

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
&

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΟΝΟΥ

ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ

Εξεταστική επιτροπή:

Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια
Μασούρας Θ. Επικ. Καθηγητής
Καμιναρίδης Στ. Καθηγητής

Αθήνα, Μάιος 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
&

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΟΝΟΥ

ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ

Εξεταστική επιτροπή:

Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια
Μασούρας Θ. Επικ. Καθηγητής
Καμιναρίδης Στ. Καθηγητής

Αθήνα, Μάιος 2011

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ,

- ✓ Τον καθηγητή, κ. Μασούρα Θεοφύλακτο, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, για την αξιοποίηση της ιδέας μου, να ερευνηθεί το γάλα της όνου και για την συμβολή του στη δόμηση της μελέτης.
- ✓ Τους καθηγητές, κ. Ξυλούρη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων – Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών και τον κ. Καμινारीδη Στυλιανό, Καθηγητή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας – Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, για τις σημαντικές υποδείξεις τους στο περιεχόμενο της μελέτης και για τις ουσιαστικές γνώσεις που μου μετέδωσαν σε όλη τη διάρκεια παρακολούθησης του μεταπτυχιακού προγράμματος.
- ✓ Την κ. Ευγενία Μανωλοπούλου, Ε.Ε.ΔΙ.Π. του τμήματος Γαλακτοκομίας, για τις σημαντικές υποδείξεις της και τη βοήθειά της, στη διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων.
- ✓ Τον κ. Εμμανουήλ Λιανδρή, επιστημονικό συνεργάτη του τμήματος Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, για τη ουσιαστική βοήθειά του στη διεξαγωγή των μικροβιακών αναλύσεων.
- ✓ Την κ. Τάκα Στέλλα, υποψήφια Διδάκτορα, του τμήματος Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, για τη σημαντική βοήθειά της στη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης.

Ευχαριστώ θερμά,

- ✓ Τον ονοτρόφο κ. Σπύρο Οικονόμου, για την άμεση ανταπόκρισή και προσφορά των δειγμάτων γάλακτος, στη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς η συμβολή του ήταν καθοριστικής σημασίας,
- ✓ Τους γονείς μου για την ουσιαστική συμβολή τους, στην παρακολούθησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα,
- ✓ Τις συμφοιτήτριές μου, Μαρία Γιακουμέλου, Σωσάνα Μπούρμπου, Ευρυδίκη Οικονόμου, Έλλη Παναγοπούλου, Μαρία Παντελή και Νάντια Παπαστάθη για την άψογη συνεργασία και συμπαράστασή τους.

Αφιερώνεται...

*στους γονείς μου,
Τρύφων και Αφροδίτη.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	1
B	Abstract	2
Γ	Θεωρητικό μέρος	3
1	Εισαγωγή Καταγωγή Χρησιμότητα Σημερινή κατάσταση	3
1.1	Φυλές όνων	4
1.2	Ο πληθυσμός των όνων στην Ελλάδα	8
1.2.1	Εκτροφή όνων	9
2	Εκτροφή όνου	10
2.1	Αναπαραγωγή	10
2.2	Κυοφορία - Γαλακτοπαραγωγή	10
2.3	Διατροφή	11
3	Το γάλα της όνου	13
3.1.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου Πρωτεΐνες Λιπος – Λακτόζη – Μέταλλα	13 13 14
3.1.2	Λυσοζύμη γάλακτος όνου	15
3.1.2.1	Γενικά στοιχεία για τη λυσοζύμη	15
3.1.2.2	Η παρουσία της λυσοζύμης στο γάλα της όνου	17
3.2	Η χρησιμοποίηση του γάλακτος όνου στη διατροφή αλλεργικών ατόμων	19
3.2.1	Σύνδρομο Πρωτεϊνικής Αλλεργίας Αγελαδινού Γάλακτος - CMPA	19
3.3	Θετική επίδραση του γαϊδουρινού γάλακτος στην υγεία του ανθρώπου	20
3.4	Μικροβιολογία γάλακτος όνου	20
Δ	Πειραματικό μέρος	22
1	Σχεδιασμός πειράματος	22
1.1	Προσδιορισμός της χημικής σύστασης του γάλακτος όνου	23
1.2	Προσδιορισμός μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του γάλακτος όνου	23
1.3	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου	29
1.3.1	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα	29
1.3.2	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε γάλα όνου ως θρεπτικό υπ.	30
1.4	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου	32

A/A	Τίτλος	Σελίδα
1.4.1	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη μέθοδο lysoplate	32
1.4.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη φασματοσκοπική μέθοδο	32
1.5	Ποιοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης του γάλακτος όνου	33
1.5.1	Έλεγχος της δράσης της λυσοζύμης γάλακτος όνου με τη μέθοδο του Delvotest	33
1.5.2	Εφαρμογή SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης	34
E	Αποτελέσματα - Σχολιασμός	36
1.1	Προσδιορισμός της χημικής σύστασης του γάλακτος όνου	36
1.2	Προσδιορισμός μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του γάλακτος όνου	39
1.3	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου	42
1.3.1	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα	42
1.3.2	Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε γάλα όνου ως θρεπτικό υπόστρωμα	43
1.4	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου	43
1.4.1	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη μέθοδο lysoplate	43
1.4.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη φασματοσκοπική μέθοδο	47
1.5	Ποιοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης του γάλακτος όνου	49
1.5.1	Έλεγχος της δράσης της λυσοζύμης γάλακτος όνου με τη μέθοδο του Delvotest	50
1.5.2	Εφαρμογή SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης	50
E	Συμπεράσματα	53
	Παράρτημα	56
ΣΤ	Βιβλιογραφία	59

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΟΝΟΥ

ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ

*Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων – Τμήμα Επιστήμης Ζωικής
Παραγωγής και Υδατοκ/γείων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα,
11855, email: efxil@aua.gr*

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η διερεύνηση ορισμένων χαρακτηριστικών του γάλακτος της όνου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η μικροβιακή κατάσταση του γάλακτος, η αντιμικροβιακή του ιδιότητα λόγω της παρουσίας και των ιδιοτήτων του ενζύμου της λυσοζύμης.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος, συλλέχθηκαν δείγματα γάλακτος από έξι όνους, που ανήκουν στην Κυπραϊκή και την Αρκαδική φυλή. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες σε διάστημα τριών μηνών (Νοέμβριος – Φεβρουάριος).

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις σε κάθε σειρά δειγματοληψιών και συγκεκριμένα μελετήθηκε ο πληθυσμός δέκα διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών. Επίσης, προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου. Ακόμη, μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση του νωπού γάλακτος όνου κατά την ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της λυσοζύμης, με την εφαρμογή των μεθόδων lysoplate και νεφελομετρίας, ενώ εφαρμόστηκε SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση για τον ποιοτικό προσδιορισμό της λυσοζύμης στα δείγματα γάλακτος.

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, έδωσαν χαμηλό μικροβιακό πληθυσμό, σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών σε σχέση με αντίστοιχα αποτελέσματα στο νωπό, αγελαδινό γάλα, που κυμάνθηκε από $0,22 \pm 0,2 \log \text{ cfu/ml}$ έως $2,71 \pm 0,5 \log \text{ cfu/ml}$. Επίσης, το γάλα της όνου, δεν παρουσίασε παρεμποδιστική δράση, ενάντια στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων παθογόνων βακτηρίων. Τέλος, κατά την εφαρμογή της μεθόδου lysoplate, η συγκέντρωση της λυσοζύμης προσδιορίστηκε ότι κυμαίνεται από $8.620-11.160 \text{ mg/l}$, ενώ κατά τη φασματοσκοπική μέθοδο η συγκέντρωση ήταν 3.000 mg/l . Επίσης, εφαρμόστηκε SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση κατά την οποία διαπιστώθηκε η παρουσία της λυσοζύμης στο γάλα όνου και προσδιορίστηκε το μοριακό της βάρος.

Λέξεις κλειδιά: γάλα γαϊδούρας, μικροβιολογία γαϊδουρινού γάλακτος, λυσοζύμη γαϊδουρινού γάλακτος

DONKEY'S MILK PRODUCTION AND CHARACTERISTICS

THEODOSIOU IOANNA-ANGELIKI

Department of Food Science and Technology – Department of Animal Breeding and Husbandry – Faculty of Dairy Science, Agricultural University of Athens, Iera odos 75, 11855, email: efxil@aua.gr

Abstract

Aim was to investigate the donkey's milk characteristics, such as the composition of milk, the antimicrobial activity due to the presence of lysozyme and the concentration of donkey's milk lysozyme.

Four sampling have been done from six Cypriote and Arcadic donkeys, from November to February, in a farm, located in Argolida. The samples were collected in sterile bottles and were transmitted to the laboratory, in an ice box.

At first, it has been determined, the composition of donkey's milk samples, spectrometrically. Then, the samples were examined for the presence of ten different categories of microorganisms which can contaminate foods. The microorganisms that were investigated are total bacteria, lactic acid bacteria, genus of Lactococci, Enterococci, Psychrotrophic bacteria, genus of Micrococci, coliforms, yeasts and moulds, thermophilic bacteria and *Bacillus cereus*. Also, it has been investigated, the antibacterial activity of donkey's milk against some pathogenic bacteria, such as, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *E. coli* 0157. In the end of the experiment, for the determination of donkey's milk lysozyme, it have been applied two methods, the lysoplate and spectrometric. It has also been applied in the milk samples, SDS – PAGE gel electrophoresis.

The results were very low for the number of microorganisms in donkey's raw milk, since the number of bacteria in cow's milk has been reported much higher. Also, it has not been demonstrated, in this study, any antibacterial activity of donkey's milk against the examined pathogenic bacteria. The concentration of donkey's milk lysozyme has been determined and also its molecular weight.

Key words: donkey's milk, antibacterial activity of donkey's milk, donkey's milk lysozyme.

1. Εισαγωγή

Ο γάιδαρος ονομάζεται αλλιώς και γαϊδούρι ή όνος (στα αρχαία ελληνικά). Στα αγγλικά, το αρσενικό γαϊδούρι καλείται jack, το θηλυκό jenny και ο απόγονος, μικρότερος του ενός χρόνου, καλείται foal. Η διασταύρωση αρσενικού όνου με φορβάδα δίνει τον ημίονο, δηλαδή το μουλάρι, το οποίο είναι στείρο ζώο, ενώ η διασταύρωση επιβήτορα με γαϊδούρα δίνει το γήνο (ή γαϊδουρομούλαρο).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επιστημονική ταξινόμηση του γαϊδουριού.

Βασίλειο	Animalia
Φύλλο	Chordata
Κλάση	Mammalia
Τάξη	Perissodaktyla
Οικογένεια	Equidae
Γένος	Equus
Είδος	asinus

Όπως αναφέρεται στον πίνακα, ο γάιδαρος είναι θηλαστικό ζώο (κλάση Mammalia), μεγαλόσωμο φυτοφάγο, με περιττό αριθμό δακτύλων στις οπλές (τάξη Perissodaktyla) και ανήκει στην οικογένεια των ιπποειδών και στο ίδιο γένος με το άλογο, τον ημίονο (μουλάρι) και τη ζέβρα.

Η μορφολογία του ποικίλει από φυλή σε φυλή. Το ύψος ακρωμίου των οικόσιτων ζώων κυμαίνεται από 90-150 εκατοστά, ενώ οι χρωματισμοί του τριχώματος του είναι μαύρο, σκούρο καφέ, γκρι με κάποια λευκά σημεία. Τέλος, η διάρκεια ζωής τους μπορεί να φτάσει τα 30-50 έτη.

Καταγωγή

Ο όνος ανήκει στο υποείδος *Equus africanus asinus* και προέρχεται από τον άγριο αφρικανικό όνο, ο οποίος, γεωγραφικά, εντοπίζεται για πρώτη φορά στις χώρες Αιθιοπία και Σομαλία και κατοικιδιοποιήθηκε γύρω στο 4000 π.Χ. Στις χώρες αυτές, όπως και στην Αίγυπτο, ο όνος χρησιμοποιούνταν ως ζώο μεταφοράς φορτίου, καθώς μπορεί να μεταφέρει το 20-30% του σωματικού του βάρους.

Μετάπειτα, ο όνος, εξαπλώθηκε και στις χώρες τις Μέσης Ανατολής, αρχικά στη Συρία και το Ισραήλ, ενώ έφτασε στη Ρώμη και την αρχαία Ελλάδα. Τέλος, μεταφέρθηκε και στην Αμερική, όπου στο νότιο τμήμα της, καθώς και σε άλλες

αναπτυσσόμενες περιοχές του πλανήτη, χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα ως ζώο εργασίας, είτε σε αγροτικές δουλειές, είτε στη μεταφορά των ανθρώπων με τη χρήση αμαξιών.

Χρησιμότητα

Οι όνοι χρησιμοποιούνται ανά τον κόσμο σε διάφορες περιπτώσεις, όπως ως ζώα – φύλακες σε εκτροφές μικρών μηρυκαστικών (πρόβατα, αίγες, λάμα), ως ζώα συντροφιάς ανθρώπων, ως ζώα εκπαίδευσης μοσχαριών και πουλαριών, ως ζώα εργασίας στη μεταφορά φορτίο, άμαξας, και τέλος χρησιμοποιούνται και για ιππασία. (Pugh D. G., 2002). Στις αναπτυγμένες χώρες έχουν χάσει τη χρησιμότητά τους ως ζώα γενικών καθηκόντων και εργασιών και το γεγονός αυτό απειλή την ύπαρξή τους (Ivanovic et al., 2009).

Σημερινή κατάσταση

Ο πληθυσμός των όνων ανά τον κόσμο, είναι 44 εκατομμύρια ζώα, με κύριες χώρες, την Κίνα, το Πακιστάν, την Αιθιοπία και το Μεξικό. Στον Πίνακα 1.1, παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανομή πληθυσμού των όνων.

Πίνακας 1.1 Κατανομή πληθυσμού όνων σε παγκόσμιο επίπεδο (πηγή: FAO, 2006).

<i>Περιοχή</i>	<i>Πληθυσμός %</i>	<i>Φυλές</i>
Αφρική	26,9	26
Ασία - Ειρηνικός	37,6	32
Ευρώπη - Καύκασος	3,7	51
Λατ. Αμερική - Καραϊβική	19,9	24
Μέση Ανατολή	11,8	47
Βορ. Αμερική	0,1	5

1.1 ΦΥΛΕΣ ΟΝΩΝ

Ανάλογα με το ύψος ακρωμίου, υπάρχουν πέντε τύποι όνων. Ο τύπος της Μεσογειακής μικρόσωμης φυλής με ύψος 90 εκατοστά, γνωστή ως Miniature Mediterranean, ο τύπος Standard με ύψος από 90-120 εκατοστά, ο τύπος, Large Standard από 120-140 εκατοστά και τέλος το Mammoth Stock, με ύψος από 140 εκατοστά και επάνω.

