γάλακτος η ανάλυση αποκάλυψε 4 πεπτίδια β-γαλακτογλοβουλίνης που προτάθηκαν να συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση. Τα παραπάνω ευρήματα αν και αφορούν έρευνες πάνω στον ορό του γάλακτος και στο βουτυρόγαλα συμφωνούν με τα δικά μας αποτελέσματα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού, όπου έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης είναι γενικά υψηλότερη γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία της πέψης απελευθερώνει

βιοενεργά πεπτίδια με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ανεξάρτητα από το ζωικό είδος προέλευσης του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του όξινου ορού γιαουρτιού στην αρχική τους μορφή δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητα, όμως μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης φαίνεται πως αποδομούνται σε ακόμη περισσότερα θραύσματα με μικρότερο μοριακό βάρος του αρχικού, τα οποία εκδηλώνουν την βιολειτουργική τους ικανότητα ως προς την αντιοξειδωτική δράση.

Τα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών εμφανίζουν διαφορετικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες ανάλογα με το μέγεθος του πεπτιδίου, την αλληλουχία αμινοξέων και την παρουσία αμινοξέων που είναι ικανά να εμπλέκονται σε οξειδωτικές αντιδράσεις (Xiong 2010). Φαίνεται πως αποτελέσματα ORAC, δείχνουν ότι τα πεπτίδια με μικρότερο μοριακό βάρος παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα κλάσματα που περιείχαν μεγαλύτερα πεπτίδια (Corrochano et al. 2018). Τα πρωτεολυτικά συστήματα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος είναι ο κύριος τρόπος για τη δημιουργία βιοενεργών πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής δράσης δέσμευσης των ελευθέρων ριζών κατά τη ζύμωση του γάλακτος (Gobbetti, Minervini, and Rizzello 2004). Μέσω της ανάλυσης φασματομετρίας μάζας αποκαλύφθηκαν πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση, τα οποία προέρχονται από την β-γαλακτογλοβουλίνη και α-γαλακταλβουμίνη μετά από ενζυμική υδρόλυση προϊόντων που προέρχονται από ορό. Πολλά από τα πεπτίδια της β-Lg εμφανίστηκαν μέσα σε 3 σημεία, 42-61, 77-110 και 123-135 αμινοξέα, ενώ στην α-La ταυτοποιήθηκαν πεπτίδια από τη θέση 15 έως 23 αμινοξέων (Alberto R Corrochano et al., 2018). Αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων με τη μέθοδο DPPH από τους Qian et al. (2011), ενός αποβουτυρωμένου γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση με *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LB340, αποκάλυψε πως μεταξύ τεσσάρων διαφορετικών πεπτιδικών κλασμάτων (10-5, 5-3, 3-1 και < 1 kDa), αυτά στη περιοχή 5-3 kDa εμφάνισαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (66%), η οποία δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από αυτήν του πεπτιδικού κλάσματος 3- 1 kDa (64%). Η αντιοξειδωτική δράση επομένως συσχετίστηκε με το μοριακό βάρος από 0 έως 5 kDa. Όπως επίσης και οι Peng, Xiong, and Kong (2009) με την ίδια μέθοδο έδειξαν ότι το κλάσμα 0,1- 2,8 kDa από την απομόνωση πρωτεϊνών ορού γάλακτος είχε την ισχυρότερη ικανότητα σάρωση ελεύθερων ριζών. Τα κλάσματα ορού γάλακτος με μοριακό βάρος κάτω των 5 kDa ασκούν σταθερά καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες από τα κλάσματα υψηλότερου μοριακού βάρους (de Castro and Sato 2014; Liu, Wang, and Zhao 2014; O'Keeffe and FitzGerald 2014). Σύμφωνα με την έρευνα του Moreno Montoro (2016), σε αποβουτυρωμένο και συμπυκνωμένο αίγαιο γάλα, το οποίο στη συνέχεια ζυμώθηκε με διαφορετικές καλλιέργειες εκκίνησης και ο όξινος ορός

γιαουρτιού διαπέρασε σε μεμβράνη αποκοπής >3kDa και <3kDa, τα αποτελέσματα ORAC έδειξαν ότι την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση είχε ο όξινος ορός που προερχόταν από το γιαούρτι που ζυμώθηκε με τα κλασικά βακτήρια εκκίνησης καθώς και τα κλάσματα πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa έδειξαν την υψηλότερη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα ως προς την αντιοξειδωτική δράση του όξινου ορού γιαουρτιού σχετικά με το μοριακό βάρος των πεπτιδίων, έρχονται και οι παραπάνω έρευνες. Αν και αφορούν δοκιμές σε αποβουτυρωμένο γάλα και απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος, φαίνεται πως και στον όξινο ορό γιαουρτιού το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης οφείλεται στα βιοενεργά πεπτίδια με μοριακό βάρος <3kDa και σε ποσοστό το οποίο ανέρχεται 79,39 έως 92,29%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού με βάση την εποχικότητα, η έρευνα των Revilla et al. (2016), σε 224 δείγματα τυριού γνωστής σύνθεσης που παρασκευάστηκαν από αγελαδινό αίγιο και πρόβιο γάλα, ωρίμανσης άνω των 6 μηνών, κατά τη διάρκεια δύο εποχών παρατήρησαν ότι η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα συσχετίστηκε σημαντικά με την εποχικότητα της παρασκευής και τον χρόνο ωρίμανσης και όχι με το ζωικό είδος που παρείχε το γάλα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν υψηλότερη το καλοκαίρι απ' ότι το χειμώνα. Αυτή η διαφορά προέκυψε από τις χαμηλότερες αναλογίες υδρόφοβων: υδρόφιλων πεπτιδίων το καλοκαίρι σε σχέση με τα χειμερινά τυριά ειδικά μετά τον πρώτο μήνα ωρίμανσης, υποδηλώνοντας ισχυρή πρωτεόλυση. Δεύτερον παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ρετινόλη, ποσοστό λίπους και πρωτεΐνης, περιεκτικότητας σε K, Mg, P, Na. Οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ των μετάλλων και τις συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, πιθανότατα οφείλονται στη σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (επειδή η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται κυρίως με τις καζεΐνες) και αυτό των μετάλλων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού σχετικά την εποχικότητα του γάλακτος συμφωνούν με την έρευνα των Revilla et al. (2016), αν και αφορά τυρί ωρίμανσης, φαίνεται ότι τα πεπτίδια του όξινου ορού γιαουρτιού με μοριακό βάρος <3kDa παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση τους καλοκαιρινούς μήνες σε σύγκριση με του χειμερινούς.

Το Nrf2 (Nuclear factor 2), πυρηνικός παράγοντας προερχόμενος από ερυθροειδή 2, είναι ένας κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την απόκριση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων, που μπορεί να μειώσει την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από το ROS, να διατηρήσει την κυτταρική σταθερότητα και την δυναμική ισορροπία της οξειδοαναγωγής



προκαλώντας και ρυθμίζοντας την έκφραση μιας σειράς αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (de Freitas Silva et al. 2018; Bellezza et al. 2018; Zhang et al. 2013). Η οδός Keap1 (Kelch Like ECH Associated Protein 1) Nrf2/ ARE (Antioxidant Response Element) θεωρείται ότι είναι η σημαντικότερη ενδογενής οδός αντιοξειδωτικής σηματοδότησης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το Nrf2 συνδέεται κυρίως με τον αναστολέα του Keap1, υπάρχει στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή του κατάσταση και ανοικοδομείται ταχέως υπό τη δράση της οδού πρωτεασώματος ουβικιτίνης για να διατηρήσει τη χαμηλή μεταγραφική δραστηριότητα του Nrf2 υπό φυσιολογικές συνθήκες. Κατά τη δέσμευση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα με στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης στα γονίδια- στόχους του στον πυρήνα, διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα ενεργοποιούνται μεταγραφικά όπως το Hmox-1 (Itoh et al. 1999). Το Hmox-1, ως πρωτεΐνη του στρες, παίζει ρόλο στον μεταβολισμό της αιμοσφαιρίνης, τη φλεγμονή και την αντιοξειδωτική διαδικασία και επίσης έχει προστατευτική επίδραση στο καρδιαγγειακό και το νευρικό σύστημα (de Freitas Silva et al. 2018; Bellezza et al. 2018; Zhang et al. 2013). Είναι κυτταροπροστατευτικό ένζυμο με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Exner et al., 2004). Υπό κανονικές συνθήκες, το HMOX1 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς. Ωστόσο, η δραστηριότητά του προκαλείται σε μεγάλο βαθμό ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες μειώνοντας τη δημιουργία ROS και ελέγχοντας την φλεγμονώδη απόκριση (Wu et al. 2011). Άλλα επίσης αντιοξειδωτικά ένζυμα που ανακουφίζουν από το οξειδωτικό στρες και που είναι υπεύθυνο το γονίδιο NRF2 για την ενεργοποίηση της έκφρασης και της παραγωγής τους, είναι και τα SOD, CAT και GPx, (D. R. Zhao et al. 2019).

Το γονίδιο CAT είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο πρώτης γραμμής που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς ιστούς που αξιοποιούν το οξυγόνο. Είναι εξαιρετικά αποδοτικό και μπορεί να διασπάσει εκατομμύρια μόρια  $H_2O_2$  σε 1sec, το ένζυμο βρίσκεται κυρίως στα υπεροξισώματα αλλά απουσιάζει στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των θηλαστικών με μόνη εξαίρεση τα μιτοχόνδρια που υπάρχουν στην καρδιά του αρουραίου. Το ένζυμο είναι άφθονο στα κύτταρα και αναζητά συνεχώς μόρια  $H_2O_2$ , τα οποία σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις έχει αναφερθεί ότι είναι επιβλαβή για τα κύτταρα, χρησιμοποιεί είτε σίδηρο είτε μαγγάνιο ως συμπαράγοντα και καταλύει την αποδόμηση ή αναγωγή του  $H_2O_2$  σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Ighodaro and Akinloye 2018).

Το SOD είναι το πρώτο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο που δρα ως συστατικό του αμυντικού συστήματος πρώτης γραμμής έναντι των ROS και το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό στο κύτταρο, είναι απαραίτητο για την κυτταρική υγεία προστατεύοντας τα κύτταρα του σώματος από υπερβολικές ρίζες οξυγόνου, ελεύθερες ρίζες και άλλους

επιβλαβείς παράγοντες που προάγουν την γήρανση ή τον κυτταρικό θάνατο. Τα επίπεδα του SOD μειώνονται με την ηλικία ενώ ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών αυξάνεται. Καταλύει τη μετάλλαξη δυο μορίων ανιόντος υπεροξειδίου (\*O<sub>2</sub>) σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>), καθιστώντας κατά συνέπεια το δυνητικά επιβλαβές \*O<sub>2</sub> λιγότερο επικίνδυνο. Το SOD είναι ένα μεταλλοένζυμο και απαιτεί έναν μεταλλικό συμπάραγοντα για την δραστηριότητά του. Με βάση τον τύπο του μεταλλικού ιόντος που απαιτείται ως συμπάραγοντας από το SOD, υπάρχουν διάφορες μορφές του ενζύμου. Μια από τις μορφές είναι το Cu/Zn- SOD, κυρίαρχο στους ευκαρυώτες και περισσότερο εντοπισμένο σε χλωροπλάστες και υπεροξεισώματα. Η ανεπάρκεια του SOD συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις στα ζώα και στον άνθρωπο (Ighodaro and Akinloye 2018).