Οι φυλές που είναι περισσότερο γνωστές ανά τον κόσμο και εντοπίζονται κυρίως στην Ευρώπη, είναι οι εξής:

- **Mammoth donkey**: Αποτελεί την πιο μεγαλόσωμη φυλή όνων που υπάρχει, παγκοσμίως, με το ύψος ακρωμίου να φτάνει τα 150-160 εκατοστά για το

θηλυκό και το αρσενικό, αντίστοιχα. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στο χρωματισμό του τριχώματός τους και μπορεί να έχουν είτε καφέ σκούρο χρωματισμό, είτε ανοιχτόχρωμο καφέ με σχεδόν λευκό κεφάλι και άκρα. Η φυλή προέκυψε από τη διασταύρωση των ευρωπαϊκών φυλών (Maltese, Poitou, Andalusian και Catalanian) με την αμερικάνικη και μεξικάνικη φυλή, Burros (ισπανικές φυλές που μεταφέρθηκαν στη Νότια Αμερική). Επίσης, τα συγκεκριμένα ζώα, λόγω του μεγάλου ύψους τους αλλά και της ηρεμίας τους, καθώς είναι λιγότερο νευρικά από τα άλογα, μπορούν με ευκολία να ιππευθούν και μάλιστα, πολλές φορές έχουν αντικαταστήσει το άλογο, για αρχάριους και με κινητικές δυσκολίες, ιππείς. Σήμερα, εντοπίζονται κυρίως στην Αμερική και τη Νέα Ζηλανδία. Πρόκειται, για σπάνια φυλή που απειλείται με εξαφάνιση.

Εικόνα 1.1 Γαϊδούρι της φυλής Mammoth Donkey.



- **Poitou donkey**: Η προέλευση της φυλής, είναι από την περιοχή Poitou της Γαλλίας. Χαρακτηρίζεται από ασυνήθιστα εξωτερικά στοιχεία, όπως το πυκνό και μακρύ τρίχωμά της, του οποίου το μήκος δε συναντάται σε άλλη φυλή. Το χρώμα του είναι σκούρο καφέ ή μαύρο, με λευκούς κύκλους στα μάτια και λευκό ρύγχος. Το ύψος ακρωμίου κυμαίνεται από 1,35-1,50 εκατοστά και συγκαταλέγεται στις μεγαλόσωμες ευρωπαϊκές φυλές. Επίσης, έχει αναγνωριστεί, ως η παλαιότερη φυλή της Ευρώπης. Τέλος, πρόκειται για την πιο σπάνια και λιγότερο γνωστή φυλή, που απειλείται με εξαφάνιση.

Εικόνα 1.2 Φυλή Poitou



Εικόνα 1.3 Φυλή Abyssinian donkey.



provided by Dr Alberto Zorloni

- **Abyssinian donkey:** Για τη συγκεκριμένη φυλή, υπάρχουν ελάχιστες ανάλογες πληροφορίες. Τα μόνα στοιχεία δίνουν ως περιοχή προέλευσης, την Αιθιοπία και ότι ο χρωματισμός τους, είναι γκρι με μαύρο σταυρό στη ράχη. Το χαρακτηριστικό αυτό εκδηλώνει και τη συγγένεια στο είδος, με τη ζέβρα.

- **Andalusian donkey:** Προέρχεται από την Κόρντομπα, στην Ανδαλουσία της Ισπανίας. Το ύψος των αρσενικών, φτάνει τα 160 εκατοστά. Έχει μικρού μήκους τρίχωμα και ο χρωματισμός του είναι μαύρος, με γκρι έως λευκά σημεία. Θεωρείται φυλή εξοικειωμένη στην έλλειψη νερού και υψηλής θερμοκρασίας. Επίσης, πρόκειται για δυνατά, ανθεκτικά, υπάκουα και ήρεμα ζώα. Η φυλή εμφανίστηκε, πριν 3000 χρόνια, ενώ σήμερα απειλείται με εξαφάνιση.

Εικόνα 1.4 Φυλή Andalusian donkey.



- **Catalan Donkey:** Η συγκεκριμένη φυλή κατάγεται από την Καταλονία, που βρίσκεται βορειοανατολικά, στην Ισπανία. Το ύψος των ζώων της φυλής είναι περίπου 150 εκατοστά και ζυγίζουν πάνω από 500 κιλά. Έχουν μαύρο-σκούρο καφέ τρίχωμα, με λευκά σημεία στο ρύγχος, τα μάτια και την κοιλιά. Χαρακτηρίζεται ως η καλύτερη φυλή γαϊδουριών, του κόσμου, για τη μεταφορά αμαξιών και φορτίων. Ο πληθυσμός της σήμερα, φτάνει τα 500 ζώα και θεωρείται φυλή, που τείνει προς εξαφάνιση.

Εικόνα 1.5 Φυλή Catalan Donkey.



- **Αρκαδικός όνος:** Πρόκειται για φυλή με καταγωγή από την Ελλάδα και σύμφωνα με το όνομά της, από την Αρκαδία. Είναι μικρόσωμη φυλή, με ύψος περίπου 90 εκατοστά. Έχει γκρι χρωματισμό, με χαρακτηριστικό μαύρο σταυρό στην ράχη. Στην Ελλάδα δεν υπάρχει μέριμνα για τη διατήρηση της **καθαρότητας της φυλής**. Γίνονται αλόγιστες διασταυρώσεις, με αποτέλεσμα, την πλήρη αλλοίωση των χαρακτηριστικών του αρκαδικού όνου.

- **Κυπραίικος όνος:** Προέρχεται από την Κύπρο. Ανήκει στον τύπο των μεγαλόσωμων ζώων (Mammoth Stock) με ύψος, 150 εκατοστά. Ο χρωματισμός τους είναι όμοιος με την καταλονική φυλή.

1.2 Ο πληθυσμός των όνων στην Ελλάδα

Το 1955, ο πληθυσμός των όνων στην Ελλάδα, ήταν 508.000 ζώα. Το 1995, ο πληθυσμός τους κατήλθε στις 95.000 και το 2005 στις 20.400 ζώα. Η μείωση που σημειώθηκε, ήταν της τάξης του 96%! Στη συνέχεια, το 2006, ο πληθυσμός τους ήταν 18,173 και το 2008 16.000. Σήμερα, εκτιμάται ότι το νούμερο αυτό έχει φτάσει κάτω από τις 13.000.

Το 42,5% του πληθυσμού των όνων στην Ελλάδα, βρίσκεται στην Πελοπόννησο, ενώ το υπόλοιπο εντοπίζεται σε όλη την Ελλάδα και κυρίως στα νησιά όπως την Κρήτη, Σαντορίνη, Ύδρα, Σπέτσες, Κώ, Πάτμο, Λέρο, Ρόδο, Κέρκυρα (υπάρχει και καταφύγιο όνων), Κεφαλλονιά, Ζάκυνθο, Λευκάδα, Σκύρο, καθώς και στην ηπειρωτική Ελλάδα, όπως σε Θεσσαλία, Έβρο και Θεσσαλονίκη. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται ο πληθυσμός των όνων σε κάθε περιοχή της Ελλάδας.

Πίνακας 1.2 Κατανομή πληθυσμού όνων στην Ελλάδα (πηγή: ΥΑΑΤ).

Περιοχή	Πληθυσμός ζώων
Θράκη	852
Μακεδονία	1.725
Θεσσαλία	801
Ήπειρος	1.138
Στερεά Ελλάδα	1.921
Πελοπόννησος	4.436
Νησιά Αιγαίου	1.735
Κρήτη	1.676
Νησιά Ιονίου	286
Σύνολο	14.570

Η τεχνολογική εξέλιξη στον τομέα της γεωργίας, οδήγησε στην απαξίωση των γαϊδουριών, όπου πλέον χρησιμοποιούνται κυρίως για τουριστικούς λόγους, στα διάφορα νησιά. Βέβαια, υπάρχουν και ορισμένοι άνθρωποι μεγαλύτερης ηλικίας, που διαμένουν σε απομακρυσμένα μέρη, οι οποίοι, χρησιμοποιούν τα γαϊδούρια για τις μετακινήσεις τους και τις αγροτικές τους δουλειές, μέχρι σήμερα.

Παλαιότερα, η παρουσία των γαϊδουριών, βοήθησε χαρακτηριστικά στην οικονομική και πολιτιστική εξέλιξη των διαφόρων περιοχών της χώρας. Οι οικογένειες που είχαν ως οικόσιτο ζώο τον όνο, έχαιραν ιδιαίτερης αποδοχής στην

τοπική κοινωνία, καθώς η κατοχή αλόγου και όνου, προσέδιδε κύρος στην οικογένεια.

1.2.1 Εκτροφή όνων

Στην Ελλάδα, η συστηματική εκτροφή όνων, βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, καθώς ο αριθμός τους δεν ξεπερνά τους πέντε εκτροφείς. Ο προσανατολισμός των εκτροφών είναι κυρίως, γαλακτοπαραγωγικός. Οι εκτροφές βρίσκονται σε διάφορα σημεία ανά την Ελλάδα, όπως στις Σέρρες, την Καρδίτσα, την Έδεσσα, το Άργος. Η δυναμικότητα τους αφορά κατά μέσο όρο τα 30 ζώα.

Οι εξοπλισμοί των μονάδων είναι περιορισμένοι, χωρίς τη χρήση ειδικής τεχνολογίας, καθώς οι αμέλξεις γίνονται χειρωνακτικά. Η χρήση αμελκτικών συστημάτων, τα οποία υπάρχουν στην Ευρώπη, δεν έχει επεκταθεί και στη χώρα μας ακόμα, λόγω του μικρού αριθμού των εκτροφών, αλλά και λόγω του κόστους των μηχανημάτων. Η στέγαση των ζώων γίνεται σε υπόστεγα, χωρίς την αναγκαιότητα βαριών κατασκευών, καθώς πρόκειται για ανθεκτικά ζώα, στις διάφορες ακραίες θερμοκρασίες. Η εκτροφή του όνου θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και βιολογική, καθώς, δεν υπάρχει κάποια μορφή εντατικότητας και δεν γίνονται ιδιαίτεροι χειρισμοί.

Οι Έλληνες παραγωγοί γάλακτος όνου, αντιμετωπίζουν σοβαρά προβλήματα στη διάθεση του προϊόντος και γενικά στη διαχείρισή του, καθώς η αγροτική πολιτική που ακολουθείται για αυτό το προϊόν, δεν ευνοεί την προώθησή του και την καθοδήγηση των παραγωγών. Το προϊόν διατίθεται κυρίως σε εμπόρους για την παραγωγή καλλυντικών, τα οποία προωθούνται στην εγχώρια αγορά. Το φρέσκο γάλα, μένει αδιάθετο και συνεπώς καταψύχεται και προωθείται για άλλες χρήσεις, καθώς δεν υπάρχει ζήτηση για κατανάλωσή του. Το γάλα όνου δεν εμπίπτει στις καταναλωτικές συνήθειες του κοινού, καθώς δεν έχει προωθηθεί, σε καμία περίπτωση.

Η ημερησία παραγωγή γάλακτος, κατά μέσο όρο, είναι 12 λίτρα και η τιμή που πετυχαίνουν κυμαίνεται στα 12-25 ευρώ ανά λίτρο γάλακτος.

Στην Ευρώπη, η εκτροφή των όνων είναι περισσότερο οργανωμένη, με τις διάφορες μονάδες να είναι εξοπλισμένες με αμελκτικά μηχανήματα και καλύτερο σύστημα διάθεσης του προϊόντος. Βέβαια, η γαλακτοπαραγωγική εκτροφή όνων, δεν έχει ευρέως εξαπλωθεί ούτε ανά την Ευρώπη. Υπάρχουν εκτροφές στην Ιταλία, τη Γαλλία και τη Γιουγκοσλαβία, την Ουγγαρία, την Κροατία και την Ολλανδία. Εκτός Ευρώπης, η Κίνα βρίσκεται ανάμεσα στις χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος, καθώς και τον μεγαλύτερο πληθυσμό ζώων, που φτάνει τα 8 εκατομμύρια (Guo *et al.*, 2007) και ακολουθείται από το Πακιστάν και την Αιθιοπία (FAO, 2005), ενώ όνοι εκτρέφονται για παραγωγή γάλακτος και στη Μογγολία, Καζακστάν, Κιργιστάν και Τατζικιστάν (Uniacke – Lowe T. *et al.*, 2010). Δύο πολύ γνωστές

εκτροφές, με δυναμικότητα 100 ζώων, βρίσκονται στο Βέλγιο και τη Σερβία, όπου και εκεί, η κύρια χρήση του είναι στην παρασκευή καλλυντικών, αλλά στο Βέλγιο καταναλώνεται επίσης, ως φρέσκο γάλα και χρησιμοποιείται και στη ζαχαροπλαστική. Επίσης, γίνονται προσπάθειες και για την παραγωγή τυριού, το οποίο, λόγω της απαίτησης μεγάλης ποσότητας γάλακτος, έχει υψηλό κόστος πώλησης.

2. ΕΚΤΡΟΦΗ ΟΝΟΥ

2.1 Αναπαραγωγή

Το αναπαραγωγικό σύστημα της γαϊδούρας, παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με εκείνο της φορβάδας. Το ζώο, ολοκληρώνει την περίοδο ενήβωσης κατά το πρώτο και δεύτερο έτος της ζωής του. Έχει παρατηρηθεί ότι, οι γαϊδούρες εμφανίζουν μικρότερη εποχικότητα, σε σχέση με τις φοράδες, ενώ τα ιπποειδή χαρακτηρίζονται ως εποχικά πολύοιστρα ζώα. Επίσης, έχουν καταγραφεί σε εκτροφές όνων, μακράς διάρκειας οίστροι, χαμηλότερα ποσοστά ωοθυλακιορρηξιών κατά τη διάρκεια του μήνα Δεκεμβρίου, βραχείας διάρκειας οιστρικοί κύκλοι από το Μάιο μέχρι το Σεπτέμβριο και βραχείς οίστροι από το Μάιο μέχρι και τον Οκτώβριο.

Ο οιστρικός κύκλος της γαϊδούρας έχει παρατηρηθεί ότι κυμαίνεται από 20-40 ημέρες. Συνήθως, διαρκεί 23-30 ημέρες. Ο οίστρος διαρκεί 6-9 ημέρες και η ωοθυλακιορρηξία 5-6 ημέρες, μετά την έναρξη του οίστρου.

Κατά τη φάση του οίστρου, η συμπεριφορά της γαϊδούρας έχει τα εξής χαρακτηριστικά: άνοιγμα και κλείσιμο του στόματος με εκτεταμένο το λαιμό, μάσηση με έντονη σιαλόρροια, κλείσιμο ματιών, ούρηση και σήκωμα της ουράς.

Στη φυλή Mammoth, είναι πιθανό να παρατηρηθούν περισσότερες ωοθυλακιορρηξίες από τις γαϊδούρες τύπου Standard και οι ομοιότητες αυτές μπορεί να παρατηρηθούν και στις φοράδες.

2.2 Κυοφορία - Γαλακτοπαραγωγή

Η περίοδος κυοφορίας διαρκεί 372-374 ημέρες (Pugh D.G.,2002). Η γαϊδούρα γεννά κυρίως ένα πουλάρι, ενώ σπάνιες είναι οι πολύδυμες κυήσεις. Μετά τον τοκετό, σε 9-10 ημέρες παρουσιάζει νέα φάση οίστρου, αλλά λόγω της φροντίδας του πουλαριού, απωθεί το αρσενικό. Μετά από 2-3 οιστρικούς κύκλους δέχεται ξανά επίβαση.

Το πουλάρι λαμβάνει γάλα, μέχρι τους 4-6 πρώτους μήνες της ζωής του. Μετά από το συγκεκριμένο διάστημα, αρχίζει σταδιακά η φάση του απογαλακτισμού, η οποία δεν ενδείκνυται να ξεκινήσει, πριν τους 3 μήνες.