Σε μια έρευνα των D. Zhao et al. (2019) για την αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης της βανιλίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε κύτταρα THP-1 διεγερμένα με 1 μg/mL LPS για 23h παρατηρήθηκε ότι προήγαγε την γονιδιακή έκφραση των NRF2 και HMOX1. Επιπλέον, η μελέτη των D. R. Zhao et al. (2019), για την βελτίωση της φλεγμονής από την αρωματική ένωση 4- μεθυλγουαϊακόλης, συστατικού που περιέχεται σε κινέζικο λικέρ, σε THP-1 κύτταρα διεγερμένα με 1 μg/ml LPS για 24h και θεραπεία σε διάφορες συγκεντρώσεις για 24h, φάνηκε πως η θεραπεία με 4- μεθυλγουαϊακόλης αύξησε σημαντικά την έκφραση των γονιδίων NRF2 και HMOX1. Ενώ αντίθετα στην έρευνα των Kaulmann et al. (2016), σε αποκρίσεις που σχετίζονται με τη φλεγμονή των εντερικών κυττάρων σε δοκιμές που έγιναν σε τριπλή καλλιέργεια κυττάρων συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σειράς THP-1, διεγερμένα με 10 μg/ml LPS για 6h και έκθεσή τους σε με διάφορες ποικιλίες δαμάσκηνο και λάχανου, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης σε αναλογία 1:8 (πέψη: medium) για 18h, έδειξαν μειωμένη έκφραση του γονιδίου NRF2. Η έρευνα των Conte et al. (2022) για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιαλλεργική δράση της βραζιλιάνικης πρόπολης που έγινε θεραπεία με 50 μg/ml σε THP-1 κύτταρα για 24h διεγερμένα με 1μg/ml LPS, έδειξε πως η πρόπολη προκάλεσε σημαντικά υψηλότερη έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου HMOX1. Σε μία μελέτη των Speranza et al. (2010) για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του φλόμου, ενός αυτοφυούς βοτάνου, ύστερα από τη θεραπεία σε κύτταρα THP-1 ενεργοποιημένα με 10 μg/ml LPS για 24h παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων CAT και SOD. Σε αντίθεση με την έρευνα των Gasparrini et al. (2018) για τις προστατευτικές επιδράσεις του μελιού Manuka σε κύτταρα RAW 264.7 ενεργοποιημένα με 1μg/ml LPS και θεραπεία με 3 και 8 mg/ml μελιού Manuka για 24h τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπεία αύξησε τη δραστηριότητα των ενζύμων SOD και CAT.

Όσον αφορά τις προαναφερθείσες έρευνες ως προς την έκφραση των γονιδίων NRF2 και HMOX1 σε διεγερμένα με LPS THP-1 κύτταρα και θεραπεία με συστατικά είτε τροφές που δεν σχετίζονται με τον όξινο ορό γιαουρτιού φαίνεται πως τα αποτελέσματα μας ως προς αυτά τα γονίδια δε συμφωνούν με τα αποτελέσματα των ερευνών των Zhao et al., (2019), Conte et al., (2022) και Kalulamann et al., (2016). Στα δικά μας αποτελέσματα δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ή μείωση στην έκφραση των γονιδίων NRF2 και HMOX1 ως προς τον μάρτυρα. Ενώ για τα γονίδια SOD και CAT σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε διεγερμένα με LPS THP-1 και RAW 264.7 κύτταρα και θεραπεία αυτών με βότανο και μέλι αντίστοιχα, επίσης μη σχετικά με τον όξινο όρο γιαουρτιού, η έρευνα των Gasparini et al., (2018) έρχεται σε αντίθεση με το δικό μας αποτελέσματα ως προς την σχετική έκφραση του γονιδίου CAT, ενώ δεν συμφωνεί ως προς την έκφραση του γονιδίου SOD. Ως προς την έκφραση του γονιδίου SOD επίσης δε βρέθηκε συσχέτιση με την έρευνα των Speranza et al., (2010), ενώ η ίδια έρευνα έρχεται σε συμφωνία με το δικό μας αποτέλεσμα ως προς την έκφραση του γονιδίου CAT. Στα δικά μας αποτελέσματα σε THP-1 μακροφάγα κύτταρα διεγερμένα με 100ng/mL LPS και θεραπεία με όξινο ορό γιαουρτιού, φαίνεται πως σε σχέση με τον μάρτυρα υπήρχε στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου CAT, όπου ερμηνεύεται πως το οξειδωτικό στρες μειώθηκε στα κύτταρα παρουσία όξινου ορού γιαουρτιού με σαφέστερη μείωση του του οξειδωτικού στρες παρουσία όξινου ορού γιαουρτιού από στο αγελαδινό, αίγιο και αιγοπρόβειο γάλα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην ενεργοποιήσουν την έκφραση του γονιδίου CAT που είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο.

Σχετικά με τα αποτελέσματα της εποχής ως παράγοντα στην έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπου δεν είχαν επίδραση δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές για τον σχολιασμό τους είτε σε δείγμα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων είτε σε άλλα δείγματα μη σχετικά με αυτά.

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που παράγονται από πρωτεΐνες τροφίμων, παρουσιάζουν ένα μεγάλο πλεονέκτημα, ότι παράγονται από αβλαβείς και φθηνές πηγές. Ως εκ τούτου υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χρήση αυτών των πεπτιδίων σε διατροφικά προϊόντα ως βιολογικά συντηρητικά ή ως συμπληρώματα διατροφής που προάγουν την υγεία στη βιομηχανία τροφίμων (Aspri et al. 2018). Πολλοί ερευνητές έχουν δώσει προσοχή στα αντιμικροβιακά πεπτίδια που απομονώνονται από το γάλα, τα οποία θεωρούνται μη τοξικά για τα κύτταρα των θηλαστικών επειδή προέρχονται από μια αβλαβή πηγή. Παρομοίως έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν ένα ευρύ φάσμα στοχευμένων μικροοργανισμών με σημασία για την υγεία και την διατηρησιμότητα των προϊόντων, καθώς είναι μερικές φορές ακόμη πιο

αποτελεσματικά από τα τρέχοντα συνθετικά αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου, έχει θεωρηθεί ότι τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που προέρχονται από γάλα διαθέτουν αναμφισβήτητη δυνατότητα χρήσης σε ζωοτροφές και ιατρικές βιομηχανίες Aguilar-Toalá et al. (2017).

Σε μια μελέτη των Jaiswal and Garode (2018), για την αντιμικροβιακή ικανότητα τεσσάρων τύπων δειγμάτων όξινου και γλυκού ορού γαλακτοκομικών προϊόντων έναντι των ανθρώπινων παθογόνων βακτηρίων *E. coli* και *Salmonella Typhimurium* με την μέθοδο της έγχυσης σε οπές και εκτίμηση της ζώνη αναστολής παρατηρήθηκε ότι είχαν αντιμικροβιακή δράση. Σε μια έρευνα των Said et al. (2019), για την αντιμικροβιακή ικανότητα του κεφίρ από αίγαιο γάλα σε παθογόνους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Salmonella enteric subsp. Enterica typhimurium* με την μέθοδο έγχυσης σε οπές και ζυμωμένου γάλακτος κεφίρ, ορό από κεφίρ κόκκων κεφίρ έδειξαν ότι έχουν αντιμικροβιακή ικανότητα. Σε μια μελέτη των Aspri et al. (2018), για τις βιοδραστικές ιδιότητες του γάλακτος γαϊδούρας που έχει υποστεί ζύμωση, πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και σε δοκιμασία για την αντιμικροβιακή δράση δειγμάτων ζυμωμένου γάλακτος πριν την *in vitro* πέψη με την μέθοδο έγχυσης σε οπές δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *E. Coli* και *Salmonella Typhimurium*. Η μελέτη των Abadía-García et al. (2013), με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης προσθήκης προβιοτικών μικροοργανισμών σε παρασκευασμένο cottage τυρί στην επιβίωση των προβιοτικών μετά από αποθήκευση και μετά από αποθήκευση και *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και στην επίδραση τους έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *Lactobacillus casei* ATCC 373, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 και το μίγμα προβιοτικών YO-MIX<sup>TM</sup> 205 που περιείχε *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifodobacterium spp.* και *Streptococcus thermophilus*. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης τα τυριά που περιείχαν τα στελέχη *Lb. casei* και YO-MIX<sup>TM</sup> 205 αυξήθηκαν σε  $8 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$  μετά από αποθήκευση 15 ημερών, ενώ ο *Lb. rhamnosus* παρέμεινε σε επίπεδα  $6 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$  καθ' όλη τη περίοδο αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα προβιοτικά βακτήρια έμειναν βιώσιμα μετά την αποθήκευση των 28 ημερών. Για τα στελέχη του *L. monocytogenes* που προστέθηκαν στο τυρί cottage, κατά τη πρώτη βδομάδα αποθήκευσης του δεν άλλαξε κάτι στους μάρτυρες ούτε στα δείγματα με πρόσθετα προβιοτικά, μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης οι βιώσιμες ποσότητες του *L. monocytogenes* αυξήθηκε σημαντικά στα τυριά μάρτυρες σε σύγκριση με τα τυριά με πρόσθετα προβιοτικά, παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίοδο αποθήκευσης των 28 ημερών. Αυτή η συμπεριφορά εξηγήθηκε από τους ερευνητές πως μπορεί να οφείλεται στη μείωση του pH που προκαλείται

από τον μεταβολισμό των προβιοτικών βακτηρίων τα οποία κατανάλωναν διαθέσιμα θρεπτικά υλικά και παρήγαγαν γαλακτικό οξύ ο ανταγωνισμός για πόρους μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού των παθογόνων οργανισμών που υπάρχουν. Επίσης οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που προστέθηκαν στο τυρί cottage με πρωτεολυτική δράση μπορεί να προκαλέσουν την απελευθέρωση δυνητικά βιοδραστικών πεπτιδίων. Σύμφωνα με τις παραπάνω έρευνες, οι οποίες διεξήχθησαν σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και σε όξινο ορό από γαλακτοκομικά προϊόντα όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς στις μελέτες των Jaiswal and Garode (2018) και Said et al. (2019) παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση σε αντίθεση με την μελέτη των Aspri et al. (2018) όπου δεν παρατηρήθηκε. Στα δικά μας αποτελέσματα σχετικά με τα λυοφιλοποιημένα δείγματα του όξινου ορού γιαουρτιού πριν την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης δεν παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στους παθογόνους μικροοργανισμούς ως προς το εμβόλιο. Η μελέτη των Abadía-García et al. (2013) έδειξαν ότι τα προβιοτικά στελέχη παραμένουν βιώσιμα μετά από 28 ημέρες αποθήκευσης τους με συγκεκριμένα από αυτά να αυξάνονται τις πρώτες 15 ημέρες. Σε συμφωνία έρχεται και με τα δικά μας αποτελέσματα ως προς τα δείγματα του πρόβειου και αιγοπρόβειου όξινου ορού γιαουρτιού, όπου τα στελέχη του *Lactobacillus plantarum* παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με το εμβόλιο, καθώς παρατηρείται αύξηση της οπτικής τους πυκνότητας.

Στην μελέτη των Aspri et al. (2018), για το ζυμωμένο γάλα γαϊδούρας μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και σε δοκιμασία για την αντιμικροβιακή δράση του με την μέθοδο εγχύσεις σε οπές δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *E. Coli* και *Salmonella Typhimurium*, πιθανώς λόγω της πολύπλοκης δομής της εξωτερικής τους μεμβράνης. Σε μια μελέτη των El-Zahar et al. (2004), για την αντιμικροβιακή δράση των απομονωμένων πρωτεϊνών ορού  $\alpha$ -La και  $\beta$ -Lg πρόβειου αποβουτυρωμένου γάλακτος μετά από όξινη πήξη με HCL και λυοφιλοποίηση, υδρόλυση με πεψίνη και ρύθμιση του pH στο 5,5, έναντι μιας σειράς παθογόνων μικροοργανισμών όπως *E. coli* και *Salmonella enterica* με την εκτίμηση της ζώνης αναστολής σε άγαρ με διάφορες συγκεντρώσεις φάνηκε ότι ανέστειλαν την ανάπτυξη του *E.coli* ενώ δεν ανιχνεύθηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Salmonella enterica*. Η μελέτη των Abadía-García et al. (2013), για την αξιολόγηση της επίδραση προσθήκης προβιοτικών μικροοργανισμών σε παρασκευασμένο cottage τυρί στην επιβίωση των προβιοτικών μετά από αποθήκευση και μετά από αποθήκευση και *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης και στην επίδραση τους έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τα κλάσματα των προβιοτικών που απομονώθηκαν από τα δείγματα cottage μετά την *in vitro*

πέψη επαναιωρήθηκαν σε χυμούς λεπτού εντέρου. Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό έδειξε ότι ο αριθμός μειώθηκε περίπου  $2 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$  από την αρχική συγκέντρωση, γεγονός που υποδεικνύει το σημαντικό επίπεδο επιβίωσης στο γαστρικό υγρό. Οι συνθήκες προσομοίωσης του δωδεκαδακτύλου είχαν μεγαλύτερη επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών όπου την πρώτη ώρα ο πληθυσμός τους μειώθηκε κατά  $2 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$ , με σταθερή συμπεριφορά σε όλη τη διαδικασία μέχρι ο αριθμός να φτάσει τους  $2 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$ . Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα σε διάφορες πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε γαλακτοκομικά προϊόντα διαφορετικής ζωικής προέλευσης μετά από *in vitro* πέψη, είτε μετά από απομόνωση οροπρωτεϊνών, στην μελέτη των Aspri et al. (2018) δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, επιπλέον στην μελέτη των El-Zahar et al. (2004) δεν παρουσιάστηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Salmonella enterica* σε αντίθεση με το *E.coli*. Η μελέτη των Abadía-García et al. (2013) έδειξε ότι στα προβιοτικά στελέχη μετά από έκθεσή τους σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό μείωσε τον πληθυσμό τους. Σύμφωνα όμως με τα δικά μας αποτελέσματα ως προς τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* και του μη παθογόνου μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum* δεν παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τον μάρτυρα και τα δείγματα του όξινου ορού γιαουρτιού, μετά από την επώασή τους με το ανάλογο θρεπτικό υλικό σε συνδιασμό με τα δείγματα του όξινου ορού γιαουρτιού φαίνεται πως ο όξινος ορός δεν επηρεάζει τον πληθυσμό των μικροοργανισμών, καθώς δεν φαίνεται κάποια αύξηση ή μείωση της οπτικής τους πυκνότητας καθ' όλη τη διάρκεια της επώασής τους.

## Συμπεράσματα

Λόγω της συνεχούς αύξησης του πληθυσμού της γης και την ταυτόχρονη μείωση των διαθέσιμων καλλιεργήσιμων εκτάσεων, η πολιτεία σε συνεργασία με τον επιστημονικό κλάδο προσπαθεί να βρει λύσεις στην αντιμετώπιση του υποσιτισμού. Επιπλέον, με τη εξέλιξη της τεχνολογίας δίνεται η δυνατότητα συλλογής και επεξεργασίας παραπροϊόντων που μέχρι πρότινος θεωρούνταν ως απόβλητα με σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία των ζωντανών οργανισμών, τα οποία μέσω των επεξεργασιών μπορούν να εντάξουν ένα τρόφιμο στην κατηγορία των βιολειτουργικών τροφίμων με πολλά οφέλη για την υγεία του καταναλωτή, ένα από αυτά τα παραπροϊόντα που πρόσφατα ξεκίνησε να τραβάει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι ο όξινος ορός που παραλαμβάνεται έπειτα από τη στράγγιση του γιαουρτιού. Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε η αντιοξειδωτική και η αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού. Ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα, μέσω της μεθόδου ORAC, φαίνεται πως μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων όξινου ορού γιαουρτιού η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται, με το υψηλότερο ποσοστό να οφείλεται στα πεπτίδια μοριακού βάρους <3kDa. Η έκθεση του όξινου ορού γιαουρτιού με μοριακό βάρος πεπτιδίων <3kDa σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα THP-1, έδειξε μια μείωση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου CAT, υποδεικνύοντας ότι ο όξινος ορός μπορεί να συμβάλει στην μείωση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων. Όσον αφορά την εποχικότητα των δειγμάτων ως παράγοντα στην έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων δεν βρέθηκε κάποια επίδραση, κάτι που δεν ακολουθεί τα αποτελέσματα των πεπτιδίων με μοριακό βάρος <3kDa ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ανάλογα με την εποχή. Λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητας του όξινου ορού γιαουρτιού, κυρίως των βιοενεργών πεπτιδίων μοριακού βάρους <3kDa, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων και ως συμπλήρωμα διατροφής πλούσιο σε φυσικά αντιοξειδωτικά με πολλά οφέλη για την υγεία εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και προλαμβάνοντας το οξειδωτικό στρες βοηθώντας στην αποφυγή εκδήλωσης κλινικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Σχετικά με την αντιμικροβιακή ικανότητα του όξινου ορού γιαουρτιού και τον έλεγχο της οπτικής πυκνότητας των παθογόνων και μη βακτηρίων επωάζοντάς τα με το ανάλογο θρεπτικό υλικό παρουσία λυοφιλοποιημένου όξινου ορού γιαουρτιού πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης τα αποτελέσματα έδειξαν μια αυξητική τάση των *Lactobacillus plantarum* στα δείγματα πριν την *in vitro* πέψη δείχνοντας πως ο όξινος ορός γιαουρτιού περιέχει θρεπτικά συστατικά, τα οποία βοηθούν στην ανάπτυξη του γαλακτοβάκιλλου χρησιμοποιώντας το ως υπόστρωμα. Κάτι που θα μπορούσε να έχει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, σε προϊόντα που

περιέχουν γαλακτοβάκιλλους ακόμη και σε εδώδιμες μεμβράνες, ενισχύοντας την ποιότητα του προϊόντος. Επιπλέον σύμφωνα με την βιβλιογραφία ως προς την αντιμικροβιακή ικανότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος καθώς και τα πεπτίδια αυτών έχουν αντιμικροβιακή ικανότητα, κάτι που δεν βρέθηκε στα αποτελέσματά μας ενδεχομένως λόγω του περιορισμένου αριθμού των παθογόνων μικροοργανισμών. Επομένως, θα πρέπει να διερευνηθεί ευρύτερα, με μεγαλύτερο πλήθος παθογόνων μικροοργανισμών και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του όξινου ορού γιαουρτιού.

Τέλος, περαιτέρω πειραματικές έρευνες θα πρέπει να διεξαχθούν για την μελέτη του όξινου ορού γιαουρτιού. Πολλαπλά δείγματα, τα οποία θα προέρχονται από διαφορετικούς τρόπους στράγγισης του γιαουρτιού με σκοπό την εκτίμηση του παράγοντα αυτού ως προς τα πεπτίδια που διαφεύγουν κατά τη στράγγιση. Επιπρόσθετα, τα δείγματα να προέρχονται από διαφορετική ζωική προέλευση, σε διαφορετικές εποχές του χρόνου και από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, τα οποία θα συλλέγονται από διαφορετικούς παραγωγούς γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο όξινος ορός γιαουρτιού θα πρέπει να μελετηθεί με διαφορετικούς πειραματικούς σχεδιασμούς με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των διαφορετικών παραγόντων της παρασκευής στραγγιστού γιαουρτιού. Εναλλακτικά, για τον καλύτερο έλεγχο των παραγόντων θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα πείραμα υπό ελεγχόμενες και σταθερές πειραματικές συνθήκες.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Ελληνική Βιβλιογραφία

Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α., (2015). Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Α.Ε Αφοί Κυριακίδη.

Στέλιος Καμναρίδης, Γκόλφω Μοάτσου (2009). Γαλακτοκομία. Αθήνα. Εκδόσεις Έμβρυο.

## Διεθνής Βιβλιογραφία

Abadía-García, Lucía, Anaberta Cardador, Sandra T Martín del Campo, Sofia M Arvízu, Eduardo Castaño-Tostado, Carlos Regalado-González, Blanca García-Almendarez, and Silvia L Amaya-Llano. 2013. “Influence of Probiotic Strains Added to Cottage Cheese on Generation of Potentially Antioxidant Peptides, Anti-Listerial Activity, and Survival of Probiotic Microorganisms in Simulated Gastrointestinal Conditions.” *International Dairy Journal* 33 (2): 191–97.

Abbas, Hayam M, Fatma A M Hassan, MAMA El-Gawad, and A K Enab. 2014. “Physicochemical Characteristics of Goat’s Milk.” *Life Sci J* 11 (1): 307–17.

Abd El-Fattah, Alaa, Sally Sakr, Samia El-Dieb, and Hany Elkashef. 2018. “Developing Functional Yogurt Rich in Bioactive Peptides and Gamma-Aminobutyric Acid Related to Cardiovascular Health.” *LWT* 98: 390–97.

Adolfsson, Oskar, Simin Nikbin Meydani, and Robert M Russell. 2004. “Yogurt and Gut Function.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 80 (2): 245–56.

Affertsholt, T, and D Pedersen. 2016. “Whey Book 2016. The Global Market for Whey and Lactose Ingredients 2016–2020.”

Aguilar-Toalá, J E, L Santiago-López, C M Peres, C Peres, H S Garcia, B Vallejo-Cordoba, A F González-Córdova, and A Hernández-Mendoza. 2017. “Assessment of Multifunctional Activity of Bioactive Peptides Derived from Fermented Milk by Specific *Lactobacillus Plantarum* Strains.” *Journal of Dairy Science* 100 (1): 65–75.

Ahn, Chang-Bum, Young-Sook Cho, and Jae-Young Je. 2015. “Purification and Anti-Inflammatory Action of Tripeptide from Salmon Pectoral Fin Byproduct Protein Hydrolysate.” *Food Chemistry* 168: 151–56.

Aimutis, William R. 2004. “Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis.” *The Journal of Nutrition* 134 (4): 989S-995S.

Alvarez-León, Eva-Elisa, Blanca Román-Vinas, and Lluís Serra-Majem. 2006. “Dairy Products and Health: A Review of the Epidemiological Evidence.” *British Journal of Nutrition* 96 (S1): S94–99.

Anifantakis, E M. 1986. “Comparison of the Physico-Chemical Properties of Ewes’ and Cows’ Milk.” *Federation Internationale de Laiterie*.

Anto, Liya, Sarah Wen Warykas, Moises Torres-Gonzalez, and Christopher N Blesso. 2020. “Milk Polar Lipids: Underappreciated Lipids with Emerging Health Benefits.” *Nutrients* 12 (4): 1001.

Arnold, R R, M Brewer, and J J Gauthier. 1980. “Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Sensitivity of a Variety of Microorganisms.” *Infection and Immunity* 28 (3): 893–98.

Arya, Manit, Iqbal S Shergill, Magali Williamson, Lyndon Gommersall, Neehar Arya, and Hitendra R H Patel. 2005. “Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR.” *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (2): 209–19.