Η γαλακτική περίοδος της γαϊδούρας, διαρκεί συνολικά, περίπου 10 μήνες. Το πουλάρι, μετά τους 4-6 μήνες από τη γέννησή του, αρχίζει να λαμβάνει κανονική τροφή, αλλά συνεχίζει να θηλάζει, από τη μητέρα του. Οι εκτροφές των όνων, δεν χαρακτηρίζονται από εντατικότητα, τα ζώα βρίσκονται όλα μαζί, σε ένα περιφραγμένο χώρο, συνεπώς, το πουλάρι μένει όλο το διάστημα της ζωής του μαζί με τη μητέρα του και δεν αποχωρίζονται με τον απογαλακτισμό.

Επειδή, τα τελευταία χρόνια, η κατεύθυνση της συστηματικής εκτροφής των όνων, είναι η παραγωγή γάλακτος, γι' αυτό και έχει μελετηθεί αρκετά, το συγκεκριμένο θέμα. Οι πρωινές αμέλξεις σύμφωνα με τη Salimei (2004), δίνουν μικρότερα ποσοστά γάλακτος από τις απογευματινές και επίσης ο ιδανικός αριθμός αμέλξεων, στη γαϊδούρα είναι τρεις αμέλξεις ανά ημέρα, ανά τρεις ώρες. Η ημερήσια παραγωγή γάλακτος πιθανόν να φτάσει το 1.5 λίτρο. Τα πουλάρια αποχωρίζονται από τη γαϊδούρα, τρεις ώρες πριν την πρώτη άμελξη (Doreau *et al.*, 1991). Στην πράξη, έχει εφαρμοστεί και άλλη μέθοδος άμελξης, από τον Έλληνα παραγωγό Οικονόμου Σπύρο, με τις γαϊδούρες να αποχωρίζονται από τα πουλάρια κατά τη διάρκεια της νύκτας, την ακολουθούμενη ημέρα αμέλγονται και επιστρέφουν στα πουλάρια για να θηλάσουν, μέχρι την επόμενη νύκτα.

Στον Πίνακα 2.2, αναφέρεται η ποσότητα γάλακτος όνου, που παράγεται σε κάθε άμελξη, όπως έχει καταγραφεί από κάποιους συγγραφείς. Συμπεραίνεται ότι, η ποσότητα γάλακτος που έχει καταγραφεί, κυμαίνεται περίπου από 170 – 850 ml γάλακτος ανά άμελξη.

Πίνακας 2.2 Ποσότητα παραγόμενου γάλακτος όνου ανά άμελξη (Salimei and Fantuz, 2010).

Συγγραφείς	Ποσότητα γάλακτος / άμελξη σε ml
Salimei et al., 2000	750
Chiofalo et al., 2004	720
Simoni et al., 2004	810
Salimei et al., 2005	700
Fantuz et al., 2007	650
Guo et al., 2007	320
Giosue et al., 2008	850 (max)
Ivankovic et al., 2009	170 (min)
Alabiso et al., 2009a	580
Alabiso et al., 2009b	650

2.3 Διατροφή

Οι όνοι, αν και έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος με τα άλογα, ωστόσο χρειάζονται λιγότερη ποσότητα τροφής, για την επιβίωσή τους. Οι διατροφικές τους ανάγκες καλύπτονται με την κατανάλωση σιτηρεσίου, το οποίο είναι πτωχό σε συγκέντρωση πρωτεϊνών, με μέγιστο προτιμώμενο ποσοστό 12%. Συνιστάται να αποφεύγεται η διατροφή του όνου με σανό ψυχανθών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Σε περιπτώσεις ζώων, που βρίσκονται σε εγκυμοσύνη, που είναι νεαρά και αναπτύσσονται, που θηλάζουν και κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ενδείκνυται το σιτηρέσιο να αποτελείται από 50% σανό τριφυλλίου ή μηδικής και το υπόλοιπο από χλωρά νομή.

Γενικά, το σιτηρέσιο του όνου μπορεί να περιέχει χλόη λειμώνων, την οποία λαμβάνει το ζώο κατά τη βόσκηση, καθώς και σανός (όχι ψυχανθών). Επίσης, όταν είναι διαθέσιμο, μπορεί να χορηγηθεί και ενσίρωμα, σε μικρό ποσοστό και πάντα σε ισορροπία με το σανό. Η χρήση συμπυκνωμένων ζωοτροφών, είναι σπάνια αναγκαία στον όνο και χορηγείται κυρίως σε περιπτώσεις έγκυων ζώων, που θηλάζουν, ή που βρίσκονται στην ανάπτυξη, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις ζώων που χρησιμοποιούνται για εργασία, μεταφορά κάρων κ.α.. Η περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε θρεπτικά συστατικά, ρυθμίζεται σύμφωνα με τη σωματική κατάσταση του ζώου. Η ποσότητα τροφής που ενδείκνυται να χορηγείται είναι περίπου, 1 κιλό μίγματος σανού και καρπών ανά 50 κιλά σωματικού βάρους.

Οι διατροφικές συνήθειες του όνου, αντιστοιχούν κυρίως σε αναζήτηση τροφής από τα ίδια, δηλαδή έχουν έντονα ανεπτυγμένο αυτό το αίσθημα και πρέπει και ο παραγωγός να έχει στη διάθεση του ζώου, καλής ποιότητας άχυρα κριθαριού και βρώμης, σε ισορροπία με σανό και καρπούς. Η κατανάλωση άχυρου από τον όνο, βελτιώνει την όψη του δέρματος και του τριχώματος.

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας υγείας, είναι η διατήρηση του σωματικού βάρους του όνου. Τα ζώα που προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες τροφής, συσσωρεύουν λίπος στον τράχηλο, την κοιλιακή και οπίσθια περιοχή. Επίσης τα υπέρβαρα ζώα πάσχουν και από χολόλιθους, κατάσταση η οποία επηρεάζει την ευζωία τους. Όπως προαναφέρθηκε, ο όνος προέρχεται από την Αφρική, που σημαίνει ότι το ιδανικό κλίμα στο οποίο αναπτύσσεται, είναι ξηρό και σχεδόν άνυδρο. Συνεπώς, και η ποιότητα τροφής που λαμβάνει σε τέτοιου είδους κλίμα, είναι πτωχή με πολλές ινώδεις ουσίες. Υπό αυτές τις συνθήκες, το ζώο καταναλώνει μικρή ποσότητα τροφής και καλύπτει πλήρως τις διατροφικές του ανάγκες.

Κατά τη εκτροφή του όνου, είναι απαραίτητη η χορήγηση καθαρού και φρέσκου νερού, καθώς δεν καταναλώνει νερό κακής ποιότητας με χώματα ή άλλες ακαθαρσίες και επίσης, νερό που έχουν πει πριν άλλα ζώα. Η ποσότητα που καταναλώνει είναι 10-25 λίτρα, ημερησίως.

3. ΤΟ ΓΑΛΑ ΤΗΣ ΟΝΟΥ

3.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου

Το γάλα αποτελεί υγρό έκκριμα των θηλαστικών, για τη θρέψη των απογόνων τους. Προσφέρει στο νεογέννητο, όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται για την ανάπτυξή του και βοηθά στην ολοκλήρωση των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού. Περιέχει ανοσοσφαιρίνες που έχουν προστατευτική δράση, διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες, βοηθητικά πέψης όπως ένζυμα και ενζυμικούς αναστολείς (που δεσμεύουν ή μεταφέρουν πρωτεΐνες) και αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες (Fox, 2003). Το γάλα, έχει θεμελιώδη θρεπτική σημασία για τα νεογέννητα.

Η σύστασή του γάλακτος όνου και των κυριότερων γαλακτοπαραγωγών ζώων, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

	Νερό%	Πρωτεΐνες%	Λίπος%	Λακτόζη %	Καζεΐνη %	Ενέργεια KJ/kg
Αγελαδινό	87,8	3,2	3,9	4,8	2,75	2983
Αίγιο	88,9	3,1	3,5	4,4	2,4	3399
Πρόβιο	83,0	5,4	6,0	5,1	4,8	5289
Γάλα όνου	91,2	1,72	1,0	6,9	0,38	1939
Ανθρώπινο	87,6	1,64	3,38	6,7	0,4	2855

Τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον που προσανατολίζεται στο γάλα της γαϊδούρας λόγω της σύστασής του, καθώς όπως έχει διαπιστωθεί, βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτή του ανθρώπινου γάλακτος. Η εμφάνιση αλλεργιών, στο αγελαδινό γάλα, από νεαρά άτομα, έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην κατανάλωση γάλακτος γαϊδούρας.

Πρωτεΐνες

Όπως αναφέρεται στον πίνακα, η περιεκτικότητα των ολικών πρωτεϊνών του γάλακτος όνου, είναι χαμηλή (13-28 mg/ml) και πολύ κοντά στην αντίστοιχη του ανθρώπινου γάλακτος. Το πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος όνου, είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες του ορού, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 35-50% του αζωτούχου κλάσματος, ενώ στο αγελαδινό γάλα, αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα το 20% (Heppouin et al., 2000). Επίσης και το ποσοστό της καζεΐνης του γάλακτος όνου, είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με τα άλλα είδη γάλακτος. Συγκεκριμένα, η αναλογία καζεΐνης προς τις πρωτεΐνες του ορού, είναι 52:37 και κυμαίνεται ανάμεσα στα χαμηλότερα όρια για το ανθρώπινο και στα υψηλότερα για το αγελαδινό (Guo et al., 2007). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του γάλακτος όνου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.

Πίνακας 3.1.1 Συγκέντρωση καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού σε g/kg στο γάλα ιπποειδών και αγελάδας (Uniake – Lowe et al., 2010).

Πρωτεΐνη	Ιπποειδή	Αγελάδα
Ολική καζεΐνη	13,56	26,0
α_{s1}- καζεΐνη	2,4	10,0
α_{s2}- καζεΐνη	0,20	2,8
β- καζεΐνη	10,66	8,6
κ- καζεΐνη	0,24	3,1
γ- καζεΐνη	-	0,8
Ολικές πρωτεΐνες ορού	8,3	6,3
β-γαλακτογλοβουλίνη	2,55	3,2
α-λακταλβουμίνη	2,37	1,2
Αλβουμίνη ορού	0,37	0,4
Ανοσοσφαιρίνες	1,63	0,8
Λακτοφερρίνη	0,58	0,10
Λυσοζύμη	0,87	70-130 $\mu\text{g/kg}$
Μέγεθος καζεϊνικού μικκυλίου (nm)	255	182

Από τον Πίνακα 3.1.1, διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση της ολικής καζεΐνης στο γάλα όνου είναι αισθητά χαμηλότερη από του αγελαδινού γάλακτος, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού είναι υψηλότερες. Οι συγκεντρώσεις της α_{s2} και κ - καζεΐνης είναι αρκετά χαμηλές και μάλιστα στην έρευνα της Vincenzetti (2008), οι συγκεκριμένες καζεΐνες δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου, όπως και η γ - καζεΐνη. Επίσης, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της β -γαλακτογλοβουλίνης στο γάλα όνου, βρίσκεται κοντά στην τιμή του αγελαδινού γάλακτος και η συγκέντρωση της α -λακταλβουμίνης είναι υψηλότερη από του αγελαδινού. Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών στο γάλα της όνου, είναι διπλάσια εκείνης του αγελαδινού και η συγκέντρωση της λακτοφερρίνης στο γάλα όνου, είναι επίσης υψηλότερη, ενώ αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα (Nazzaro et al., 2010). Η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γάλα όνου είναι υψηλότερη από του αγελαδινού γάλακτος. Τέλος, ανάμεσα στα δύο είδη γάλακτος, υπάρχει διαφορά και στο μέγεθος του καζεϊνικού μικκυλίου, το οποίο είναι μεγαλύτερο στο γάλα όνου.

Στην έρευνα του Fantuz (Salimei, 2010), καταγράφηκε το ποσοστό των αζωτούχων συστατικών του γάλακτος όνου και αναφέρεται στον Πίνακα 3.1.1.1.

Πίνακας 3.1.1.1 Αζωτούχα συστατικά του γάλακτος όνου.

Πρωτεϊνικό κλάσμα	Μέσοι όροι mg/100g
Ολικό άζωτο-N	241,56-242,05
Μη πρωτεϊνικής φύσης άζωτο – Non Protein Nitrogen NPN	34.33-34.86
Μη καζεϊνικής φύσης άζωτο – Non Casein Nitrogen NCN	135,23-138,00
Αζωτούχος καζεΐνη –N casein	103,48-106,74
Αζωτούχος πρωτεΐνη ορού –N whey protein	103.44-105.01
N casein: N whey protein	0.95-1.03 (ανθρώπινο γάλα: 0,53)

Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι το γαϊδουρινό γάλα, περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις απαραίτητων αμινοξέων (Taha και Kielwein, 1990; Guo *et al.*, 2007) και συγκρινόμενο με το γάλα αγελάδας, φυλής Friesian, βούβαλου, αίγας, προβάτου, καμήλας και φοράδας, περιέχει τα υψηλότερα επίπεδα βαλίνης και λυσίνης (Abd-El-Salam *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 2007). Η βαλίνη και η λυσίνη αποτελούν δυο απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς δεν έχει τη δυνατότητα να τα συνθέσει, συνεπώς πρέπει να λαμβάνονται από την τροφή. Τα ποσοστά οκτώ απαραίτητων αμινοξέων της πρωτεΐνης του γάλακτος όνου, υπολογίσθηκαν σε 38,2% και με βάση αυτή τη θεώρηση, είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά του γάλακτος της φοράδας και της αγελάδας. Επίσης, το γαϊδουρινό γάλα, εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά σερίνης (6,2%), γλουταμικού οξέος (22,8%), αργινίνης (4,6%) και βαλίνης (6,5%) (Guo *et al.*, 2007).

Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες του ορού είναι οι εξής: α- λακταλβουμίνη (1.80 mg/ml), β- γαλακτογλοβουλίνη (3.75 mg/ml – 29,85%) και η λυσοζύμη (1.00 mg/ml) (Fantuz *et al.*, 2001). Οι κυριότερες καζεΐνες είναι η α₁- και β- καζεΐνη ενώ οι γ- και κ- καζεΐνες δεν έχουν ανιχνευτεί (Vincenzetti *et al.*, 2005 Egito *et al.*, 2002). Σύμφωνα με την έρευνα του Guo (2007), η περιεκτικότητα των απαραίτητων αμινοξέων στο γαϊδουρινό γάλα, δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, εκτός από τα επίπεδα ασπαραγίνης και θρεονίνης, τα οποία παρουσίασαν μείωση κατά την ολοκλήρωση της γαλακτικής περιόδου. Η ασπαραγίνη συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ η θρεονίνη δεν συντίθεται οπότε είναι απαραίτητη η πρόσληψή της από την τροφή.

Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης του γαϊδουρινού γάλακτος, έχει παρατηρηθεί από τη Salimei (2004) ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά από τον αριθμό των αμέλξεων, τις συνθήκες εκτροφής και το έτος γαλακτοπαραγωγής. Αντίθετα, επηρεάζεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και συγκεκριμένα, μειώνεται. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η έρευνα του Ivankovic (2009), όπου

παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε πρωτεΐνη, στο τέλος της περιόδου από 1,77 σε 1,41%.