- Aspri, Maria, Giulia Leni, Gianni Galaverna, and Photis Papademas. 2018. "Bioactive Properties of Fermented Donkey Milk, before and after in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion." *Food Chemistry* 268: 476–84.
- Aune, Dairy, R Lau, D S M Chan, R Vieira, D C Greenwood, E Kampman, and T Norat. 2012. "Dairy Products and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies." *Annals of Oncology* 23 (1): 37–45.
- Babacan, Ümit, KABA Adem, Fatma Akçakale, Mehmet Fatih CENGİZ, and Ersin AKINCI. 2021. "Optimization of Some Parametric Values of MTT for the Determination of Human Melanoma (SK-Mel-30) Cell Viability." *International Journal of Life Sciences and Biotechnology* 5 (1): 9–20.
- Balasubramanya, N N, A M Natarajan, and R V Rao. 1984. "Availability of Calcium and Phosphorus for Albino Rats from Yoghurt." *Asian Journal of Dairy Research (India)*.
- Bansal, Nidhi, and Bhesh Bhandari. 2016. "Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients." In *Advanced Dairy Chemistry*, 67–98. Springer.
- Barbosa Pelegrini, Patrícia, Rafael Perseghini Del Sarto, Osmar Nascimento Silva, Octávio Luiz Franco, and Maria Fátima Grossi-de-Sa. 2011. "Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work." *Biochemistry Research International* 2011.
- Bellamy, Wayne, Mitsunori Takase, Koji Yamauchi, Hiroyuki Wakabayashi, Kouzou Kawase, and Mamoru Tomita. 1992. "Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* 1121 (1–2): 130–36.  
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90346-F](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90346-F).
- Bellezza, Ilaria, Ileana Giambanco, Alba Minelli, and Rosario Donato. 2018. "Nrf2-Keap1 Signaling in Oxidative and Reductive Stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1865 (5): 721–33.
- Benkerroum, Noreddine. 2008. "Antimicrobial Activity of Lysozyme with Special Relevance to Milk." *African Journal of Biotechnology* 7 (25).
- Benzie, Iris F F, and Malegaddi Devaki. 2018. "The Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay for Non-enzymatic Antioxidant Capacity: Concepts, Procedures, Limitations and Applications." *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, 77–106.
- Bhattacharyya, Asima, Ranajoy Chattopadhyay, Sankar Mitra, and Sheila E Crowe. 2014. "Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases." *Physiological Reviews* 94 (2): 329–54.
- Björck, Lennart, and Olof Claesson. 1979. "Xanthine Oxidase as a Source of Hydrogen Peroxide for the Lactoperoxidase System in Milk." *Journal of Dairy Science* 62 (8): 1211–15.
- Boelsma, Esther, and Joris Kloek. 2008. "Lactotripeptides and Antihypertensive Effects: A Critical Review." *British Journal of Nutrition* 101 (6): 776–86.
- Bong, D D, and C I Moraru. 2014. "Use of Micellar Casein Concentrate for Greek-Style Yogurt Manufacturing: Effects on Processing and Product Properties." *Journal of Dairy Science* 97 (3): 1259–69.
- Bookout, Angie L, and David J Mangelsdorf. 2003. "Quantitative Real-Time PCR Protocol for Analysis of Nuclear Receptor Signaling Pathways." *Nuclear Receptor Signaling* 1 (1): nrs-01012.
- Borková, MARKÉTA, and JANA Snášelová. 2005. "Possibilities of Different Animal Milk Detection in Milk and Dairy Products—a Review." *Czech J. Food Sci* 23 (2): 41–50.

- Brandelli, Adriano, Daniel Joner Daroit, and Ana Paula Folmer Corrêa. 2015. "Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities." *Food Research International* 73: 149–61.
- Brennan, Charles S, and Carmen M Tudorica. 2008. "Carbohydrate-based Fat Replacers in the Modification of the Rheological, Textural and Sensory Quality of Yoghurt: Comparative Study of the Utilisation of Barley Beta-glucan, Guar Gum and Inulin." *International Journal of Food Science & Technology* 43 (5): 824–33.
- Brodkorb, André, Lotti Egger, Marie Alminger, Paula Alvito, Ricardo Assunção, Simon Ballance, Torsten Bohn, Claire Bourlieu-Lacanal, Rachel Boutrou, and Frédéric Carrière. 2019. "INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion." *Nature Protocols* 14 (4): 991–1014.
- Brozos, Christos, Ph Saratsis, Constantin Boscos, S C Kyriakis, and P Tsakalof. 1998. "Effects of Long-Term Recombinant Bovine Somatotropin (BST) Administration on Milk Yield, Milk Composition and Mammary Gland Health of Dairy Ewes." *Small Ruminant Research* 29 (1): 113–20.
- Bučević-Popović, Viljemka, Ivančica Delaš, Sanja Međugorac, Maja Pavela-Vrančić, and Tea Kulišić-Bilušić. 2014. "Oxidative Stability and Antioxidant Activity of Bovine, Caprine, Ovine and Asinine Milk." *International Journal of Dairy Technology* 67 (3): 394–401.
- Buendia, Justin R, Yanping Li, Frank B Hu, Howard J Cabral, M Loring Bradlee, Paula A Quatromoni, Martha R Singer, Gary C Curhan, and Lynn L Moore. 2018. "Regular Yogurt Intake and Risk of Cardiovascular Disease among Hypertensive Adults." *American Journal of Hypertension* 31 (5): 557–65.
- Bylund, G. 2015. "Dairy Processing Handbook (Revision 1)." *Tetra Pak*.
- Cao, Guohua, Helaine M Alessio, and Richard G Cutler. 1993. "Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants." *Free Radical Biology and Medicine* 14 (3): 303–11.
- Carrasco-Castilla, Janet, Alan Javier Hernández-Álvarez, Cristian Jiménez-Martínez, Carmen Jacinto-Hernández, Manuel Alaiz, Julio Girón-Calle, Javier Vioque, and Gloria Dávila-Ortiz. 2012. "Antioxidant and Metal Chelating Activities of Phaseolus Vulgaris L. Var. Jamapa Protein Isolates, Phaseolin and Lectin Hydrolysates." *Food Chemistry* 131 (4): 1157–64.
- Carvalho, Fátima, Ana R Prazeres, and Javier Rivas. 2013. "Cheese Whey Wastewater: Characterization and Treatment." *Science of the Total Environment* 445: 385–96.
- Castro, Ruann Janser Soares de, and Hélia Harumi Sato. 2014. "Advantages of an Acid Protease from Aspergillus Oryzae over Commercial Preparations for Production of Whey Protein Hydrolysates with Antioxidant Activities." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3 (3): 58–65.
- Chabance, B, P Marteau, J C Rambaud, D Migliore-Samour, M Boynard, P Perrotin, R Guillet, P Jolles, and A M Fiat. 1998. "Casein Peptide Release and Passage to the Blood in Humans during Digestion of Milk or Yogurt." *Biochimie* 80 (2): 155–65.
- Chai, Kong Fei, Amanda Ying Hui Voo, and Wei Ning Chen. 2020. "Bioactive Peptides from Food Fermentation: A Comprehensive Review of Their Sources, Bioactivities, Applications, and Future Development." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (6): 3825–85.
- Chakrabarti, Subhadeep, Forough Jahandideh, and Jianping Wu. 2014. "Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress." *BioMed Research International* 2014.
- Chan, J C K, and E C Y Li-Chan. 2006. "Antimicrobial Peptides." *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, 99–136.

- Chandrapala, Jayani, Mikel C Duke, Stephen R Gray, Mike Weeks, Martin Palmer, and Todor Vasiljevic. 2016. "Nanofiltration and Nanodiafiltration of Acid Whey as a Function of PH and Temperature." *Separation and Purification Technology* 160: 18–27.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, and Harry J. Wichers. 2014. "THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach." *International Immunopharmacology* 23 (1): 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>.
- Chen, George Q, Franziska I I Eschbach, Mike Weeks, Sally L Gras, and Sandra E Kentish. 2016. "Removal of Lactic Acid from Acid Whey Using Electrodialysis." *Separation and Purification Technology* 158: 230–37.
- Chen, J, H Lindmark-Månsson, and B Åkesson. 2000. "Optimisation of a Coupled Enzymatic Assay of Glutathione Peroxidase Activity in Bovine Milk and Whey." *International Dairy Journal* 10 (5–6): 347–51.
- Chen, Mu, Qi Sun, Edward Giovannucci, Dariush Mozaffarian, JoAnn E Manson, Walter C Willett, and Frank B Hu. 2014. "Dairy Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: 3 Cohorts of US Adults and an Updated Meta-Analysis." *BMC Medicine* 12 (1): 1–14.
- Cho, Eunyoung, Stephanie A Smith-Warner, Donna Spiegelman, W Lawrence Beeson, Piet A van den Brandt, Graham A Colditz, Aaron R Folsom, Gary E Fraser, Jo L Freudenheim, and Edward Giovannucci. 2004. "Dairy Foods, Calcium, and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 10 Cohort Studies." *Journal of the National Cancer Institute* 96 (13): 1015–22.
- Clare, D A, and H E Swaisgood. 2000. "Bioactive Milk Peptides: A Prospectus." *Journal of Dairy Science* 83 (6): 1187–95.
- Cloutre, D. 1999. "The Whey to Health." *Total Health* 2: 65–66.
- Conte, Fernanda Lopes, Ana Catarina Pereira, Gonçalo Brites, Isabel Ferreira, Ana Cristina Silva, Ana Isabel Sebastião, Patrícia Matos, Cláudia Pereira, Maria Teresa Batista, and José Maurício Sforcin. 2022. "Exploring the Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiallergic Potential of Brazilian Propolis in Monocytes." *Phytomedicine Plus* 2 (2): 100231.
- Conway, Valérie, Sylvie F Gauthier, and Yves Pouliot. 2013. "Antioxidant Activities of Buttermilk Proteins, Whey Proteins, and Their Enzymatic Hydrolysates." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2): 364–72.
- Corrochano, Alberto R, Vitaly Buckin, Phil M Kelly, and Linda Giblin. 2018. "Invited Review: Whey Proteins as Antioxidants and Promoters of Cellular Antioxidant Pathways." *Journal of Dairy Science* 101 (6): 4747–61.
- Dashper, Stuart G, Sze Wei Liu, and Eric C Reynolds. 2007. "Antimicrobial Peptides and Their Potential as Oral Therapeutic Agents." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 13 (4): 505–16.
- Deeth, Hilton C, and Nidhi Bansal. 2018. *Whey Proteins: From Milk to Medicine*. Academic Press.
- Demers-Mathieu, Véronique, Sylvie F Gauthier, Michel Britten, Ismaïl Fliss, Gilles Robitaille, and Julie Jean. 2013. "Antibacterial Activity of Peptides Extracted from Tryptic Hydrolyzate of Whey Protein by Nanofiltration." *International Dairy Journal* 28 (2): 94–101.
- Desjeux, Jehan-François. 2000. "Can Malabsorbed Carbohydrates Be Useful in the Treatment of Acute Diarrhea?" *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31 (5): 499–502.
- Drago-Serrano, Maria Elisa, Rafael Campos-Rodríguez, Julio César Carrero, and Mireya De la Garza. 2017. "Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (3): 501.

- Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological Reviews*.
- Dror, Daphna K, and Lindsay H Allen. 2014. "Dairy Product Intake in Children and Adolescents in Developed Countries: Trends, Nutritional Contribution, and a Review of Association with Health Outcomes." *Nutrition Reviews* 72 (2): 68–81.
- El-Loly, M M. 2007. "Identification and Quantification of Whey Immunoglobulins by Reversed Phase Chromatography." *Int. J. Dairy Sci* 2 (3): 268–74.
- El-Zahar, K, M Sitohy, Y Choiset, F Metro, T Haertle, and J M Chobert. 2004. "Antimicrobial Activity of Ovine Whey Protein and Their Peptic Hydrolysates." *Milchwissenschaft* 59 (11): 653–56.
- Elliott, Justin. 2013. "Whey Too Much: Greek Yogurt's Dark Side." *Modern Farmer*.
- Ellison 3rd, R T, and Theodore J Giehl. 1991. "Killing of Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme." *The Journal of Clinical Investigation* 88 (4): 1080–91.
- Ellison 3rd, R T, Theodore J Giehl, and F MARC LaForce. 1988. "Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin." *Infection and Immunity* 56 (11): 2774–81.
- Elofsson, Cecilia, Petr Dejmek, Marie Paulsson, and Hans Burling. 1997. "Characterization of a Cold-Gelling Whey Protein Concentrate." *International Dairy Journal* 7 (8–9): 601–8.
- Erel, Ozcan. 2004. "A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation." *Clinical Biochemistry* 37 (4): 277–85.
- Etzel, Mark R. 2004. "Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions." *The Journal of Nutrition* 134 (4): 996S-1002S.
- Expósito, Iván López, and Isidra Recio. 2006. "Antibacterial Activity of Peptides and Folding Variants from Milk Proteins." *International Dairy Journal* 16 (11): 1294–1305.
- Fang, Yun-Zhong, Sheng Yang, and Guoyao Wu. 2002. "Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition." *Nutrition* 18 (10): 872–79.
- Fardet, Anthony, and Edmond Rock. 2018. "In Vitro and in Vivo Antioxidant Potential of Milks, Yoghurts, Fermented Milks and Cheeses: A Narrative Review of Evidence." *Nutrition Research Reviews* 31 (1): 52–70.
- Farvin, K H Sabeena, Caroline P Baron, Nina Skall Nielsen, and Charlotte Jacobsen. 2010. "Antioxidant Activity of Yoghurt Peptides: Part 1-in Vitro Assays and Evaluation in  $\omega$ -3 Enriched Milk." *Food Chemistry* 123 (4): 1081–89.
- Ferreira, IMPLVO, O Pinho, M V Mota, P Tavares, A Pereira, M P Goncalves, D Torres, C Rocha, and J A Teixeira. 2007. "Preparation of Ingredients Containing an ACE-Inhibitory Peptide by Tryptic Hydrolysis of Whey Protein Concentrates." *International Dairy Journal* 17 (5): 481–87.
- Fitzgerald, Richard J, and Brian A Murray. 2006. "Bioactive Peptides and Lactic Fermentations." *International Journal of Dairy Technology* 59 (2): 118–25.
- Fitzsimons, Sinead M, Daniel M Mulvihill, and Edwin R Morris. 2008. "Large Enhancements in Thermogelation of Whey Protein Isolate by Incorporation of Very Low Concentrations of Guar Gum." *Food Hydrocolloids* 22 (4): 576–86.

- Floris, René, Isidra Recio, Ben Berkhout, and Servaas Visser. 2003. "Antibacterial and Antiviral Effects of Milk Proteins and Derivatives Thereof." *Current Pharmaceutical Design* 9 (16): 1257–75.
- Fontecha, Javier, Lauren Brink, Steven Wu, Yves Pouliot, Francesco Visioli, and Rafael Jiménez-Flores. 2020. "Sources, Production, and Clinical Treatments of Milk Fat Globule Membrane for Infant Nutrition and Well-Being." *Nutrients* 12 (6): 1607.
- Fox, P F, and A L Kelly. 2006. "Indigenous Enzymes in Milk: Overview and Historical Aspects—Part 2." *International Dairy Journal* 16 (6): 517–32.
- Fox, Patrick F, Paul L H McSweeney, and L H Paul. 1998. "Dairy Chemistry and Biochemistry."
- Frankel, Edwin N, and Anne S Meyer. 2000. "The Problems of Using One-dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (13): 1925–41.
- Freitas, M. 2017. "The Benefits of Yogurt, Cultures, and Fermentation." In *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 209–23. Elsevier.
- Freitas Silva, Matheus de, Letizia Pruccoli, Fabiana Morroni, Giulia Sita, Francesca Seghetti, Claudio Viegas Jr, and Andrea Tarozzi. 2018. "The Keap1/Nrf2-ARE Pathway as a Pharmacological Target for Chalcones." *Molecules* 23 (7): 1803.
- Ganju, Sparsh, and Parag R Gogate. 2017. "A Review on Approaches for Efficient Recovery of Whey Proteins from Dairy Industry Effluents." *Journal of Food Engineering* 215: 84–96.
- Gasparrini, Massimiliano, Sadia Afrin, Tamara Y Forbes-Hernández, Danila Cianciosi, Patricia Reboredo-Rodríguez, Adolfo Amici, Maurizio Battino, and Francesca Giampieri. 2018. "Protective Effects of Manuka Honey on LPS-Treated RAW 264.7 Macrophages. Part 2: Control of Oxidative Stress Induced Damage, Increase of Antioxidant Enzyme Activities and Attenuation of Inflammation." *Food and Chemical Toxicology* 120: 578–87.
- Gilbert, Daniel L. 2000. "Fifty Years of Radical Ideas." *Annals of the New York Academy of Sciences* 899 (1): 1–14.
- Gobbetti, Marco, Fabio Minervini, and Carlo G Rizzello. 2004. "Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and Antimicrobial Bioactive Peptides." *International Journal of Dairy Technology* 57 (2-3): 173–88.
- González-Martínez, C, M Becerra, M Cháfer, A Albors, J M Carot, and A Chiralt. 2002. "Influence of Substituting Milk Powder for Whey Powder on Yoghurt Quality." *Trends in Food Science & Technology* 13 (9–10): 334–40.
- Gouda, Ahmed S, Fatima G Abdelruhman, Hamedah Sabbah Alenezi, and Bruno Mégarbane. 2021. "Theoretical Benefits of Yogurt-Derived Bioactive Peptides and Probiotics in COVID-19 Patients—A Narrative Review and Hypotheses." *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (10): 5897–5905.
- Guha, Mausumee, and Nigel Mackman. 2001. "LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes." *Cellular Signalling* 13 (2): 85–94.
- Guha, Snigdha, and Kaustav Majumder. 2019. "Structural-features of Food-derived Bioactive Peptides with Anti-inflammatory Activity: A Brief Review." *Journal of Food Biochemistry* 43 (1): e12531.
- Guimarães, Pedro M R, José A Teixeira, and Lucília Domingues. 2010. "Fermentation of Lactose to Bio-Ethanol by Yeasts as Part of Integrated Solutions for the Valorisation of Cheese Whey." *Biotechnology Advances* 28 (3): 375–84.

- Guo, Mingruo, and Guorong Wang. 2016. "Whey Protein Polymerisation and Its Applications in Environmentally Safe Adhesives." *International Journal of Dairy Technology* 69 (4): 481–88.
- . 2019. "History of Whey Production and Whey Protein Manufacturing." *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications; Guo, M., Ed*, 1–12.
- Gupta, Charu. 2012. "Whey Proteins: A Novel Source of Bioceuticals' Charu Gupta,"Dhan Prakash,"Amar P. Garg and "Sneh Gupta" Amity Institute of Herbal Research and Studies, Amity University, Noida, India "Department of Microbiology, CCS University, Meerut (UP), India" Department of Zoology, RG (PG) College, Chippi Tank, Meerut (UP), India." *Middle-East Journal of Scientific Research* 12 (3): 365–75.
- Gupta, Charu, and Dhan Prakash. 2017. "Therapeutic Potential of Milk Whey." *Beverages* 3 (3): 31.
- Haenlein, G F W. 2001. "The Nutritional Value of Sheep Milk." *Int. J. Animal Sci* 16: 253–68.
- . 2004. "Goat Milk in Human Nutrition." *Small Ruminant Research* 51 (2): 155–63.
- Haenlein, G F W, and R Caccese. 1984. "Goat Milk versus Cow Milk." *Goat Extension Handbook/George FW Haenlein, Donald L. Ace, Editors*.
- Haenlein, G F W, and W L Wendorff. 2006. "Sheep Milk: Production and Utilization, Chapter 3 in Handbook of Milks of Non-Bovine Mammals, Y. Park and GFW Haenlein, Ed." Blackwell Publ.
- Haldar, Shubhasis, Samaresh Mitra, and Krishnananda Chattopadhyay. 2010. "Role of Protein Stabilizers on the Conformation of the Unfolded State of Cytochrome c and Its Early Folding Kinetics: Investigation at Single Molecular Resolution." *Journal of Biological Chemistry* 285 (33): 25314–23.
- Halliwell, Barry, and John M C Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford university press, USA.
- Hammam, A R A, A A Tammam, Y M A Elderwy, and A I Hassan. 2017. "Functional Peptides in Milk Whey: An Overview." *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 48 (4): 77–91.
- Hammam, Ahmed R A. 2019a. "Compositional and Therapeutic Properties of Camel Milk: A Review." *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 148–52.
- . 2019b. "Technological, Applications, and Characteristics of Edible Films and Coatings: A Review." *SN Applied Sciences* 1 (6): 1–11.
- Haney, Evan F, Kamran Nazmi, Fanny Lau, Jan G M Bolscher, and Hans J Vogel. 2009. "Novel Lactoferrampin Antimicrobial Peptides Derived from Human Lactoferrin." *Biochimie* 91 (1): 141–54.
- Hayes, M, R P Ross, G F Fitzgerald, C Hill, and C Stanton. 2006. "Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by Lactobacillus Acidophilus DPC6026." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3): 2260–64.
- Hernández-Ledesma, Blanca, Lourdes Amigo, Isidra Recio, and Begoña Bartolomé. 2007. "ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from  $\beta$ -Lactoglobulin f (19–25). Interactions with Ascorbic Acid." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (9): 3392–97.
- Hernández-Ledesma, Blanca, Alberto Dávalos, Begoña Bartolomé, and Lourdes Amigo. 2005. "Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (3): 588–93.

- Huang, Shang-Min, Kun-Nan Chen, Yen-Po Chen, Wei-Sheng Hong, and Ming-Ju Chen. 2010. "Immunomodulatory Properties of the Milk Whey Products Obtained by Enzymatic and Microbial Hydrolysis." *International Journal of Food Science & Technology* 45 (5): 1061–67.
- Ighodaro, O M, and O A Akinloye. 2018. "First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid." *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4): 287–93.
- Itoh, Ken, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Tetsuro Ishii, Kazuhiko Igarashi, James Douglas Engel, and Masayuki Yamamoto. 1999. "Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Responsive Elements by Nrf2 through Binding to the Amino-Terminal Neh2 Domain." *Genes & Development* 13 (1): 76–86.
- Jaiswal, K R, and A M Garode. 2018. "Antibacterial Activity of Fermented Whey on Some Selected Enteropathogenic Bacteria."
- Jenness, R. 1980. "Composition and Characteristics of Goat Milk: Review 1968– 1979." *Journal of Dairy Science* 63 (10): 1605–30.
- Jenssen, Havard, Pamela Hamill, and Robert E W Hancock. 2006. "Peptide Antimicrobial Agents." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3): 491–511.
- Jiang, P, F Burczynski, C Campbell, G Pierce, J A Austria, and C J Briggs. 2007. "Rutin and Flavonoid Contents in Three Buckwheat Species *Fagopyrum Esculentum*, *F. Tataricum*, and *F. Homotropicum* and Their Protective Effects against Lipid Peroxidation." *Food Research International* 40 (3): 356–64.
- Juarez, M, and M Ramos. 1986. "Physico-Chemical Characteristics of Goat's Milk as Distinct from Those of Cow's Milk." *Federation Internationale de Laiterie*.
- Karakaya AA Taş S, S N El. 2001. "Antioxidant Activity of Some Foods Containing Phenolic Compounds." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52 (6): 501–8.
- Kaulmann, Anouk, Sylvain Legay, Yves-Jacques Schneider, Lucien Hoffmann, and Torsten Bohn. 2016. "Inflammation Related Responses of Intestinal Cells to Plum and Cabbage Digesta with Differential Carotenoid and Polyphenol Profiles Following Simulated Gastrointestinal Digestion." *Molecular Nutrition & Food Research* 60 (5): 992–1005.
- Kellum, John A, Mingchen Song, and Jinyou Li. 2004. "Lactic and Hydrochloric Acids Induce Different Patterns of Inflammatory Response in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286 (4): R686–92.
- Khan, I T, M Bule, R Ullah, M Nadeem, S Asif, and K Niaz. 2019. "The Antioxidant Components of Milk and Their Role in Processing, Ripening, and Storage: Functional Food. *Veterinary World*, 12 (1), 12–33." *Abstract The Current Rate of Population Growth Is so Fast That, to Feed This Massive Population, A*.
- Khush, Gurdev S. 2002. "The Promise of Biotechnology in Addressing Current Nutritional Problems in Developing Countries." *Food and Nutrition Bulletin* 23 (4): 354–57.
- Korhonen, Hannu. 2009. "Milk-Derived Bioactive Peptides: From Science to Applications." *Journal of Functional Foods* 1 (2): 177–87.
- Korhonen, Hannu, and Anne Pihlanto. 2003. "Food-Derived Bioactive Peptides-Opportunities for Designing Future Foods." *Current Pharmaceutical Design* 9 (16): 1297–1308.
- Kovalev, E E. 1983. "Radiation Protection during Space Flight." *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 54 (12 Pt 2): S16-23.