Λίπος – Λακτόζη – Μέταλλα – pH

Η συγκέντρωση του λίπους είναι χαμηλή στο γάλα της όνου (1%), συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος και χαμηλότερη από αυτή του ανθρώπινου γάλακτος. Σύμφωνα με τη Salimei (2004), η συγκέντρωση του λίπους του γάλακτος όνου, δεν επηρεάζεται από τον τύπο εκτροφής και των αριθμό των αμέλξεων, παρ' όλα αυτά, το ποσοστό του παρουσιάζει διακύμανση κατά τη γαλακτοπαραγωγή. Το συμπέρασμα αυτό έχει διατυπωθεί και από τον Guo (2007). Και στις δύο μελέτες διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό λίπους στο γάλα όνου, αρχικά μειώνεται, έπειτα στο μέσο της γαλακτικής περιόδου παρουσιάζει ελαφρά αύξηση και μειώνεται πάλι. Σύμφωνα με τον Guo, το ποσοστό λίπους επηρεάζεται από τη φυλή του ζώου, την περιοχή εγκατάστασης της εκτροφής, τη διαθέσιμη ζωοτροφή, την τεχνική άμελξης, και το διάστημα ανάμεσα στις αμέλξεις.

Το λίπος του γάλακτος όνου αποτελείται από υψηλό ποσοστό κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς και ικανοποιητικά ποσοστά των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων.

Η συγκέντρωση της λακτόζης είναι αρκετά υψηλή στο γάλα του όνου (6,9%) και όπως έχει αναφερθεί από τον ίδιο συγγραφέα, δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες εκτροφής, τη φάση της γαλακτικής περιόδου και το έτος γαλακτοπαραγωγής. Καμία σημαντική επίδραση της γαλακτικής περιόδου, στη συγκέντρωση λακτόζης, διαπιστώθηκε επίσης και στην έρευνα του Ivankovic (2009). Κατά τον Guo (2007), η συγκέντρωση της λακτόζης στο γάλα όνου, παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου γιατί ευθύνεται για το 50% της οσμωτικής πίεσης στο γάλα, η οποία είναι ίση με εκείνη του αίματος. Στη μελέτη του Ivankovic (2009), το ποσοστό της κυμαίνεται από 6,19-6,38%, που επιβεβαιώνει τη διαπίστωση της Salimei. Επίσης, στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό λακτόζης είναι χαμηλό κατά την άνοιξη (6,2%) και υψηλό το καλοκαίρι και το χειμώνα (6,3 και 6,6%).

Τέλος, τα επίπεδα συγκέντρωσης των μετάλλων, στο γάλα του όνου, είναι παρόμοια με αυτά του ανθρώπινου γάλακτος και δεν επηρεάζονται επίσης από τους παραπάνω παράγοντες. Η αξιοσημείωτη διαφορά που εντοπίζεται, είναι στο λόγο ασβεστίου προς φώσφορο (Ca/P), ο οποίος είναι υψηλότερος από αυτόν του ανθρώπινου γάλακτος (Bonomi *et al.*, 1994) και κυμαίνεται μεταξύ 0,93 και 2,37. Η τιμή αυτή βρίσκεται στο κατώτερο όριο, στο αγελαδινό γάλα (Pugliarini *et al.*, 1993). Στον Πίνακα 3.1.2 καταγράφεται η συγκέντρωση των μετάλλων στο γάλα της όνου.

Πίνακας 3.1.2 Συγκέντρωση μετάλλων γάλακτος όνου (Salimei – Fantuz, 2010).

Μέταλλα	Συγκέντρωση mg/kg γάλακτος
Ca	676.7
P	487.0
Ca/P	1.48
K	497.2
Na	218.3
Chloride	336.7
Mg	55.1
Fe	0.93
Cu	0.15
Mn	ίχνη

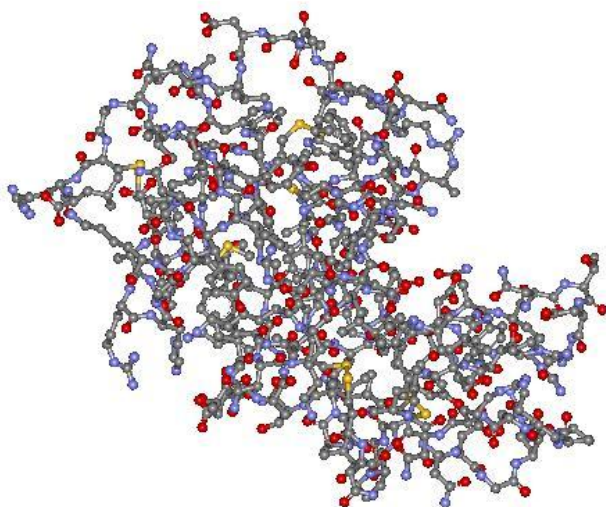
Η τιμή του pH του γάλακτος όνου κυμαίνεται από 6.63-7.60 και δεν έχει παρατηρηθεί κατά τη Salimei (2004), σημαντική αλλαγή στην τιμή της, κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής.

3.1.2 Λυσοζύμη γάλακτος όνου

3.1.2.1 Γενικά στοιχεία για τη λυσοζύμη

Η λυσοζύμη (μουραμιδάση) είναι ένα ένζυμο, που ανήκει στην ομάδα των υδρολασών και ανακαλύφθηκε τυχαία, το 1922, από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ. Πρόκειται για μια σφαιρική πρωτεΐνη, που αποτελείται από 129 αμινοξέα. Αργότερα, το ένζυμο αυτό, εντοπίστηκε σε σωματικές εκκρίσεις όπως τα δάκρυα, τη σίελο και το ανθρώπινο γάλα, σε φυτά και σε άφθονη ποσότητα στο λεύκωμα του αυγού όρνιθας (Rasmusson, 1999). Στην Εικόνα 3.1.2.1, παρουσιάζεται η δομή της λυσοζύμης.

Εικόνα 3.1.2.1 Η δομή της λυσοζύμης. Τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και θείου είναι χρωματισμένα με γκρι, μπλε, κόκκινο και κίτρινο αντίστοιχα.



Τα κυτταρικά τοιχώματα των θετικών κατά Gram βακτηρίων, σχηματίζονται από ένα πολυμερές, την πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη), η οποία αποτελείται από σάκχαρα και αμινοξέα. Συγκεκριμένα, αποτελείται από τους δισακχαρίτες N-ακετυλογλυκοζαμίνη (NAG) και N-ακετυλομουραμικό οξύ (NAM), οι οποίοι συνδέονται με β- 1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Συνεπώς, η NAG και το NAM σε αλληλουχία, σχηματίζουν στην πεπτιδογλυκάνη, μια πολυσακχαρική αλυσίδα.

Η λυσοζύμη, όταν έρθει σε επαφή με το κυτταρικό τοίχωμα Gram (+) βακτηρίου, λόγω της ιδιότητάς της να καταλύει τους γλυκοζιδικούς δεσμούς και να παράγονται επιμέρους, μικρότερα σάκχαρα, καταλύει τους β- 1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των NAG και NAM. Κατά συνέπεια καταστρέφεται το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου.

Η λυσοζύμη χρησιμοποιείται με διάφορους τρόπους στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ στην Ιαπωνία μελετάται με ιδιαίτερα, έντονους ρυθμούς, η χρησιμότητά της. Συνεπώς, λόγω της αντιμικροβιακής της ιδιότητας, χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε μεγάλο εύρος κατηγοριών τροφίμων, όπως τα διάφορα είδη κρεάτων, σε λουκάνικα, ψάρια, λαχανικά, φρούτα, στο κρασί και στη σκόνη γάλακτος. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη των βουτυρικών βακτηρίων, που αλλοιώνουν τα τρόφιμα, καθώς επίσης και ότι συμβάλλουν στην διατήρηση της ποιότητας των τυριών. Η λυσοζύμη, χρησιμοποιείται και στην ιατρική, για την αντιμετώπιση των μικροβιακών μολύνσεων. Ακόμη, χρησιμοποιείται στο διαγνωστικό έλεγχο κάποιων ασθενειών, όπως η νόσος του Crohn, ορισμένοι τύποι λευχαιμίας και σε μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος (Proctor, Cunningham, 1988).

Για τον προσδιορισμό της λυσοζύμης, εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι όπως:

- υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - High Performance Liquid Chromatography – HPLC
- Reversed Phase – HPLC
- χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής – ion-exchange chromatography
- Ηλεκτροφόρηση sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel – SDS-PAGE
- Ισοηλεκτρική εστίαση – Isoelectric focusing IEF
- Lysoplate - Παρεμποδιστική δράση της λυσοζύμης στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Micrococcus lysodeikticus*.
- Φασματοσκοπική μέθοδος με τη χρήση του βακτηρίου *Micrococcus lysodeikticus*.

3.1.2.2 Η παρουσία της λυσοζύμης στο γαϊδουρινό γάλα

Η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γάλα του όνου, έχει αποδειχθεί ότι φτάνει τα 4.000 mg/l (Guo *et al.*, 2007) ενώ, σε άλλη έρευνα έχει αποδειχθεί ότι η τιμή της κυμαίνεται στα 1.000 mg/l (Vincenzetti *et al.*, 2007). Στο ανθρώπινο γάλα, η αντίστοιχη συγκέντρωση κυμαίνεται στα 40-200 mg/l και στο αγελαδινό γάλα είναι 0,09mg/l (Chiavari *et al.*, 2005; Vincenzetti *et al.*, 2008). Το υψηλό επίπεδο λυσοζύμης στο γάλα του όνου, έχει ως αποτέλεσμα, τη θετική επίδραση στη συντήρηση του νοπού γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Zhang *et al.*, 2008). Ωστόσο, έχει καταγραφεί ότι η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γαϊδουρινό γάλα, μειώνεται μετά τον 6ο μήνα της γαλακτικής περιόδου (Salimei *et al.*, 2004; Vincenzetti *et al.*, 2007). Στην έρευνα της Pilla (2010), παρατηρήθηκε επίσης ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της λυσοζύμης στο γάλα της όνου, καταγράφονται τις πρώτες 60 ημέρες από τον τοκετό και έπειτα, η συγκέντρωσή της, από τις 60-120 ημέρες μένει σταθερή και από τις 121-180 ημέρες, μειώνεται. Το επόμενο διάστημα, από τις 180 έως τις 240 ημέρες, η συγκέντρωση της λυσοζύμης αυξάνεται φτάνοντας στα ίδια επίπεδα που καταγράφονται κατά τις 60-180 ημέρες. Επίσης, η λυσοζύμη παίζει τεράστιο ρόλο και στην άμυνα του μαστικού παρεγχύματος της γαϊδούρας. Πράγματι, η μαστίτιδα στις γαϊδούρες είναι πολύ σπάνια και συνήθως ακολουθούν πληγές στις θηλές και ξήρανση τους (Conte *et al.*, 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμπέρασμα, που καταγράφηκε στη μελέτη των Pilla *et al.*, (2010), κατά την οποία, η δράση της λυσοζύμης ήταν ανεξάρτητη από τη βακτηριακή κατάσταση του μαστού. Σε δείγματα γάλακτος που προέρχονταν από μολυσμένους μαστούς, τα ποσοστά λυσοζύμης ήταν παρόμοια με αυτά που προέρχονταν από δείγματα γάλακτος, υγιών μαστών.

Στον Πίνακα 3.1.2.2 καταγράφεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γάλα του ανθρώπου, της φοράδας, της καμήλας και της όνου, όπως έχει προσδιορισθεί.

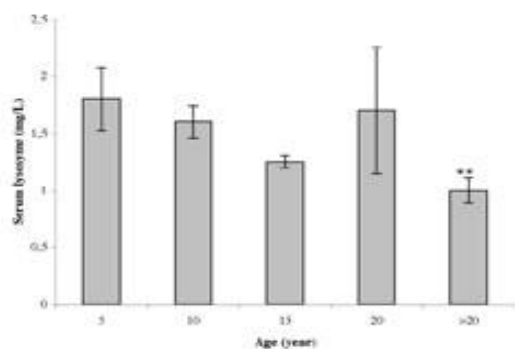
Πίνακας 3.1.2.2 Συγκέντρωση της λυσοζύμης (mg/100ml) στα διάφορα είδη γάλακτος.

Είδη γάλακτος	Συγκέντρωση Λυσοζύμης (mg/100ml)
Ανθρώπινο	10-12
Φορβάδα	79
Καμήλα	0,5
Όνος	84 (150) - 375

Στη μελέτη των Corroia et al. (2002), μεταξύ άλλων διαπιστώθηκε ότι η λυσοζύμη απουσιάζει από το γάλα του όνου, μόνο μετά την θερμική επεξεργασία του στους 121° C για 10 λεπτά.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση της λυσοζύμης στον **ορό του αίματος** του όνου είναι περίπου ίση με $1,86 \pm 0,12$ mg/l και έχει αποδειχθεί ότι η τιμή της διαφέρει, ανάμεσα στις δεκαετίες της ζωής του, σύμφωνα με το Διάγραμμα.1. Ο προσδιορισμός έγινε από τον Sotiron (2004).

Διάγραμμα 1. Διακύμανση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του ορού, στο αίμα του όνου, κατά τη διάρκεια της ζωής του.



3.2 Η χρησιμοποίηση του γάλακτος όνου στη διατροφή αλλεργικών ατόμων

3.2.1 Σύνδρομο Πρωτεϊνικής Αλλεργίας Αγελαδινού Γάλακτος - CMPA

Στον άνθρωπο, το μητρικό γάλα από γυναίκα που είναι υγιής και διατρέφεται σωστά, αποτελεί τον καλύτερο παράγοντα για την κάλυψη των θρεπτικών απαιτήσεων, στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του νεογνού (Donnet – Hughes *et al.*, 2000). Παρ' όλα αυτά, για διάφορους ιατρικούς λόγους, όταν η μητέρα δεν μπορεί να θηλάσει το παιδί της, τότε για τη διατροφή του χρησιμοποιείται υποκατάστατο το μητρικού γάλακτος, το οποίο συνήθως προέρχεται από εμπλουτισμένη σε μέταλλα, σκόνη γάλακτος αγελάδας.

Πρόκειται για νέες φόρμουλες γάλακτος, οι οποίες παρασκευάζονται ως κανονικά θρεπτικά υποκατάστατα του μητρικού γάλακτος και όσο είναι δυνατόν, μιμούνται τα επίπεδα και τους τύπους βιταμινών, μετάλλων και άλλων θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στο ανθρώπινο γάλα. Σε αντίθεση όμως, με την προσπάθεια μίμησης του ανθρώπινου γάλακτος, έχουν εκδηλωθεί αλλεργίες και ατοπικές ασθένειες, σε άτομα που καταναλώνουν αυτά τα υποκατάστατα (Restani *et al.*, 2002).