- Kris-Etherton, Penny M, Kari D Hecker, Andrea Bonanome, Stacie M Coval, Amy E Binkoski, Kirsten F Hilpert, Amy E Griel, and Terry D Etherton. 2002. "Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer." *The American Journal of Medicine* 113 (9): 71–88.
- Krissansen, Geoffrey W. 2007. "Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications." *Journal of the American College of Nutrition* 26 (6): 713S-723S.
- Królczyk, Jolanta B, Tomasz Dawidziuk, Emilia Janiszewska-Turak, and Bartosz Solowiej. 2016. "Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry-a Review." *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 66 (3): 157.
- Kuang, Jujiao, Xu Yan, Amanda J Genders, Cesare Granata, and David J Bishop. 2018. "An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research." *PLoS One* 13 (5): e0196438.
- KUDOH, Yasufumi, Shigeki MATSUDA, Keiji IGOSHI, and Tomoyuki OKI. 2001. "Antioxidative Peptide from Milk Fermented with *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Bulgarius* IFO13953." *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 48 (1): 44–50.
- Kyle, Clinton R, and Jayendra K Amamcharla. 2016. "Value Addition of Greek Yogurt Whey Using Magnetic Fluid and Sepiolite Treatments." *Food and Bioprocess Technology* 9 (4): 553–63.
- Larson, Bruce Linder, and Vearl Robert Smith. 1974. *Lactation. A Comprehensive Treatise. Vol. II. Biosynthesis and Secretion of Milk/Diseases*. Academic Press.
- Larsson, Susanna C, Swen-Olof Andersson, Jan-Erik Johansson, and Alicja Wolk. 2008. "Cultured Milk, Yogurt, and Dairy Intake in Relation to Bladder Cancer Risk in a Prospective Study of Swedish Women and Men." *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (4): 1083–87.
- Layman, Donald K, Bo Lönnerdal, and John D Fernstrom. 2018. "Applications for  $\alpha$ -Lactalbumin in Human Nutrition." *Nutrition Reviews* 76 (6): 444–60.
- Lee-Huang, Sylvia, Paul L Huang, Yongtao Sun, Philip L Huang, Hsiang-fu Kung, Diana L Blithe, and Hao-Chia Chen. 1999. "Lysozyme and RNases as Anti-HIV Components in  $\beta$ -Core Preparations of Human Chorionic Gonadotropin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (6): 2678–81.
- Lee-Huang, Sylvia, Vladimir Maiorov, Philip L Huang, Angela Ng, Hee Chul Lee, Young-Tae Chang, Neville Kallenbach, Paul L Huang, and Hao-Chia Chen. 2005. "Structural and Functional Modeling of Human Lysozyme Reveals a Unique Nonapeptide, HL9, with Anti-HIV Activity." *Biochemistry* 44 (12): 4648–55.
- León-Sicairos, Nidia, Fernando López-Soto, Magda Reyes-López, Delfino Godínez-Vargas, Cynthia Ordaz-Pichardo, and Mireya De La Garza. 2006. "Amoebicidal Activity of Milk, Apo-Lactoferrin, SIgA and Lysozyme." *Clinical Medicine & Research* 4 (2): 106–13.
- Leśnierowski, G. 2009. "New Methods of Physico-Chemical Modification of Lysozyme." *Nauka Przyroda Techn* 3 (4): 1–18.
- Li, Z, A Jiang, T Yue, J Wang, Y Wang, and J Su. 2013. "Purification and Identification of Five Novel Antioxidant Peptides from Goat Milk Casein Hydrolysates." *Journal of Dairy Science* 96 (7): 4242–51.
- Liang, Li, Vanessa Tremblay-Hébert, and Muriel Subirade. 2011. "Characterisation of the  $\beta$ -Lactoglobulin/ $\alpha$ -Tocopherol Complex and Its Impact on  $\alpha$ -Tocopherol Stability." *Food Chemistry* 126 (3): 821–26.

- Lievore, Paolla, Deise R S Simões, Karolline M Silva, Northon L Drunkler, Ana C Barana, Alessandro Nogueira, and Ivo M Demiate. 2015. "Chemical Characterisation and Application of Acid Whey in Fermented Milk." *Journal of Food Science and Technology* 52 (4): 2083–92.
- Lippolis, John D, and Jarlath E Nally. 2018. "Considerations for Farm Animal Proteomic Experiments: An Introductory View Gel-Based versus Non-Gel-Based Approaches." In *Proteomics in Domestic Animals: From Farm to Systems Biology*, 7–16. Springer.
- Liu, Jing, Xinxia Wang, and Zheng Zhao. 2014. "Effect of Whey Protein Hydrolysates with Different Molecular Weight on Fatigue Induced by Swimming Exercise in Mice." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (1): 126–30.
- López-Expósito, Iván, Ana Quirós, Lourdes Amigo, and Isidra Recio. 2007. "Casein Hydrolysates as a Source of Antimicrobial, Antioxidant and Antihypertensive Peptides." *Le Lait* 87 (4–5): 241–49.
- Lorenzo, José Manuel, Mirian Pateiro, Rubén Domínguez, Francisco J Barba, Predrag Putnik, Danijela Bursać Kovačević, Avi Shpigelman, Daniel Granato, and Daniel Franco. 2018. "Berries Extracts as Natural Antioxidants in Meat Products: A Review." *Food Research International* 106: 1095–1104.
- Losnedahl, Karen J, Hong Wang, Mueen Aslam, Sixiang Zou, and Walter L Hurley. 1998. "Antimicrobial Factors in Milk." *Illini DairyNet Papers* 38: 1–4.
- Lucas, Anthony, Edmond Rock, Jean-François Chamba, Isabelle Verdier-Metz, Patrick Brachet, and Jean-Baptiste Coulon. 2006. "Respective Effects of Milk Composition and the Cheese-Making Process on Cheese Compositional Variability in Components of Nutritional Interest." *Le Lait* 86 (1): 21–41.
- Madureira, Ana R, Cláudia I Pereira, Ana M P Gomes, Manuela E Pintado, and F Xavier Malcata. 2007. "Bovine Whey Proteins—Overview on Their Main Biological Properties." *Food Research International* 40 (10): 1197–1211.
- Mangano, Kelsey M, Yihong Bao, and Changhui Zhao. 2019. "Nutritional Properties of Whey Proteins." *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*, 103–40.
- Mann, Bimlesh, Syamala Athira, Rajan Sharma, Rajesh Kumar, and Prabin Sarkar. 2019. "Bioactive Peptides from Whey Proteins." In *Whey Proteins*, 519–47. Elsevier.
- Martinez, R J, and S F Carroll. 1980. "Sequential Metabolic Expressions of the Lethal Process in Human Serum-Treated Escherichia Coli: Role of Lysozyme." *Infection and Immunity* 28 (3): 735–45.
- Matés, José M, Cristina Pérez-Gómez, and Ignacio Núñez De Castro. 1999. "Antioxidant Enzymes and Human Diseases." *Clinical Biochemistry* 32 (8): 595–603.
- Matsumoto, Mitsuharu, Hifumi Ohishi, and Yoshimi Benno. 2001. "Impact of LKM512 Yogurt on Improvement of Intestinal Environment of the Elderly." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 31 (3): 181–86.
- Maux, Solene Le, Linda Giblin, Thomas Croguennec, Said Bouhallab, and Andre Brodkorb. 2012. "β-Lactoglobulin as a Molecular Carrier of Linoleate: Characterization and Effects on Intestinal Epithelial Cells in Vitro." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (37): 9476–83.
- Mayne, Susan T, and Judith H Spungen. 2017. "The US Food and Drug Administration's Role in Improving Nutrition: Labeling and Other Authorities." *Journal of Food Composition and Analysis* 64: 5–9.
- McKevith, B, and C Shortt. 2003. "FERMENTED MILKS| Other Relevant Products."

- Mehra, Raj, Pertti Marnila, and Hannu Korhonen. 2006. "Milk Immunoglobulins for Health Promotion." *International Dairy Journal* 16 (11): 1262–71.
- Mehraban, Mohammad Hossein, Reza Yousefi, Asghar Taheri-Kafrani, Farhad Panahi, and Ali Khalafi-Nezhad. 2013. "Binding Study of Novel Anti-Diabetic Pyrimidine Fused Heterocycles to  $\beta$ -Lactoglobulin as a Carrier Protein." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112: 374–79.
- Merkel, Arthur, Daria Voropaeva, and Martin Ondrušek. 2021. "The Impact of Integrated Nanofiltration and Electrodialytic Processes on the Chemical Composition of Sweet and Acid Whey Streams." *Journal of Food Engineering* 298: 110500.
- Mills, S, R P Ross, C Hill, G F Fitzgerald, and C Stanton. 2011. "Milk Intelligence: Mining Milk for Bioactive Substances Associated with Human Health." *International Dairy Journal* 21 (6): 377–401.
- Minervini, F, F Algaron, C G Rizzello, P F Fox, V Monnet, and Marco Gobetti. 2003. "Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus Helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9): 5297–5305.
- Moreno Montoro, Miriam. 2016. "Design and Development of a Fermented Goat Milk as Functional Food. Bioactive Peptides."
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63.
- Murata, M, H Wakabayashi, K Yamauchi, and F Abe. 2013. "Identification of Milk Proteins Enhancing the Antimicrobial Activity of Lactoferrin and Lactoferricin." *Journal of Dairy Science* 96 (8): 4891–98.
- Ng, Tzi Bun, Randy Chi Fai Cheung, Jack Ho Wong, Yan Wang, Denis Tsz Ming Ip, David Chi Cheong Wan, and Jiang Xia. 2015. "Antiviral Activities of Whey Proteins." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (17): 6997–7008.
- Nguyen, Hanh T H, Jessica L Gathercole, Li Day, and Julie E Dalziel. 2020. "Differences in Peptide Generation Following in Vitro Gastrointestinal Digestion of Yogurt and Milk from Cow, Sheep and Goat." *Food Chemistry* 317: 126419.
- Niklowitz, Petra, Thomas Menke, Jörg Giffel, and Werner Andler. 2005. "Coenzyme Q10 in Maternal Plasma and Milk throughout Early Lactation." *Biofactors* 25 (1-4): 67–72.
- O’Keeffe, Martina B, and Richard J FitzGerald. 2014. "Antioxidant Effects of Enzymatic Hydrolysates of Whey Protein Concentrate on Cultured Human Endothelial Cells." *International Dairy Journal* 36 (2): 128–35.
- O’Sullivan, Therese A, Katherine Hafekost, Francis Mitrou, and David Lawrence. 2013. "Food Sources of Saturated Fat and the Association with Mortality: A Meta-Analysis." *American Journal of Public Health* 103 (9): e31–42.
- Ormrod, D J, and T E Miller. 1991. "The Anti-Inflammatory Activity of a Low Molecular Weight Component Derived from the Milk of Hyperimmunized Cows." *Agents and Actions* 32 (3): 160–66.
- Ou, Boxin, Maureen Hampsch-Woodill, and Ronald L Prior. 2001. "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10): 4619–26.
- Ozrenk, Elvan, and S Selcuk Inci. 2008. "The Effect of Seasonal Variation on the Composition of Cow Milk in Van Province." *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (1): 161–64.

- Pais Chanfrau, J M, J Núñez Pérez, M V Lara Fiallos, L M Rivera Intriago, V H Abril Porras, M J Cuaran Guerrero, and L E Trujillo Toledo. 2017. "Milk Whey-from a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products." *Prensa Med. Argent* 103 (4): 1.
- Pal, Sebely, Jenny McKay, Monica Jane, and Suleen Ho. 2019. "Dairy Whey Proteins and Obesity." In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*, 261–78. Elsevier.
- Papademas, P, and P Kotsaki. 2019. "Technological Utilization of Whey towards Sustainable Exploitation." *J Adv Dairy Res* 7 (4): 231.
- Park, Y W. 1994. "Hypo-Allergenic and Therapeutic Significance of Goat Milk." *Small Ruminant Research* 14 (2): 151–59.
- Park, Young W. 1991. "Relative Buffering Capacity of Goat Milk, Cow Milk, Soy-Based Infant Formulas, and Commercial Nonprescription Antacid Drugs." *Journal of Dairy Science* 74 (10): 3326–33.
- . 2017. "Goat Milk—Chemistry and Nutrition." *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*, 42–83.
- Park, Young W, and Hyginus I Chukwu. 1989. "Trace Mineral Concentrations in Goat Milk from French-Alpine and Anglo-Nubian Breeds during the First 5 Months of Lactation." *Journal of Food Composition and Analysis* 2 (2): 161–69.
- Parkash, S, and R Jenness. 1968. "The Composition and Characteristics of Goat's Milk: A Review." In *Dairy Sci. Abstr*, 30:67–87.
- Parodi, P W. 2007. "A Role for Milk Proteins and Their Peptides in Cancer Prevention." *Current Pharmaceutical Design* 13 (8): 813–28.
- Patel, Seema. 2015. "Emerging Trends in Nutraceutical Applications of Whey Protein and Its Derivatives." *Journal of Food Science and Technology* 52 (11): 6847–58.
- Pellegrini, Antonio. 2003. "Antimicrobial Peptides from Food Proteins." *Current Pharmaceutical Design* 9 (16): 1225–38.
- Peng, Xinyan, Youling L Xiong, and Baohua Kong. 2009. "Antioxidant Activity of Peptide Fractions from Whey Protein Hydrolysates as Measured by Electron Spin Resonance." *Food Chemistry* 113 (1): 196–201.
- Pihlanto, Anne. 2006. "Antioxidative Peptides Derived from Milk Proteins." *International Dairy Journal* 16 (11): 1306–14.
- Pihlanto, Anne, and Hannu Korhonen. 2003. "Bioactive Peptides and Proteins." *Advances in Food and Nutrition Research* 47 (4): 175–276.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, and Aneta Pop. 2015. "The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74.
- Potočnik, Klemen, Vesna Gantner, Krešimir Kuterovac, and Angela Cividini. 2011. "Mare's Milk: Composition and Protein Fraction in Comparison with Different Milk Species." *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka* 61 (2): 107–13.
- Power-Grant, O, C Bruen, L Brennan, L Giblin, P Jakeman, and R J FitzGerald. 2015. "In Vitro Bioactive Properties of Intact and Enzymatically Hydrolysed Whey Protein: Targeting the Enteroinsular Axis." *Food & Function* 6 (3): 972–80.
- Power, Olive, P Jakeman, and R J FitzGerald. 2013. "Antioxidative Peptides: Enzymatic Production, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Potential Applications of Milk-Derived Antioxidative Peptides." *Amino Acids* 44 (3): 797–820.

- Pritchard, Stephanie Rae, Michael Phillips, and Kasipathy Kailasapathy. 2010. "Identification of Bioactive Peptides in Commercial Cheddar Cheese." *Food Research International* 43 (5): 1545–48.
- Priyadarshini, Subhadra, and Vinod K Kansal. 2003. "Biochemical Characterization of Buffalo (Bubalus Bubalis) Milk Lysozyme." *Journal of Dairy Research* 70 (4): 467–71.
- Pulina, Giuseppe, and Roberta Bencini. 2004. *Dairy Sheep Nutrition*. CABI publishing.
- Qian, Bingjun, Meizi Xing, Lei Cui, Yun Deng, Yuqun Xu, Mini Huang, and Shaohui Zhang. 2011. "Antioxidant, Antihypertensive, and Immunomodulatory Activities of Peptide Fractions from Fermented Skim Milk with *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Bulgarius* LB340." *Journal of Dairy Research* 78 (1): 72–79.
- Qin, Li-Qiang, Jia-Ying Xu, Shu-Fen Han, Zeng-Li Zhang, You-You Zhao, and Ignatius M Y Szeto. 2015. "Dairy Consumption and Risk of Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 24 (1): 90–100.
- Quiles, José L, Julio J Ochoa, M Carmen Ramirez-Tortosa, Javier Linde, Stefano Bompadre, Maurizio Battino, Eduardo Narbona, José Maldonado, and José Mataix. 2006. "Coenzyme Q Concentration and Total Antioxidant Capacity of Human Milk at Different Stages of Lactation in Mothers of Preterm and Full-Term Infants." *Free Radical Research* 40 (2): 199–206.
- Rafiq, Saima, Nuzhat Huma, Imran Pasha, Aysha Sameen, Omer Mukhtar, and Muhammad Issa Khan. 2015. "Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29 (7): 1022–28.
- Rajasekaran, A, and M Kalaivani. 2013. "Designer Foods and Their Benefits: A Review." *Journal of Food Science and Technology* 50 (1): 1–16.
- Rama, Gabriela Rabaioli, Daniel Kuhn, Simone Beux, Mônica Jachetti Maciel, and Cláudia Fernanda Volken de Souza. 2019. "Potential Applications of Dairy Whey for the Production of Lactic Acid Bacteria Cultures." *International Dairy Journal* 98: 25–37.
- Rammer, Paul, Line Groth-Pedersen, Thomas Kirkegaard, Mads Daugaard, Anna Rytter, Piotr Szyniarowski, Maria Høyer-Hansen, Lou Klitgaard Povlsen, Jesper Nylandsted, and Jakob E Larsen. 2010. "BAMLET Activates a Lysosomal Cell Death Program in Cancer CellsBAMLET Induces Lysosomal Cell Death Pathway." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (1): 24–32.
- Rasic, J L, and J A Kurmann. 1978. "Fermented Fresh Milk Products and Their Cultures." *Copenhagen: Technical Dairy Publishing House*.
- Reddy, K V R, R D Yedery, and C Aranha. 2004. "Antimicrobial Peptides: Premises and Promises." *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (6): 536–47.
- Reiter, Bruno, and Jean-Paul Perraudin. 1991. "Lactoperoxidase: Biological Functions." *Peroxidases in Chemistry and Biology* 1: 143–80.
- Revilla, Isabel, M I González-Martín, A M Vivar-Quintana, M A Blanco-López, Iris A Lobos-Ortega, and José Miguel Hernández-Hierro. 2016. "Antioxidant Capacity of Different Cheeses: Affecting Factors and Prediction by near Infrared Spectroscopy." *Journal of Dairy Science* 99 (7): 5074–82.
- Rival, Sandrine G, Carmen G Boeriu, and Harry J Wichers. 2001. "Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxigenase Inhibition." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1): 295–302.
- Rival, Sandrine G, Silvia Fornaroli, Carmen G Boeriu, and Harry J Wichers. 2001. "Caseins and Casein Hydrolysates. 1. Lipoxigenase Inhibitory Properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1): 287–94.

- Robbins, Kumar V, Vinay Kumar, and A K Abbas. 2010. "Cotran Pathologic Basis of Disease." *China: Elsevier*, 88–89.
- Roberts, A K, R Chierici, G Sawatzki, M J Hill, S Volpato, and V Vigi. 1992. "Supplementation of an Adapted Formula with Bovine Lactoferrin: 1. Effect on the Infant Faecal Flora." *Acta Paediatrica* 81 (2): 119–24.
- Rocha-Mendoza, Diana, Erica Kosmerl, Abigail Krentz, Lin Zhang, Shivani Badiger, Gonzalo Miyagusuku-Cruzado, Alba Mayta-Apaza, Monica Giusti, Rafael Jiménez-Flores, and Israel García-Cano. 2021. "Invited Review: Acid Whey Trends and Health Benefits." *Journal of Dairy Science* 104 (2): 1262–75.
- Rodrigues, Lígia, José Teixeira, Fernando Schmitt, Marie Paulsson, and Helena Lindmark Månsson. 2008. "Lactoferrin and Cancer Disease Prevention." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (3): 203–17.
- Rodríguez, F A Riera, A Fernández Martínez, and C Muro Urista. 2011. "Cheese Whey as a Source of Active Peptides: Production, Analysis, Purification and Animal and Human Trials." *Whey: Types, Composition and Health Implications*, 1–52.
- Rogers, H J, and C Synge. 1978. "Bacteriostatic Effect of Human Milk on Escherichia Coli: The Role of IgA." *Immunology* 34 (1): 19.
- Roginski, H, J W Fuquay, P F Fox, and P Jelen. 2003. "Whey Processing, Utilization and Products." *En cycl. Dairy Sci*, 2739–45.
- Rombaut, Roeland, Veerle Dejonckheere, and Koen Dewettinck. 2007. "Filtration of Milk Fat Globule Membrane Fragments from Acid Buttermilk Cheese Whey." *Journal of Dairy Science* 90 (4): 1662–73.
- Said, Nursaidah, Deka Uli Fahrodi, Ratmawati Malaka, and Fatma Maruddin. 2019. "Assessment of the Antibacterial Activity of Goat Milk Kefir on Escherichia Coli ATCC 8739 and Salmonella Enteric Subsp. Enterica Serovar Typhimurium ATCC 14028 Using a Well Diffusion Method." In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 247:12051. IOP Publishing.
- Santillo, Antonella, A L Kelly, Carmen Palermo, A Sevi, and Marzia Albenzio. 2009. "Role of Indigenous Enzymes in Proteolysis of Casein in Caprine Milk." *International Dairy Journal* 19 (11): 655–60.
- Santos-Sánchez, Norma F, Raúl Salas-Coronado, Rogelio Valadez-Blanco, Beatriz Hernández-Carlos, and Paula C Guadarrama-Mendoza. 2017. "Natural Antioxidant Extracts as Food Preservatives." *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 16 (4): 361–70.
- Sexton, Carol, David Buss, Bayard Powell, Michael O'Connor, Robert Rainer, Ralph Woodruff, Julia Cruz, Mark Pettenati, P Nagesh Rao, and L Douglas Case. 1996. "Usefulness and Limitations of Serum and Urine Lysozyme Levels in the Classification of Acute Myeloid Leukemia: An Analysis of 208 Cases." *Leukemia Research* 20 (6): 467–72.
- Shahani, Khem M, and Ramesh C Chandan. 1979. "Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-Containing Dairy Foods." *Journal of Dairy Science* 62 (10): 1685–94.
- Sharma, Ranjan. 2019. "Whey Proteins in Functional Foods." In *Whey Proteins*, 637–63. Elsevier.
- Sharpe, Susan J, Gregory D Gamble, and D Norman Sharpe. 1994. "Cholesterol-Lowering and Blood Pressure Effects of Immune Milk." *The American Journal of Clinical Nutrition* 59 (4): 929–34.
- Shin, Kouichirou, Hiroyuki Wakabayashi, Koji Yamauchi, Susumu Teraguchi, Yoshitaka Tamura, Masahiko Kurokawa, and Kimiyasu Shiraki. 2005. "Effects of Orally Administered Bovine Lactoferrin and Lactoperoxidase on Influenza Virus Infection in Mice." *Journal of Medical Microbiology* 54 (8): 717–23.