Το αγελαδινό γάλα χρησιμοποιείται ευρέως, ως υποκατάστατο του μητρικού, αλλά σε αυξημένο αριθμό περιπτώσεων, οδηγεί στην εκδήλωση λανθασμένης ανοσολογικής απάντησης (Criscione *et al.*, 2009). Πρόκειται για το σύνδρομο πρωτεϊνικής αλλεργίας του αγελαδινού γάλακτος και στα αγγλικά είναι γνωστό ως Cow Milk Protein Allergy (C.M.P.A.). Τα περισσότερα νεαρά άτομα, που εμφανίζουν αυτό το σύνδρομο, συνθέτουν την ανοσοσφαιρίνη IgE, ενάντια σε πρωτεϊνικά αντιγόνα (Iacono *et al.*, 1992), όπως τις α-, β- και κ- καζεΐνες και τις β-γαλακτογλοβουλίνη, α- λακταλβουμίνη και λακτοφερρίνη (Teschmacher *et al.*, 1997; Flara – Viloslada *et al.*, 2005). Το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται σε νεαρά άτομα και νεογέννητα, σε ποσοστό 2-5% στις αναπτυγμένες χώρες (Pizzin *et al.*, 2003; Viloslada *et al.*, 2005) και σε ενηλίκους, σε ποσοστό 1% (Smith E., 1997).

Η αλλεργία εκδηλώνεται με την εμφάνιση εκζέματος ή εξανθήματος και με την εκδήλωση εμετού και διάρροιας.

β-γαλακτογλοβουλίνη – αλλεργιογόνος παράγοντας

Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, αποτελούν την πρώτη και πλούσια πηγή πρωτεϊνών, ξένων προς τον οργανισμό του ατόμου, γι' αυτό προκαλούνται αλλεργικές αντιδράσεις, στο ανώριμο πεπτικό τους σύστημα (Sampson, 1999). Η β-γαλακτογλοβουλίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ορού, που βρίσκεται στο αγελαδινό γάλα (Hambling *et al.*, 1992) και θεωρείται ως το κυρίαρχο αλλεργιογόνο

στοιχείο του γάλακτος, για τις αλλεργίες στα νεογνά και τα παιδιά (Carroccio *et al.*, 1999). Η πρωτεΐνη β-γαλακτογλοβουλίνη, δεν υπάρχει στο ανθρώπινο γάλα (Chatterton *et al.*, 2004; De Wit, 1998; Miranda *et al.*, 2004). Επίσης, εκτός από την β-Ig, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα καζεϊνικά κλάσματα του αγελαδινού γάλακτος, είναι εν δυνάμει αλλεργιογόνα (Muraro *et al.*, 2002).

Η συγκέντρωση της β-Ig, στο γάλα της όνου είναι 3,75 mg/ml (Vincenzetti *et al.*, 2007), ενώ στο αγελαδινό γάλα είναι 3,2 g/l. Όπως συμπεραίνεται, δεν υπάρχει διαφορά στη συγκέντρωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ανάμεσα στα δύο είδη γάλακτος. Όμως, παρόλο που η β-γαλακτογλοβουλίνη θεωρείται αλλεργιογόνος ουσία, δεν προκαλεί αλλεργία όταν προσλαμβάνεται μέσω του γάλακτος όνου. Αντίθετα, η β-Ig του αγελαδινού γάλακτος ευθύνεται για την πρόκληση αλλεργιών σε νεαρά και ενήλικα άτομα, λόγω της ανθεκτικότητάς της κατά τη διαδικασία της πέψης στον οργανισμό. Η πεπτικότητα της πρόβειας β-Ig είναι μεγαλύτερη, ενώ δεν έχει μελετηθεί η πεπτικότητα της β-Ig του γάλακτος όνου (Uniake – Lowe *et al.*, 2010). Κατά τον Guo (2007), δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί ο μηχανισμός ανεκτικότητας στο γάλα όνου, ενώ περιέχει σχεδόν ίση ποσότητα β-Ig με το αγελαδινό γάλα. Πιστεύεται ότι, σημαντικό ρόλο σε αυτό το φαινόμενο, παίζει η αναλογία καζεϊνών προς τις πρωτεΐνες ορού, καθώς είναι διαφορετική στο γάλα όνου, σε σχέση με το αγελαδινό γάλα.

Συνεπώς, το γάλα της όνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διατροφή αλλεργικών παιδιών, υποκαθιστώντας το μητρικό γάλα. Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη, που αφορούσε τα πολυαλλεργικά νεαρά άτομα, απέδειξε ότι ενώ το άτομα αυτά λάμβαναν γάλα γαϊδούρας ως υποκατάστατο του ανθρώπινου, παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο ανάστημα και το βάρος τους, σε σχέση με άτομα που δεν λάμβαναν γάλα γαϊδούρας (Monti *et al.*, 2008).

Τα τελευταία χρόνια, μελετώνται και άλλα είδη γάλακτος, εκτός του αγελαδινού, με σκοπό τον εντοπισμό του καλύτερου υποκατάστατου του ανθρώπινου γάλακτος (Businco *et al.*, 2000; Muraro *et al.*, 2002; Restani *et al.*, 2002). Το γάλα του όνου, χρησιμοποιείται επιτυχώς σε κλινικές δοκιμές, σε παιδιά που εμφανίζουν το σύνδρομο CMPA και χαρακτηρίζεται από επαρκή θρεπτικότητα και γευστικότητα (Monti *et al.*, 2007).

3.3 Θετική επίδραση του γαϊδουρινού γάλακτος στην υγεία του ανθρώπου

Πολλές κλινικές μελέτες, έχουν επιβεβαιώσει το ασφαλές του γάλακτος της όνου, στην αντιμετώπιση πολλαπλών διατροφικών δυσανεξιών, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Έχει αποδειχθεί επίσης, η θετική επίδραση του κατά την αντιμετώπιση της υψηλής χοληστερίνης του ανθρώπου μέσω της διατροφής (Dell'

Orto *et al.*, 1993). Ακόμη, ο Wolter (1996) επισημαίνει τη θετική επίδραση του γαϊδουρινού γάλακτος κατά την οστεογένεση, τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης και κατά την ανάρρωση ασθενών με καρδιακά προβλήματα και ασθένειες. Τέλος, οι Pinto και Sportelli (1998), δίνουν έμφαση στην παρεμπόδιση του γήρατος από τη θετική δράση του γαϊδουρινού γάλακτος (Ivankovic *et al.*, 2009).

4. Μικροβιολογία γάλακτος όνου

Το γάλα ως υπόστρωμα, ευνοεί την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών, καθώς περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που δημιουργούν κατάλληλο φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης (White, 2001). Δηλαδή, το γάλα παρέχει ένα φάσμα αμυντικών παραγόντων, μέσω της παρουσίας της λακτοϋπεροξειδάσης, της λακτοφερρίνης, της λυσοζύμης, των ανασογλοβουλινών, και των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία προστατεύουν το γάλα από διαφορετικές μικροβιακές μολύνσεις (Agamy *et al.*, 1992; Benkerroum *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2005). Η συγκέντρωση και η δραστηριότητα κάθε αντιμικροβιακής ουσίας του γάλακτος, παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία ανάμεσα στα διάφορα είδη (Chandan *et al.*, 1965). Το γάλα του όνου, αναφέρεται ότι εμφανίζει πιο ισχυρή παρεμποδιστική δράση, από τα άλλα είδη γάλακτος. Συγκεκριμένα, το επίπεδο της λακτοφερρίνης στο γάλα του όνου είναι διπλάσιο από ότι στο γάλα της αγελάδας (Malacarne *et al.*, 2002). Επίσης, η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γαϊδουρινό γάλα φτάνει τα 4.000 mg/l, ενώ στο αγελαδινό εντοπίζονται μόνο ίχνη λυσοζύμης (Guo *et al.*, 2007; Salimei *et al.* 2004). Γενικά, έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες αλλά και στην παρούσα, ότι το γαϊδουρινό γάλα, φέρει χαμηλό μικροβιακό φορτίο, του οποίου η ολική μεσόφιλη χλωρίδα είναι 10^4 cfu/ml (Chiavari *et al.*, 2005; Coppola *et al.*, 2002) ενώ το ανώτερο επιτρεπτό όριο για το αγελαδινό γάλα είναι τα 10^5 cfu/ml. Το χαμηλό μικροβιακό φορτίο του γάλακτος όνου, θεωρείται ότι οφείλεται στην παρουσία των αντιμικροβιακών ουσιών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Malacarne *et al.*, 2002).

Κατά την Ευρωπαϊκή Κοινοτική νομοθεσία (853/2004), το γάλα της όνου, επιτρέπεται να πωλείται και συγκαταλέγεται στα «άλλα είδη γάλακτος». Λόγω της υγιεινής του, το γαϊδουρινό γάλα καταναλώνεται χωρίς να έχει υποστεί κάποια θερμική επεξεργασία, όπως παστερίωση και την τακτική αυτή ακολουθεί αρκετά μεγάλο ποσοστό των ατόμων που είναι συστηματικοί καταναλωτές του. Το γαϊδουρινό γάλα μπορεί, επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ζυμούμενων ποτών, όπως το κούμης και αυτό γιατί κάποια προβιοτικά στελέχη, οξυγαλακτικών βακτηρίων, επιβιώνουν σε αυτό παρά την παρουσία των αντιμικροβιακών παραγόντων, έπειτα από ζύμωση και αποθήκευση. Η επιβίωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο γάλα, οφείλεται στη χαμηλή μικροβιακή του δράση, λόγω του χαμηλού του φορτίου και στα υψηλά επίπεδα λυσοζύμης (Chiavari *et al.*, 2005). Το γαϊδουρινό γάλα, από τα αρχαία χρόνια πιστεύεται ότι έχει θεραπευτικές ιδιότητες αλλά αυτό δεν έχει ακόμα αποδειχθεί επιστημονικά (Coppola *et al.*, 2002).

Παλαιότερα, το χορηγούσαν σε πολύ αδύναμα-καχεκτικά νεαρά άτομα με σκοπό την θρέψη τους και την επαναφορά τους σε σωστή σωματική κατάσταση.

Έχει διαπιστωθεί, ότι η τεχνική με την οποία γίνεται η άμελξη, χειροκίνητα ή μηχανικά, επηρεάζει το μέσο όρο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας του γάλακτος όνου. Από την έρευνα αρκετών συγγραφέων έχει καταγραφεί η διακύμανση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ και καταγράφεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα του γάλακτος όνου, σε γάλα αμελγόμενο μηχανικά και χειροκίνητα.

Συγγραφείς	Τεχνική άμελξης	Μέσος όρος Ο.Μ.Χ. log cfu/ml
Salimei et al., 2000	Μηχανικά	4.46
Coppola et al., 2002	Μηχανικά	4.60
Conte et al., 2003	Χειροκίνητα	3.66
Conte et al., 2004	Χειροκίνητα	4.21
	Μηχανικά	5.87 (max)
Simoni et al., 2004	Μηχανικά	3.74
Salimei et al., 2004	Μηχανικά	5.51
Salimei et al., 2005	Μηχανικά	4.00
Sorrentino et al., 2005	Μηχανικά	3.95
Salimei et al., 2006	Μηχανικά	3.89
Ivankovic et al., 2009	Χειροκίνητα	3.58 (min)
Alabiso et al., 2009	Χειροκίνητα	3.72

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4, παρατηρείται διακύμανση στο μέσο όρο της Ο.Μ.Χ. κατά την μηχανική άμελξη, χωρίς να υπάρχει συγκεκριμένη τάση μείωσης ή αύξησης του πληθυσμού της. Όμως, κατά την εφαρμογή χειροκίνητης άμελξης στις όνους, καταγράφηκε κατά μέσο όρο μικρότερος μικροβιακός πληθυσμός σε σχέση με την μηχανική άμελξη. Στην αγελάδα, η μηχανική άμελξη προστατεύει το γάλα από επιμολύνσεις με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος και προτιμάται η συγκεκριμένη τεχνική.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός του πειράματος ήταν: Α) Ο προσδιορισμός της σύστασης του γάλακτος όνου και συγκεκριμένα, της συγκέντρωσης του λίπους, των πρωτεϊνών, της λακτόζης, των στερεών άνευ λίπους, των ολικών στερεών και του αριθμού των σωματικών κυττάρων. Β) Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων γάλακτος, για την εξέταση της μικροβιακής κατάστασης του φρέσκου γάλακτος όνου. Γ) Η πιθανή μικροβιακή ανάσχεση του γάλακτος όνου στην ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Δ) Η μελέτη της συγκέντρωσης της λυσοζύμης.

1. Σχεδιασμός πειράματος

Η δειγματοληψία του γάλακτος έγινε από εκτροφή όνων που αριθμεί 35 ζώα, θηλυκά και αρσενικά και βρίσκεται στην περιοχή του Άργους. Στην παρούσα φάση, ο παραγωγός αρμέγει έξι θηλυκά ζώα από τα οποία έγιναν οι δειγματοληψίες. Όλα τα ζώα διατρέφονταν με σανό και μίγμα πιτύρων. Συνολικά, έγιναν τέσσερις δειγματοληψίες, σε διάστημα τριών μηνών (Νοέμβριος-Φεβρουάριος).

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων γάλακτος, τα ζώα βρίσκονταν σε διαφορετικά στάδια της γαλακτικής περιόδου και αυτά αναφέρονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οι φυλές των ζώων και η φάση της γαλ/κής περιόδου στην οποία βρίσκονταν κατά τη διάρκεια της δειγματοληπτικής περιόδου.

ΖΩΑ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	ΗΜΕΡΕΣ
Ζώο Α <i>Κυπραίικη φυλή -</i> <i>μεγαλόσωμη</i>	Τελικό στάδιο	210-300 ημέρες
Ζώο Β <i>Αρκαδικός όνος –</i> <i>μικρόσωμη</i> Ζώο Δ <i>Κυπραίικη φυλή –</i> <i>μεγαλόσωμη</i>	Πριν το τελικό στάδιο	180-240 ημέρες
Ζώο Ε <i>Κυπραίικη φυλή -</i> <i>μεγαλόσωμη</i>	Ενδιάμεσο στάδιο	120-210 ημέρες
Ζώο Γ <i>Κυπραίικη φυλή –</i> <i>μεγαλόσωμη</i> Ζώο ΣΤ <i>Κυπραίικη φυλή –</i> <i>μεγαλόσωμη</i>	Αρχικό στάδιο	90-120 ημέρες

Η συλλογή δειγμάτων έγινε σε αποστειρωμένα μπουκάλια. Τα δείγματα γάλακτος τοποθετούνταν σε ισοθερμικό κουτί με παγοκύστες, για τη μεταφορά τους.

1.1 Προσδιορισμός της χημικής σύστασης γάλακτος όνου

Τα δείγματα γάλακτος, τα οποία διατηρούνταν στους 4°C, μεταφέρθηκαν από το ψυγείο και τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο, για την άνοδο της θερμοκρασίας τους, στους 47°C. Έπειτα, ακολούθησε η μέτρηση των συστατικών, στον αυτόματο αναλυτή Milkoscan FT6000 (Foss Electric), ο προσδιορισμός του αριθμού των σωματικών κυττάρων στον αυτόματο αναλυτή Fossomatic FC και η μέτρηση του αριθμού των βακτηρίων στον αναλυτή Bactoscan.

1.2 Προσδιορισμός μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του γάλακτος όνου

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις, οι οποίες διεξάγονταν περίπου 15 ώρες μετά τη δειγματοληψία και ενώ τα δείγματα διατηρούνταν στους 4°C.