- Silanikove, Nissim, Uzi Merin, and Gabriel Leitner. 2006. "Physiological Role of Indigenous Milk Enzymes: An Overview of an Evolving Picture." *International Dairy Journal* 16 (6): 533–45.
- Singh, R. 2016. "Whey Proteins and Their Value-Added Applications." In *Protein Byproducts*, 303–13. Elsevier.
- Siso, M I González. 1996. "The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review." *Bioresource Technology* 57 (1): 1–11.
- Skrzypczak, Katarzyna, Waldemar Gustaw, Emilia Fornal, Anna Kononiuk, Monika Michalak-Majewska, Wojciech Radzki, and Adam Waśko. 2020. "Functional and Technological Potential of Whey Protein Isolate in Production of Milk Beverages Fermented by New Strains of *Lactobacillus Helveticus*." *Applied Sciences* 10 (20): 7089.
- Smithers, Geoffrey W. 2015. "Whey-Ing up the Options—Yesterday, Today and Tomorrow." *International Dairy Journal* 48: 2–14.
- Sodini, Isabelle, and Phillip S Tong. 2006. "Milk and Milk-Based Dairy Ingredients." *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* 167.
- Speranza, Lorenza, Sara Franceschelli, Mirko Pesce, Marcella Reale, Luigi Menghini, Isabella Vinciguerra, Maria Anna De Lutiis, Mario Felaco, and Alfredo Grilli. 2010. "Antiinflammatory Effects in THP-1 Cells Treated with Verbascoside." *Phytotherapy Research* 24 (9): 1398–1404.
- Staples, Kim, Samara Freeman, and Ph D Prof Dr Ir Gertjan. 2006. "Gut Health and Whey Products." *Nutrition Monograph Gut Health*, 1–12.
- Su, M-Y, M Broadhurst, C-P Liu, J Gathercole, W-L Cheng, X-Y Qi, S Clerens, J M Dyer, L Day, and B Haigh. 2017. "Comparative Analysis of Human Milk and Infant Formula Derived Peptides Following in Vitro Digestion." *Food Chemistry* 221: 1895–1903.
- Suetsuna, Kunio, Hiroyuki Ukeda, and Hiroto Ochi. 2000. "Isolation and Characterization of Free Radical Scavenging Activities Peptides Derived from Casein." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11 (3): 128–31.
- Tagliazucchi, Davide, Serena Martini, Sherif Shamsia, Ahmed Helal, and Angela Conte. 2018. "Biological Activities and Peptidomic Profile of in Vitro-Digested Cow, Camel, Goat and Sheep Milk." *International Dairy Journal* 81: 19–27.
- Tang, Wenting, Hui Zhang, Li Wang, Haifeng Qian, and Xiguang Qi. 2015. "Targeted Separation of Antibacterial Peptide from Protein Hydrolysate of Anchovy Cooking Wastewater by Equilibrium Dialysis." *Food Chemistry* 168: 115–23.
- Tavares, T G, M M Contreras, M Amorim, P J Martín-Álvarez, M E Pintado, I Recio, and F X Malcata. 2011. "Optimisation, by Response Surface Methodology, of Degree of Hydrolysis and Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities of Whey Protein Hydrolysates Obtained with Cardoon Extract." *International Dairy Journal* 21 (12): 926–33.
- Teraguchi, Susumu, Kouichirou Shin, Tomohiro Ogata, Michiko Kingaku, Akira Kaino, Hirofumi Miyauchi, Yasuo Fukuwatari, and Seiichi Shimamura. 1995. "Orally Administered Bovine Lactoferrin Inhibits Bacterial Translocation in Mice Fed Bovine Milk." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 4131–34.
- Teraguchi, Susumu, Kouichirou Shin, Kazuhiro Ozawa, Satoko Nakamura, Yasuo Fukuwatari, Shigeo Tsuyuki, Hideo Namihira, and Seiichi Shimamura. 1995. "Bacteriostatic Effect of Orally Administered Bovine Lactoferrin on Proliferation of Clostridium Species in the Gut of Mice Fed Bovine Milk." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 501–6.

- Tijerina-Sáenz, A, S M Innis, and D D Kitts. 2009. "Antioxidant Capacity of Human Milk and Its Association with Vitamins A and E and Fatty Acid Composition." *Acta Paediatrica* 98 (11): 1793–98.
- Tomita, M, H Wakabayashi, K Yamauchi, S Teraguchi, and H Hayasawa. 2002. "Bovine Lactoferrin and Lactoferricin Derived from Milk: Production and Applications." *Biochemistry and Cell Biology* 80 (1): 109–12.
- Tomita, Mamoru, Wayne Bellamy, Mitsunori Takase, Koji Yamauchi, Hiroyuki Wakabayashi, and Kouzou Kawase. 1991. "Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin." *Journal of Dairy Science* 74 (12): 4137–42.
- Tomita, Mamoru, Hiroyuki Wakabayashi, Kouichirou Shin, Koji Yamauchi, Tomoko Yaeshima, and Keiji Iwatsuki. 2009. "Twenty-Five Years of Research on Bovine Lactoferrin Applications." *Biochimie* 91 (1): 52–57.
- Tong, Lawrence M, Shigefumi Sasaki, D Julian McClements, and Eric A Decker. 2000. "Mechanisms of the Antioxidant Activity of a High Molecular Weight Fraction of Whey." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1473–78.
- Toreti, Viviane Cristina, Helia Harumi Sato, Glaucia Maria Pastore, and Yong Kun Park. 2013. "Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Tsuda, Hiroyuki, Takahiro Kozu, Gen Inuma, Yasuo Ohashi, Yutaka Saito, Daizo Saito, Takayuki Akasu, David B Alexander, Mitsuru Futakuchi, and Katsumi Fukamachi. 2010. "Cancer Prevention by Bovine Lactoferrin: From Animal Studies to Human Trial." *Biomaterials* 23 (3): 399–409.
- Tsuda, Hiroyuki, Kazunori Sekine, Ken-ichi Fujita, and Masaaki Iigo. 2002. "Cancer Prevention by Bovine Lactoferrin and Underlying Mechanisms a Review of Experimental and Clinical Studies." *Biochemistry and Cell Biology* 80 (1): 131–36.
- Tunick, Michael H. 2008. "Whey Protein Production and Utilization: A Brief History." *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 1–13.
- Udenigwe, Chibuike C. 2014. "Bioinformatics Approaches, Prospects and Challenges of Food Bioactive Peptide Research." *Trends in Food Science & Technology* 36 (2): 137–43.
- Underwood, E J. 1977. "Trace Elements in Human and Animal Nutrition 4th Ed Academic Press." *New York*.
- Usta, B, and L Yılmaz-Ersan. 2013. "Antioxidant Enzymes of Milk and Their Biological Effects." *Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi* 27 (2): 123–30.
- Valdivia-Nájar, C Guillermo, Olga Martín-Belloso, Joaquín Giner-Seguí, and Robert Soliva-Fortuny. 2017. "Modeling the Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in Fresh-Cut Tomato Treated with Pulsed Light." *Food and Bioprocess Technology* 10 (2): 266–74.
- Varaldo, Pietro E, Sebastiano Valisena, Maria C Mingari, and Giuseppe Satta. 1989. "Lysozyme-Induced Inhibition of the Lymphocyte Response to Mitogenic Lectins." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 190 (1): 54–62.
- Vardhanabhuti, Bongkosh, E Allen Foegeding, Matthew K McGuffey, Christopher R Daubert, and Harold E Swaisgood. 2001. "Gelation Properties of Dispersions Containing Polymerized and Native Whey Protein Isolate." *Food Hydrocolloids* 15 (2): 165–75.
- Wakabayashi, Hiroyuki, Koji Yamauchi, and Mitsunori Takase. 2006. "Lactoferrin Research, Technology and Applications." *International Dairy Journal* 16 (11): 1241–51.



- Walsh, Helen. 2014. *Functional Properties of Whey Protein and Its Application in Nanocomposite Materials and Functional Foods*. The University of Vermont and State Agricultural College.
- Wang, Shaoyun, Tzi Bun Ng, Tianbao Chen, Dongyun Lin, Jinhong Wu, Pingfan Rao, and Xiuyun Ye. 2005. "First Report of a Novel Plant Lysozyme with Both Antifungal and Antibacterial Activities." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 (3): 820–27.
- Wang, Yi-Chieh, Roch-Chui Yu, and Cheng-Chun Chou. 2006. "Antioxidative Activities of Soymilk Fermented with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria." *Food Microbiology* 23 (2): 128–35.
- Wang, Zhe, and Guangshun Wang. 2004. "APD: The Antimicrobial Peptide Database." *Nucleic Acids Research* 32 (suppl\_1): D590–92.
- Ward, P P, and E Paz. 2005. "Conneely OM." *Multifunctional Roles of Lactoferrin: A Critical Overview*. *Cell Mol Life Sci* 62: 2540Y2548.
- Watanabe, Toshio, Hikaru Nishio, Tetsuya Tanigawa, Hirokazu Yamagami, Hirotohi Okazaki, Kenji Watanabe, Kazunari Tominaga, Yasuhiro Fujiwara, Nobuhide Oshitani, and Takashi Asahara. 2009. "Probiotic Lactobacillus Casei Strain Shirota Prevents Indomethacin-Induced Small Intestinal Injury: Involvement of Lactic Acid." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 297 (3): G506–13.
- Wherry, Bryan, David M Barbano, and Mary Anne Drake. 2019. "Use of Acid Whey Protein Concentrate as an Ingredient in Nonfat Cup Set-Style Yogurt." *Journal of Dairy Science* 102 (10): 8768–84.
- Whitney, Robert McL. 1988. "Proteins of Milk." In *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 81–169. Springer.
- Wit, J N De. 1989. "Functional Properties of Whey Proteins." *Developments in Dairy Chemistry. 4. Functional Milk Proteins.*, 285–321.
- . 2011. "Applications of Whey Products." In *Lecturer's Handbook on Whey and Products*, 40–72. European Whey Products Association.
- Wit, J N De, and A C M VAN HOOYDONK. 1996. "Structure, Functions and Applications of Lactoperoxidase in Natural Antimicrobial Systems." *Nederlands Melk En Zuiveltijdschrift* 50 (2): 227–44.
- Wu, Meng-Ling, Yen-Chun Ho, Chen-Yu Lin, and Shaw-Fang Yet. 2011. "Heme Oxygenase-1 in Inflammation and Cardiovascular Disease." *American Journal of Cardiovascular Disease* 1 (2): 150.
- Xiong, Youling L. 2010. "Antioxidant Peptides." *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* 1: 29–42.
- Xu, Jia-Ying, Li-Qiang Qin, Pei-Yu Wang, Wei Li, and Chun Chang. 2008. "Effect of Milk Tripeptides on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Nutrition* 24 (10): 933–40.
- Yadav, Jay Shankar Singh, Song Yan, Sridhar Pilli, Lalit Kumar, Rajeshwar Dayal Tyagi, and Rao Y Surampalli. 2015. "Cheese Whey: A Potential Resource to Transform into Bioprotein, Functional/Nutritional Proteins and Bioactive Peptides." *Biotechnology Advances* 33 (6): 756–74.
- Yalcin, A Suha. 2006. "Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides." *Current Pharmaceutical Design* 12 (13): 1637–43.
- Yazdanparast, R, and A Ardestani. 2007. "In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Cyperus Rotundus*." *Journal of Medicinal Food* 10 (4): 667–74.

- Yolken, Robert H, Genevieve A Losonsky, Steven Vonderfecht, Flora Leister, and Siok-Bi Wee. 1985. "Antibody to Human Rotavirus in Cow's Milk." *New England Journal of Medicine* 312 (10): 605–10.
- Zapata, Rizaldy C, Arashdeep Singh, Adel Pezeshki, Traj Nibber, and Prasanth K Chelikani. 2017. "Whey Protein Components-Lactalbumin and Lactoferrin-Improve Energy Balance and Metabolism." *Scientific Reports* 7 (1): 1–14.
- Zhang, Jian, Baosheng Fu, Xiangjian Zhang, Linyu Chen, Lan Zhang, Xumeng Zhao, Xue Bai, Chunhua Zhu, Lili Cui, and Lina Wang. 2013. "Neuroprotective Effect of Bicyclol in Rat Ischemic Stroke: Down-Regulates TLR4, TLR9, TRAF6, NF-KB, MMP-9 and up-Regulates Claudin-5 Expression." *Brain Research* 1528: 80–88.
- Zhao, Dong Rui, Yun Song Jiang, Jin Yuan Sun, He He Li, Xiao Tao Sun, and Mou Ming Zhao. 2019. "Amelioration of 4-Methylguaiacol on LPS-Induced Inflammation in THP-1 Cells through NF-KB/IkBa/AP-1 and Nrf2/HO-1 Signaling Pathway." *Journal of Functional Foods* 55: 95–103.
- Zhao, Dongrui, Yunsong Jiang, Jinyuan Sun, Hehe Li, Mingquan Huang, Xiaotao Sun, and Mouming Zhao. 2019. "Elucidation of the Anti-inflammatory Effect of Vanillin in LPS-activated THP-1 Cells." *Journal of Food Science* 84 (7): 1920–28.
- Zhao, Lisha, Suzanne M Budge, Abdel E Ghaly, Marianne S Brooks, and Deepika Dave. 2011. "Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review." *J. Food Process. Technol* 2 (6): 1.
- Zulueta, Ana, Maria J Esteve, and Ana Frigola. 2009. "ORAC and TEAC Assays Comparison to Measure the Antioxidant Capacity of Food Products." *Food Chemistry* 114 (1): 310–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.
- Zydney, Andrew L. 1998. "Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation." *International Dairy Journal* 8 (3): 243–50.