Τα δείγματα γάλακτος εξετάστηκαν για τις εξής κατηγορίες μικροοργανισμών: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, οξυγαλακτικά βακτήρια, λακτόκοκκοι, εντερόκοκκοι, ψυχρότροφα βακτήρια, μικρόκοκκοι, κολοβακτήρια, ζύμες-μύκητες και θερμοανθεκτικά βακτήρια.

Αραιώσεις δειγμάτων γάλακτος

Για το κάθε δείγμα γάλακτος έγιναν τρεις διαδοχικές αραιώσεις.

- Για την 1^η αραιώση (10^{-1}), 3ml από το γάλα αραιώνονται σε 27ml διαλύματος Ringer.
- Για τη 2^η αραιώση (10^{-2}), 3ml από την 1^η αραιώση αραιώνονται σε 27ml διαλύματος Ringer.
- Για την 3^η αραιώση (10^{-3}), 3ml από τη 2^η αραιώση αραιώνονται σε 27ml διαλύματος Ringer.

Παρασκευή διαλύματος Ringer: Σε 500ml απεσταγμένο νερό, διαλύεται μια ταμπλέτα Ringer's Solution (Biokar Diagnostics), μοιράζεται σε μπουκάλια των 100ml και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Για τον προσδιορισμό της ολικής μικροχλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (Biokar Diagnostics).

Παρασκευή P.C.A.: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 20.5 γρ υποστρώματος σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού, όπου γίνεται διαυγές και έπειτα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Η καλλιέργεια κάθε αραιώσης γίνεται σε ξεχωριστά τρυβλία. Γίνεται ενσωμάτωση 1ml από τις αραιώσεις -1, -2 και -3 με το θρεπτικό υλικό, δηλαδή, ρίχνεται 1ml στο τρυβλίο, έπειτα προστίθεται το άγαρ και τέλος ανακινείται οριζόντια το τρυβλίο.

Επάση: Έπειτα, το άγαρ αφήνεται να στερεοποιηθεί και τοποθετείται ανεστραμμένα, στους 30°C για 72 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επάσης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Οξυγαλακτικά βακτήρια

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό MRS broth (Man Rogosa Sharpe-Lab M) με την προσθήκη αγαρόζης (Agar Bacteriological Type E-Biokar Diagnostics).

Παρασκευή MRS agar: Το υλικό παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 27,5 γρ υποστρώματος MRS και 6,5 γρ αγαρόζης (15/1000) σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Έπειτα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 0, -1, -2, των δειγμάτων γάλακτος. Η καλλιέργεια έγινε σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με την ενσωμάτωση 1ml δείγματος.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 30°C για 48-72 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Οξυγαλακτικά βακτήρια: Γένος Λακτόκοκκοι

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των λακτοκόκκων, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό M17 agar (Lab M).

Παρασκευή M17 agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 28,6 γρ υποστρώματος M17, σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2. Καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με ενσωμάτωση 1ml δείγματος, στο υλικό. Το μίγμα αναδεύτηκε για την πλήρη ανάμιξη των δύο στοιχείων.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, αντίστροφα, στους 22°C για 48 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση αριθμού των αποικιών.

Οξυγαλακτικά βακτήρια: Γένος Εντερόκοκκοι

Ο προσδιορισμός του αριθμού των εντερόκοκκων έγινε με τη χρησιμοποίηση του θρεπτικού υλικού ΚΑΑ agar (Kanamycin esculin azide agar – Merck).

Παρασκευή ΚΑΑ agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 23,75 γρ υποστρώματος ΚΑΑ, σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2. Καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με ενσωμάτωση 1ml δείγματος, στο υλικό και ακολούθησε ανάδευση.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 37°C για 24 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί: Γένος Ψυχρότροφα βακτήρια

Τα ψυχρότροφα βακτήρια αναπτύσσονται στο θρεπτικό υλικό Milk P.C.A.

Παρασκευή M.PCA: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά την ανάμιξη 10,25 γρ υποστρώματος PCA, με άπαχη σκόνη γάλακτος σε ποσοστό 1%, 1,05 γρ. Το μίγμα διαλύεται με ανάδευση, σε 500 ml απεσταγμένο νερό, θερμαίνεται μέχρι βρασμού και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2. Καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με ενσωμάτωση 1ml δείγματος, στο υλικό και ακολούθησε ανάδευση.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε ψυκτικό θάλαμο, ανεστραμμένα, στους 7°C για 10 ημέρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Γένος Μικρόκοκκοι

Η ανάπτυξη των μικρόκοκκων έγινε στο θρεπτικό υλικό MS agar (Mannitol Salt Agar – Lab M).

Παρασκευή MS agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 54 γρ υποστρώματος MSA, σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2 και καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Το υλικό στερεοποιήθηκε στα τρυβλία και έπειτα έγινε εξάπλωση 0,1 ml δείγματος.

Επώαση: Τα τρυβλία, μετά την απορρόφηση του γάλακτος, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 30°C για 48 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Κολοβακτήρια

Η απομόνωση των κολοβακτηρίων έγινε στο θρεπτικό υλικό V.R.B.L. Agar (Violet Red Bile Agar – AppliChem).

Παρασκευή V.R.B.L. agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 17,75 γρ υποστρώματος VRBL, σε 500 ml απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στους 121°C για 15 λεπτά. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2 και καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με ενσωμάτωση 1ml δείγματος, στο υλικό και ακολούθησε ανάδευση.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 37°C για 24 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Κατηγορία Ζύμες-Μύκητες

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ζυμών και μυκήτων ήταν το YGC (Yeast extract dextrose chloramphenicol agar – Lab M).

Παρασκευή YGC agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 20 γρ υποστρώματος YGC, σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2 και καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Το υλικό στερεοποιήθηκε στα τρυβλία και έπειτα έγινε εξάπλωση 0,1 ml δείγματος.

Επώαση: Τα τρυβλία, μετά την απορρόφηση του γάλακτος, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 25°C για 72 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών.

Θερμοανθεκτικά βακτήρια

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των θερμοάντοχων μικροοργανισμών ήταν το Reinforced -RCM (AppliChem).

Παρασκευή RCM agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 14.85 γρ υποστρώματος RCM, σε 300 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0, -1 και -2 και καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Ο εμβολιασμός έγινε με ενσωμάτωση 1ml δείγματος, στο υλικό και ακολούθησε ανάδευση.

Επώαση: Το μίγμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και έπειτα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 30°C για 72 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταγραφή του αριθμού των αποικιών.

Bacillus cereus

Ο πιθανός εντοπισμός πληθυσμού του βακτηρίου *Bacillus cereus* έγινε στο θρεπτικό υλικό Bacillus cereus Medium (Lab M).

Παρασκευή Bacillus cereus Medium agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 23 γρ υποστρώματος B.C.M, σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε ένα φιαλίδιο πολυμιζίνης στα 500 ml και 100 ml egg yolk ανά 1000 ml υλικού.

Εμβολιασμός: Οι αραιώσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 0 και -1 και καλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Το υλικό στερεοποιήθηκε στα τρυβλία και έπειτα έγινε εξάπλωση 0,1 ml δείγματος.

Επώαση: Τα τρυβλία, μετά την απορρόφηση του γάλακτος, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, ανεστραμμένα, στους 37°C για 24 ώρες.

Μέτρηση αποικιών: Με το πέρας του χρόνου επώασης, ακολούθησε καταγραφή του αριθμού των αποικιών.

1.3 Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου

1.3.1 Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα

Μελετήθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δράση του γάλακτος όνου, στην ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών, σε ειδικό για αυτούς, θρεπτικό υπόστρωμα. Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παθογόνοι μικροοργανισμοί: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *E. coli* 0157.

Η έρευνα έγινε στα δείγματα γάλακτος, περί τις 15 ώρες μετά την συλλογή τους.

Επανάκτηση της ζωτικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών

Σε πρώτη φάση, ήταν απαραίτητο οι μικροοργανισμοί να επανακτήσουν τη ζωτικότητά τους, καθώς διατηρούνταν στους -20°C. Για την ανακαλλιέργεια των παθογόνων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά Mac Conkey (AppliChem) και B.H.I. (Brain Heart Infusion-Oxoid).

Παρασκευή Mac Conkey agar: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 56 γρ υποστρώματος υλικού σε 1000ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού και στη συνέχεια, αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Παρασκευή B.H.I.- Brain Heart Infusion: Το υλικό παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 37 γρ υποστρώματος B.H.I. και 7,5 γρ αгарόζης (15/1000 - Agar Bacteriological Type E-Biokar Diagnostics) σε 1000 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Έπειτα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Εμβολιασμός: Οι μικροοργανισμοί διατηρούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα P.B.S. (Phosphate Buffer Solution-) και εξαπλώθηκαν στα θρεπτικά υλικά με βαμβακοφόρο στυλεό, ο οποίος εμβαπτίστηκε στο διάλυμα.

Επώαση: Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάστροφα, σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες.

Συλλογή αποικιών: Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, συλλέχθηκαν μερικές με κρίκο και αιωρήθηκαν σε διάλυμα P.B.S..

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η αντιμικροβιακή δράση του γάλακτος όνου, εξετάστηκε με τη μέθοδο της έγχυσης του γάλακτος, σε βοθρία, σε θρεπτικό υλικό, είτε με ενσωματωμένο το παθογόνο, είτε έχοντας γίνει επιφανειακή εξάπλωση. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το B.H.I. και ο τρόπος παρασκευής του αναφέρεται παραπάνω.

- Α. Ενσωμάτωση παθογόνου στο υλικό: Σε κάθε τρυβλίο έγινε ανάμιξη του υλικού με ποσότητα 100μl μικροοργανισμού. Αφού το άγαρ στερεοποιήθηκε, σχηματίστηκαν βοθρία με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur και έγινε έγχυση ποσότητας περίπου 50μl, γάλακτος. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και την επόμενη ημέρα, ελέχθηκαν για το σχηματισμό δακτυλίου γύρω από την περιοχή των οπών, που θα σήμαινε ανάσχεση της ανάπτυξης του κάθε παθογόνου.
- Β. Επιφανειακή εξάπλωση παθογόνου στο υλικό: Ο κάθε μικροοργανισμός εξαπλώθηκε με βαμβακοφόρο στυλεό, εμβαπτισμένο στο διάλυμα του, επιφανειακά στο θρεπτικό υλικό. Έπειτα ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία, όπως και κατά την ενσωμάτωση.

Σε κάθε τρυβλίο των 9 cm, σχηματίζονταν 5 βοθρία. Στα τρία, εγγέονταν δείγματα γάλακτος όνου, στο ένα ως αρνητικός μάρτυρας, γάλα αγελάδας και στο τελευταίο, ως θετικός μάρτυρας, διάλυμα του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλη.

1.3.2 Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου στην ανάπτυξη παθογόνων με τη χρήση γάλακτος όνου ως θρεπτικό υπόστρωμα

Για τον προσδιορισμό της πιθανής μικροβιακής ανάσχεσης του γάλακτος όνου, στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, εφαρμόστηκε η μέθοδος κατά την οποία, εμβολιάστηκε το γάλα με ένα παθογόνο και μελετήθηκε η σταδιακή ανάπτυξη του με την ανάπτυξη αποικιών, κατά την καλλιέργεια σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα.

Τα δείγματα γάλακτος της ομάδας Γ και ΣΤ εμβολιάστηκαν με το παθογόνο *Salmonella typhimurium*. Το παθογόνο προστέθηκε στο γάλα σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις και μελετήθηκε η εξέλιξή του σε πέντε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Αραιώσεις παθογόνου

Σε αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα P.B.S., ενσωματώθηκε η *S. typhimurium* και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή της, με βάση την κλίμακα Mac Farland 1 (θολερότητα). Η πρώτη αραιώση ήταν η 10^5 cfu/ml και παρασκευάστηκαν επίσης οι 10^4 , 10^3 , και 10^2 cfu/ml.

Εμβολιασμός

Από κάθε δείγμα γάλακτος εμβολιάστηκαν 5 ml με 17μl από την κάθε αραιώση του παθογόνου μικροοργανισμού και επώασθησαν στους 4°C.

Καλλιέργεια εμβολιασμένου γάλακτος

Η καλλιέργεια του γάλακτος έγινε στα εξής χρονικά διαστήματα:

- T₀: μηδενικός χρόνος επώασης
- T₁: έλευση μισής ώρας από τον εμβολιασμό
- T₂: έλευση μίας ώρας μετά τον εμβολιασμό
- T₃: έλευση 2 ωρών μετά τον εμβολιασμό
- T₄: έλευση 24 ωρών από τον εμβολιασμό

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της *S. typhimurium* είναι το X.L.D. agar (53,5 γρ υποστρώματος /λίτρο απεσταγμένο νερό) το οποίο αποτελεί ειδικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη της σαλμονέλας. Μετά την επιφανειακή εξάπλωση του μικροοργανισμού, από όλους τους χρόνους, τα υποστρώματα επώασθησαν στους 37°C για 24 ώρες και ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των αποικιών της σαλμονέλας.

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε γάλα αγελάδας το οποίο εμβολιάστηκε επίσης με τον μικροοργανισμό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι επόμενες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα γάλακτος, τα οποία είχαν λυοφιλοποιηθεί, με σκοπό την καλύτερη συντήρησή τους. Για τη χρησιμοποίησή τους στις παρακάτω αναλύσεις, έγινε ανασύσταση των δειγμάτων με την προσθήκη απεσταγμένου νερού. Η ανασύσταση έγινε με βάση το ποσοστό ξηρής ουσίας του γάλακτος όνου, που είναι 8%. Σε 100 ml απεσταγμένου νερού διαλύονταν 8 γραμμάρια σκόνης λυοφιλοποιημένου γάλακτος.

1.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου έγινε με την εφαρμογή των εξής μεθόδων:

- Μέθοδος lysoplate
- Νεφελομετρική μέθοδος

1.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη μέθοδο lysoplate

Η μέθοδος lysoplate εφαρμόζεται με σκοπό τον ποιοτικό προσδιορισμό της λυσοζύμης, μέσω της ανασχεσης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) σε αγαρόζη και το σχηματισμό δακτυλίων, λόγω της δράσης της λυσοζύμης.

Η μέθοδος αφορά τον εμπλουτισμό αγαρόζης 1% με το μικροοργανισμό σε τρυβλία, τη διάνοιξη βοθρίων στο υλικό και την έγχυση γάλακτος όνου και καθαρής λυσοζύμης, ως θετικό μάρτυρα, αντίστοιχα.

Παρασκευή αγαρόζης και εμπλουτισμός με τον *M. lysodeikticus*: Το θρεπτικό υπόστρωμα της αγαρόζης παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 1 γρ υποστρώματος αγαρόζης (Agar Bacteriological Type E-Biokar Diagnostics) σε 100ml P.B.S. με pH 6.0. Το μίγμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού. Αφού η θερμοκρασία του έφθασε περίπου στους 47°C, ενσωματώθηκε ο μικροοργανισμός (0,6mg λυσοφιλωμένων κυττάρων/ ml-Sigma, χωρίς καμία προηγούμενη ανανέωση του μικροοργανισμού). Το νέο μίγμα εξαπλώθηκε σε τρυβλία, σε ποσότητα 25ml στο κάθε ένα και αφού στερεοποιήθηκε, σχηματίστηκαν τα βοθρία, με αποστειρωμένη πιπέττα Pasteur.

Αραιώσεις καθαρής λυσοζύμης ως θετικός μάρτυρας: Χρησιμοποιήθηκε καθαρή λυσοζύμη αυγού, σε μορφή σκόνης (Sigma), η οποία αραιώθηκε σε διάλυμα P.B.S. με pH 6,0. Δημιουργήθηκαν οι εξής αραιώσεις: 16000mg/l, 12000 mg/l, 8000mg/l, 4000mg/l, 2000mg/l και 1000mg/l.

Έγχυση γάλακτος - Επώαση: Ποσότητα 50μl από τα δείγματα γάλακτος και της καθαρής λυσοζύμης, εγχύθηκαν προσεκτικά στα πηγαδάκια της αγαρόζης. Έπειτα τα τρυβλία παρέμεναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 18-20 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκαν με παχύμετρο, οι διάμετροι των σχηματιζόμενων δακτυλίων (ζωνών ανασχεσης) γύρω από τα βοθρία υποδήλωναν και την παρεμποδιστική δράση της λυσοζύμης του γάλακτος και του μάρτυρα, στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

1.4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη νεφελομετρική μέθοδο

Η φασματοσκοπική μέθοδος αφορά στον προσδιορισμό της λυσοζύμης του γάλακτος όνου, μέσω της ανάμιξης του γάλακτος με το μικροοργανισμό *M. lysodeikticus* και τη μεταβολή της θολερότητας του μίγματος λόγω της διάσπασης του μικροοργανισμού, από τη δράση της λυσοζύμης του γάλακτος.

Στην ειδική πλακέττα 96 θέσεων του φωτόμετρου, χωρητικότητας 400μl, αναμίχθηκαν σε κάθε μία χωριστά, κάθε δείγμα γάλακτος (285μl) με ποσότητα 15μl του μικροοργανισμού, διαλυμένο σε διάλυμα P.B.S.. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σκόνη αγελαδινού γάλακτος, ανασυσταμένο σύμφωνα με τη σύσταση του γαϊδουρινού γάλακτος, με σκοπό την δημιουργία ίδιας θολερότητας και προστέθηκε επίσης ο μικροοργανισμός. Η ίδια ανάμιξη έγινε και στα δείγματα του θετικού μάρτυρα, που τον αποτελούν όπως και στη μέθοδο lysoplate, αραιώσεις καθαρής λυσοζύμης αυγού. Χρησιμοποιήθηκαν 14 αραιώσεις της λυσοζύμης.

Ουσιαστικά, έγινε η ανάμιξη των δειγμάτων του γάλακτος και του μάρτυρα με τον μικροοργανισμό και τοποθετήθηκαν άμεσα στο φασματοφωτόμετρο για την μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm.

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Sunrise TECAN .

1.5 Ποιοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης του γάλακτος όνου

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης του γάλακτος όνου έγινε με την εφαρμογή των παρακάτω μεθόδων:

- Έλεγχος Delvotest
- SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

1.5.1 Έλεγχος της δράσης της λυσοζύμης γάλακτος όνου με τη μέθοδο του Delvotest

Το Delvotest αποτελείται από στερεό άγαρ, εμβολιασμένο με τον μικροοργανισμό *Bacillus stearothermophilus* και μπλε βρωμοκρεζόλης. Σε περίπτωση απουσίας αντιβιοτικών στο γάλα, το άγαρ αποχρωματίζεται σε κίτρινο, ενώ στην αντίθετη περίπτωση το χρώμα παραμένει το ίδιο, δηλαδή μωβ. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ύπαρξης αντιβιοτικών στο αγελαδινό γάλα. Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ύπαρξης αντιμικροβιακών ουσιών, στο γάλα όνου.

Τα σωληνάρια εμβολιάστηκαν με 100μl γάλακτος και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 63°C για διάστημα 2,5 ωρών. Πραγματοποιήθηκε σταδιακή παρατήρηση των δειγμάτων στις 4, 15 και 24 ώρες παραμονής τους στο υδατόλουτρο.

1.5.2 Εφαρμογή SDS – PAGE ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση ως μέθοδος, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, η οποία αφορά το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ηλεκτροφόρηση έγινε για τον προσδιορισμό της λυσοζύμης του γάλακτος όνου και ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα καθαρής λυσοζύμης σε διάφορες αραιώσεις.

Για τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης, όπως και σε κάθε περίπτωση, έγινε αρχικά διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Όπως σε όλα τα είδη γάλακτος και στις όνου, υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών, οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες του ορού. Η λυσοζύμη ανήκει στις πρωτεΐνες του ορού, οπότε και διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις.

Για την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης απαιτείται η παρασκευή των gel, η προετοιμασία των δειγμάτων για την τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια των gel.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών ορού και καζεϊνών

Όπως είναι γνωστό, οι καζεΐνες κατακρημνίζονται όταν το pH κατέλθει στο 4.6, οπότε σχηματίζεται ίζημα το οποίο αποτελείται από τις καζεΐνες και στο υπερκείμενο βρίσκονται τα διαλυτά στοιχεία του γάλακτος καθώς και οι πρωτεΐνες του ορού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Ποσότητα δειγμάτων γάλακτος όνου, φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 30 λεπτά. Έπειτα, απομακρύνθηκε η στιβάδα λίπους, στην επιφάνεια και ακολούθησε ρύθμιση του pH στο 4.6 με την προσθήκη 10% οξικού οξέος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν πάλι στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και παρελήφθη το υπερκείμενο, που αποτελεί τις πρωτεΐνες του ορού. Το υπερκείμενο, δεν ήταν διαυγές μετά τη δεύτερη φυγοκέντριση, σε αντίθεση με την αναφορά της Vincenzetti et al (2008), ακολούθησαν δύο ακόμα φυγοκεντρήσεις στις 8000 στροφές.

Παρασκευή των gel ηλεκτροφόρησης

Το gel που παρασκευάστηκε για τον προσδιορισμό της λυσοζύμης, ήταν 15% διάλυμα ακρυλαμίδης – δις ακρυλαμίδης. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν, διάλυμα SDS, ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl με ρυθμισμένο pH 8.8, 10% ammonium persulphate -

APS, και tetra ethyl-methylo-diomine – TEMED, όπου τα δύο τελευταία διαλύματα προστέθηκαν όταν το gel ήταν έτοιμο για πολυμερισμό. Το gel πριν στερεοποιηθεί, εφαρμόστηκε αμέσως στην ειδική γυάλινη κατασκευή για τη μορφοποίηση του. Έπειτα, προστέθηκε και ένα δεύτερο gel 5% ακρυλαμίδη δις-ακρυλαμίδης για την ομαδοποίηση των πρωτεϊνών και με το ειδικό χτενάκι σχηματίστηκαν οι θέσεις-πηγαδάκια για την τοποθέτηση των δειγμάτων.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα δείγματα γάλακτος και καθαρής λυσοζύμης, αναμίχθηκαν με Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) και 2-μερκαπτοαιθανόλη (Merck) και θερμάνθηκαν στους 100°C για 5 λεπτά, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια στο gel και εφαρμόστηκε η ηλεκτροφόρηση με τροφοδοσία ηλεκτρικής ισχύος 100V και διάρκεια 4 ωρών.

Χρώση και αποχρωματισμός του gel

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel εμβαπτίστηκε για 15 ώρες, σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue (Panreac) (0,1%) που περιείχε μεθανόλη (50%), οξικό οξύ (10%) και νερό, για τη χρώση και την οπτικοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών. Ακολούθησε αποχρωματισμός του gel με διάλυμα μεθανόλης (45%), οξικού οξέος (10%) και νερού (45%).

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Τα ζώα από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα γάλακτος, βρίσκονταν όλα υπό τις ίδιες συνθήκες εκτατικής εκτροφής, δηλαδή, λάμβαναν όλα την ίδια ποσότητα και ποιότητα τροφής και νερού, μπορούσαν να αναπαυθούν σε οποιοδήποτε σημείο ήθελαν και οποιαδήποτε ώρα της ημέρας και να κινηθούν σε όλο το μήκος του περιφραγμένου χώρου. Δηλαδή, δεν είχε γίνει κάποια επέμβαση στις συνθήκες εκτροφής των ζώων και ήταν ίδιες για όλα τα ζώα.

1.1 Προσδιορισμός της χημικής σύστασης γάλακτος όνου

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των συστατικών του γάλακτος όνου σε εκατοστιαία αναλογία.

Πίνακας 1.1. Χημική σύσταση του γάλακτος όνου.

	Λίπος%	Πρωτεΐνη%	Λακτόζη%	SNF%	TS%	SCCx 1000
A	1,24±0,6	1,36±0,2	5,38±0,9	7,14±0,5	8,33±0,5	116
B	1,05±0,3	1,27±0,1	5,93±0,3	7,35±0,2	8,32±0,4	61
Γ	0,62±0,3	1,87±0,2	5,54±0,4	7,58±0,2	8,12±0,4	89
Δ	1,14±1,3	1,3±0,3	5,5±1,5	7,24±1,2	8,16±1,9	15
E	1,2±0,3	1,22±0,2	5,67±0,4	7,23±0,3	8,33±0,5	70
ΣΤ	0,52±0,1	1,27±0,3	5,91±0,3	7,31±0,5	7,72±0,4	54
M.O.	0,96±0,2	1,38±0,2	5,65±0,2	7,3±0,1	8,16±0,2	67±34

SNF=Solids-non-fat, στερεά άνευ λίπους

TS= Total solids, ολικά στερεά

SCC=Somatic cell count, μέτρηση αριθμού σωματικών κυττάρων

Όπως διαπιστώνεται, τα δείγματα γάλακτος δεν παρουσιάζουν διαφορές ανάμεσα στα ζώα, γιατί όπως έχει αναφερθεί, δεν έχει γίνει κάποια ζωοτεχνική επέμβαση στην εκτροφή τους.

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων γάλακτος, τα ζώα βρίσκονταν σε διαφορετικά στάδια της γαλακτικής περιόδου και αυτά αναφέρονται παρακάτω στον πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2. Οι φυλές των ζώων και η φάση της γαλ/κής περιόδου στην οποία βρίσκονταν κατά τη διάρκεια της δειγματοληπτικής περιόδου.

ΖΩΑ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ
Ζώο Α <i>Κυπραίικη φυλή - μεγαλόσωμη</i>	Τέλος γαλ/κής περιόδου, 210-300 ημέρες
Ζώο Β <i>Αρκαδικός όνος – μικρόσωμη</i> Ζώο Δ <i>Κυπραίικη φυλή – μεγαλόσωμη</i>	Προς το τέλος γαλ/κής περιόδου, 180-240 ημέρες
Ζώο Ε <i>Κυπραίικη φυλή - μεγαλόσωμη</i>	Μέση γαλ/κής περιόδου, 120-210 ημέρες
Ζώο Γ <i>Κυπραίικη φυλή – μεγαλόσωμη</i> Ζώο ΣΤ <i>Κυπραίικη φυλή – μεγαλόσωμη</i>	Προς την αρχή γαλ/κής περιόδου, 90-120 ημέρες

Συγκρίνοντας τους πίνακες 1.1 – 1.3 με τον 1.2, διαπιστώνεται ότι ανάμεσα στα ζώα παρατηρείται διαφορά στο ποσοστό λίπους για τα ζώα Γ και ΣΤ, καθώς οι τιμές τους είναι 0,62 και 0,52% λίπος, αντίστοιχα. Τα δύο ζώα βρίσκονταν στην αρχή της γαλακτικής τους περιόδου και παρουσίασαν τα χαμηλότερα ποσοστά λίπους σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα. Σύμφωνα με την Salimei (2004), κατά την αντίστοιχη περίοδο της γαλακτοπαραγωγής, δηλαδή στις 90-120 ημέρες, η περιεκτικότητα του γάλακτος της όνου, σε λίπος παρουσίασε αύξηση.

Διαπιστώθηκε από τον Fantuz (2009), ότι η σύσταση του γάλακτος της όνου, δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των μετάλλων Fe, Cu, Zn, Mn, I και Se, σε χαμηλές ποσότητες, στην τροφή των αμελγόμενων ζώων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η ποσότητα του αμελγόμενου γάλακτος, το ποσοστό των πρωτεϊνών, του λίπους, της λακτόζης και της τέφρας και δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ζώα που λάμβαναν το ενισχυμένο σιτηρέσιο.

Σύσταση διαφόρων ειδών γάλακτος

Στον πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του γάλακτος της αγελάδας, της αίγας, του πρόβατου και του ανθρώπου.

Πίνακας 1.3 Σύσταση γάλακτος των αγροτικών ζώων και του ανθρώπου.

	Νερό%	Πρωτεΐνες%	Λίπος%	Λακτόζη %	Καζεΐνη %	Ενέργεια KJ/kg
Αγελαδινό	87,8	3,2	3,9	4,8	2,75	2983
Αίγιο	88,9	3,1	3,5	4,4	2,4	3399
Πρόβειο	83,0	5,4	6,0	5,1	4,8	5289
Γάλα όνου	91,2	1,72	1,0	6,9	0,38	1939
Ανθρώπινο	87,6	1,64	3,38	6,7	0,4	2855

Όπως έχει διαπιστωθεί, το γάλα του όνου προσομοιάζει στο ανθρώπινο, σε γενικό βαθμό, περισσότερο από τα υπόλοιπα είδη γάλακτος, ενώ διαφέρει σημαντικά στο ποσοστό λιποπεριεκτικότητας από το ανθρώπινο.

Επίσης, συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος, στο γάλα όνου περιέχεται το μεγαλύτερο ποσοστό νερού (91,2%) ενώ, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι σχεδόν η χαμηλότερη με τελευταίο το ανθρώπινο και έχει αντίστοιχα και το χαμηλότερο ποσοστό καζεΐνης (0,38%). Ακόμα, το γάλα όνου έχει τη μικρότερη λιποπεριεκτικότητα 1%, από το αγελαδινό, το αίγιο και το πρόβειο. Τέλος, το γάλα όνου έχει το υψηλότερο ποσοστό λακτόζης (6,9%) και τη χαμηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο (1939Kj/kg).

Το pH του γάλακτος όνου κυμαίνεται στο 7,0 – 7,2 όπως και το ανθρώπινο, ενώ το αγελαδινό κυμαίνεται στο 6,6 – 6,8.

1.2 Προσδιορισμός μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του γάλακτος όνου

Η μικροβιολογική κατάσταση του γάλακτος όνου, μελετήθηκε μέσω του ελέγχου δέκα διαφορετικών κατηγοριών μικροοργανισμών. Οι κατηγορίες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής : ολική μικροχλωρίδα, οξυγαλακτικά βακτήρια, λακτόκοκκοι, εντερόκοκκοι, ψυχρότροφα βακτήρια, μικρόκοκκοι, κολοβακτήρια, ζύμες – μύκητες, θερμοανθεκτικά βακτήρια και το βακτήριο *Bacillus cereus*.

Από τον πίνακα 1.2, διαπιστώνεται ότι η αρχική μικροχλωρίδα του νωπού γάλακτος όνου που συλλέχθηκε περιείχε $10^1 - 10^2$ cfu/ml.

Ο Zhang *et al.*, 2008 αναφέρουν ότι η ολική μεσόφιλη χλωρίδα – O.M.X. και ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε νωπό γάλα όνου, ξεκινούν από 10^4 cfu/ml και για τα κολοβακτηρίδια 10^2 cfu/ml. Επίσης, αναφέρεται ότι κατά τη

συντήρηση του νωπού γάλακτος στους 20°C, ο πληθυσμός της O.M.X και των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξάνεται σταδιακά και φτάνει τα 10⁸ και 10⁶ cfu/ml, έπειτα από 24 ώρες. Στην ίδια έρευνα, κατά τη συντήρηση του γάλακτος όνου στους 4°C, για διάστημα 96 ωρών (~ 4 ημέρες), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στον πληθυσμό της O.M.X. Συγκριτικά με το μικροβιακό φορτίο της O.M.X. του αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, το οποίο φτάνει τα 10⁷ και 10⁵-10⁷ cfu/ml αντίστοιχα, το νωπό γάλα όνου, εμφανίζει χαμηλό μικροβιακό φορτίο που φτάνει τα 10⁴ cfu/ml. Ο Colavita *et al.*, 2010, αναφέρει ότι η O.M.X. του γάλακτος όνου ξεκινά από 10² - 10⁵ cfu/ml και ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων φτάνει τα 10³ cfu/ml.

Πίνακας 1.2 Οι μέσοι όροι του πληθυσμού των μικροοργανισμών, σε log cfu/ml.

Ζώο/ Μικροοργανισμός	A	B	Γ	Δ	E	ΣΤ	M.O.
OMX	2,18±0,9	2,37±0,4	2,38±0,4	2,54±0,4	2,55±0,1	2,71±0,5	2,4±0,1
Οξυγαλακτικά βακτήρια	1,67±0,9	1,18±0,8	0,99±0,1	1,19±0,8	1,38±0,8	1,45±0,2	1,31±0,2
Λακτόκοκκοι	2,56±0,2	1,83±0,2	1,95±0,6	1,84±0,2	1,76±0,3	2,35±0,1	2,04±0,3
Εντερόκοκκοι	0,58±0,7	0,22±0,2	0,50±1	0,74±1,4	0,89±0,6	0,77±1	0,61±0,2
Ψυχρότροφα βακτήρια	1,48±1,4	1,83±0,8	2,34±0,9	2,37±0,8	1,48±1	2,36±0,8	1,97±0,4
Μικρόκοκκοι	2,86±0,5	2,33±0,5	1,95±0,4	1,85±1,2	2,45±0,3	2,7±1,1	2,35±0,4
Κολοβακτήρια	1,86±0,6	1,08±0,1	1,27±1,2	1,29±1	1,92±0,8	1,5±0,7	1,48±0,3
Ζύμες-Μύκητες	2,56±0,3	2,56±0,3	2,66±1,2	2,95±0,1	2,42±0,1	2,54±0,8	2,61±0,1
Θερμοανθεκτικά βακτήρια	1,23±0,8	1,13±1,2	0,72±0,7	1,18±0,4	1,36±0,1	1,99±0,8	1,26±0,4
<i>Bacillus cereus</i>	1,53±1,3	1,12±0,9	1,04±0,7	1,73±1,4	1,15±0,8	1,32±0,9	1,31±0,2

Σύμφωνα με τον Corrola *et al.*, 2002, ο πληθυσμός των εντερόκοκκων σε νωπό γάλα όνου ήταν 1,5±0,6 log cfu/ml και των λακτόκκων 3,2±1,1 log cfu/ml ενώ στην παρούσα μελέτη ο μεγαλύτερος πληθυσμός που σημειώθηκε ήταν σύμφωνα με τον Πίνακα 1.2, στο ζώο E, 0,89±0,6 log cfu/ml για τους εντερόκοκκους και στο ζώο A, 2,56±0,2 log cfu/ml για τους λακτόκοκκους. Επίσης, σύμφωνα με τον Corrola *et al.* 2002, η O.M.X. είχε πληθυσμό 4,6±0,6 log cfu/ml, ο αριθμός των κολοβακτηριδίων ήταν 1,4±0,2 log cfu/ml, οι ζύμες – μύκητες βρέθηκαν να έχουν πληθυσμό 4,5±0,8 log cfu/ml και για τα ψυχρότροφα βακτήρια, 1,5±0,2 log cfu/ml. Συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, οι πληθυσμοί των O.M.X. και ζυμών – μυκήτων, προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερους πληθυσμούς, με 2,71±0,5 log cfu/ml (ζώο A) και 2,95±0,1 log cfu/ml (ζώο Δ), αντίστοιχα, ενώ ο αριθμός των κολοβακτηριδίων και των ψυχρότροφων βρέθηκε ελαφρώς μεγαλύτερος (για το ζώο E, 1,9±0,8 log cfu/ml και για το ζώο Γ, 2,34±0,9 log cfu/ml, αντίστοιχα).

Σύμφωνα με την Chiavari *et al.*, 2005, ο αριθμός των θερμοάντοχων βακτηρίων σε νωπό γάλα όνου ήταν $2,01 \pm 0,07 \log \text{ cfu/ml}$ ενώ σύμφωνα με τον Πίνακα 1.2, κυμάνθηκε στο $1,26 \pm 0,4 \log \text{ cfu/ml}$. Για τις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών, τους μικρόκοκκους και τον *Bacillus cereus* δεν υπάρχει κάποιο σχετικό άρθρο στη βιβλιογραφία.

Σημαντική ήταν η μελέτη της Sorrentino, κατά την οποία, ερευνήθηκε η μικροβιολογική κατάσταση του γάλακτος όνου, σε γάλα που αμέλγεται μηχανικά και σε γάλα που αμέλγεται με τα χέρια. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι κατά τις συνθήκες μηχανικής άμελξης, το μικροβιακό φορτίο του γάλακτος βρέθηκε να είναι χαμηλότερο από αυτό της χειρονακτικής άμελξης. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της O.M.X. ήταν $3,5 \pm 0,3 \log \text{ cfu/ml}$ κατά τη μηχανική άμελξη, ενώ αντίστοιχα στη χειρονακτική ήταν $4,7 \pm 0,2 \log \text{ cfu/ml}$. Επίσης, μελετήθηκε η εξέλιξη της μικροχλωρίδας κατά τη συντήρηση του γάλακτος στους 4°C , για 3 και 7 ημέρες. Παρατηρήθηκε, έντονη αύξηση του μικροβιακού φορτίου των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ οι υπόλοιπες κατηγορίες των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν και αφορούσαν τα κολοβακτηρίδια, την O.M.X, τις ζύμες και μύκητες και τα ψυχρότροφα βακτήρια, παρουσίασαν μικρή αύξηση του μικροβιακού φορτίου κατά τις 3 και 7 ημέρες συντήρησης στους 4°C .

Σε έρευνα του Colavita, ο μικροβιακός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, προσδιορίστηκε στα $2,52 - 5,11 \log \text{ cfu/ml}$, σε εκτροφή μηχανικά αμελγόμενων ζώων, σε διάστημα δύο χρόνων. Όπως διαπιστώνεται, η O.M.X. που προσδιορίστηκε στα δείγματα της παρούσας μελέτης, βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, σε σχέση με τη βιβλιογραφία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, επιβεβαιώνουν τη μικρή κυριαρχία ενδομαστικών μολύνσεων στην όνο, λαμβάνοντας υπ' όψη και τον αριθμό των σωματικών κυττάρων, ο οποίος κατά μέσο όρο δεν ξεπέρασε τα 60.000 κύτταρα/ ml. Στο νωπό αγελαδινό γάλα, ο αριθμός των μικροβίων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 100.000 μικρόβια/ml και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων τις 400.000 κύτταρα/ml. Στη μελέτη της Pilla (2010), ο αριθμός των σωματικών κυττάρων δεν ξεπέρασε τα 50.000 κύτταρα/ml, ενώ, σύμφωνα με τον Ivankovic (2009), ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο γάλα της όνου δεν επηρεάζεται από τη φάση της γαλακτικής περιόδου. Έχει επίσης καταγραφεί, η διακύμανση κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής, του αριθμού διαφόρων κατηγοριών κυττάρων που περιλαμβάνονται στα σωματικά κύτταρα, όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Η δράση τους στον οργανισμό εντοπίζεται στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίων ξένων μικροοργανισμών και ουσιών. Σε περίπτωση, προσβολής του μαστικού αδένος από παθογόνους μικροοργανισμούς, αυξάνεται ο αριθμός τους στο παραγόμενο γάλα. Στον Πίνακα 1.2.1, καταγράφεται η διακύμανση του αριθμού των κυττάρων στη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Σημαντική διαφορά παρατηρείται στον αριθμό των

ουδετερόφιλων τα οποία παρουσιάζουν έντονη αύξηση, ενώ αντίθετα, τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν έντονη μείωση του αριθμού τους, κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής. Ο αριθμός των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, παραμένει σταθερός.

Πίνακας 1.2.1 Διακύμανση του αριθμού των σωματικών κυττάρων (log SCC/ml) κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου.

Είδη κυττάρων log SCC / ml	Ημέρες γαλακτικής περιόδου		
	0-30	60-90	150-180
Λεμφοκύτταρα	1.50	1.80	1.60
Μακροφάγα	2.20	1.90	1.65
Ουδετερόφιλα	1.80	3.40	3.70
Επιθηλιακά	3.70	2.00	1.50
Σωματικά κύτταρα	4.60	4.25	4.45

1.3 Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου

1.3.1 Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος στην ανάπτυξη παθογόνων σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η πιθανή δυνατότητα μικροβιακής ανάσχεσης του γάλακτος της όνου, στην ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *E. coli* 0157. Πρόκειται για μια σειρά παθογόνων, τα οποία συναντώνται συχνά σε μολυσμένα τρόφιμα και συγκεκριμένα σε παστεριωμένο γάλα, ως επιμόλυνση.

Τα αποτελέσματα του πειράματος αναφέρονται στον Πίνακα 1.3.1.

Πίνακας 1.3.1 Αντιμικροβιακή δράση λυσοζύμης γάλακτος όνου.

Βακτήρια	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm) Ενσωμάτωση – Επ. εξάπλωση
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Pseudomonas</i>	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0
<i>Brucella</i>	0
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>E. coli</i> 0157	0

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, αναμενόταν ο σχηματισμός χαρακτηριστικών ζωνών ανάσχεσης, στην περίμετρο των βοθρίων, γεγονός που θα επιβεβαίωνε την αντιμικροβιακή δράση του γάλακτος όνου. Όμως τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης **δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση ως προς τη δράση του γάλακτος της όνου, στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων παθογόνων** όπως αναφέρεται στον Πίνακα 1.3.1. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν κανονικά και σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού σχηματίσθηκαν αποικίες.

Το γάλα όνου, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του σε λυσοζύμη, παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση (Pilla *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα έχει παρουσιάσει αναχαιτιστική δράση στην ανάπτυξη των στελεχών *Salmonella choleraesuis* και *Shigella dysenteriae* (Zhang *et al.*, 2008) τα οποία αποτελούν δύο σημαντικά για τον άνθρωπο, παθογόνα βακτήρια. Επίσης, με την ίδια μέθοδο έχει μελετηθεί, από τους Subhadra και Kansal (2001), η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης του βουβαλίσσιου γάλακτος εναντίον των παθογόνων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Salmonella typhimurium* και *Escherichia coli*, και διαπιστώθηκε, όπως και στην παρούσα μελέτη, ότι δεν υπάρχει κάποια επίδραση στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων παθογόνων, από τη δράση της λυσοζύμης. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε ότι, η λυσοζύμη του λευκώματος του αυγού και του γάλακτος της καμήλας (Elagami *et al.*, 1992), παρουσίασαν παρεμποδιστική δράση στην επιβίωση του *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης του γάλακτος όνου στην ανάπτυξη παθογόνων με τη χρήση γάλακτος όνου ως θρεπτικό υπόστρωμα

Η συγκεκριμένη έρευνα, είχε ακριβώς τον ίδιο σκοπό με αυτήν που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, με τη διαφορά ότι το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το γάλα του όνου και όχι κάποιο θρεπτικό υλικό. Επίσης, στο

συγκεκριμένο πείραμα, ο παθογόνος μικροοργανισμός που μελετήθηκε ως προς το ρυθμό ανάπτυξής του ήταν η *Salmonella typhimurium*.

Ομοίως, τα αποτελέσματα και από αυτή τη μελέτη, **δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη παρεμποδιστική δράση του γάλακτος όνου, επί της *Salmonella typhimurium***. Ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού του βακτηρίου ήταν κανονικός.

1.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου

1.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη μέθοδο lysoplate

Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση, καθώς βρίσκεται σε ιστούς και εκκρίσεις πολλών ζώων, καθώς επίσης και σε εκκρίσεις φυτών και σε μύκητες. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στο λεύκωμα του αυγού της όρνιθας από όπου χρησιμοποιείται και στην έρευνα.

Η μέθοδος lysoplate, αφορά στον προσδιορισμό της λυσοζύμης, μέσω της παρεμποδιστικής της δράσης, στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Micrococcus lysodeikticus*. Ο μικροοργανισμός χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ύπαρξη λυσοζύμης.

Σύμφωνα με τον Greenwald και Moy (1976), η μέθοδος παρουσιάζει το εξής μειονέκτημα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι 3-4 φορές πιο υψηλά από τα αντίστοιχα της νεφελομετρικής μεθόδου.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις καθαρής λυσοζύμης και ήταν οι εξής: 16000, 12000, 8000, 4000, 2000, 1000 mg/l. Στον πίνακα 1.4.1 αναφέρονται οι διάμετροι των δίσκων ανάσχεσης που σχηματίστηκαν στο άγαρ, εμβολιασμένο με *Micrococcus lysodeikticus*. Οι διάμετροι των μαρτύρων της λυσοζύμης προέκυψαν από το μέσο όρο έξι επαναλήψεων. Οι διάμετροι των δειγμάτων γάλακτος προέκυψαν από το μέσο όρο των τεσσάρων δειγματοληψιών ανά ζώο, ενώ για κάθε δειγματοληψία έγιναν δύο επαναλήψεις.

Πίνακας 1.4.1. Συγκέντρωση λυσοζύμης σε mg/l.

Συγκέντρωση λυσοζύμης mg/l	Διάμετρος (mm)
16000	18,2±0,7
12000	17,24±0,3
8000	16,57±0,2
4000	15,6±0,09
2000	14,18±0,2
1000	13,15±0,1

Με βάση τη συγκέντρωση της λυσοζύμης στους μάρτυρες και τις διαμέτρους των δίσκων ανάσχεσης, που προέκυψαν από τους μάρτυρες της λυσοζύμης, κατασκευάστηκε το Διάγραμμα 1.4.1 και η πρότυπη καμπύλη, από τη γραμμική εξίσωση της οποίας, προέκυψαν οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των δειγμάτων γάλακτος. Οι συγκεντρώσεις λυσοζύμης στα δείγματα γάλακτος, αναφέρονται στον Πίνακα 1.4.3 και οι διαμέτροι των δίσκων ανάσχεσης που σχηματίστηκαν κατά την προσθήκη στα βοηθία των δειγμάτων γάλακτος αναφέρονται στον Πίνακα 1.4.2. Τα δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν έπειτα από τέσσερις δειγματοληψίες, σε έξι ζώα.

Πίνακας 1.4.2 Διάμετροι των δίσκων ανάσχεσης των δειγμάτων γάλακτος.

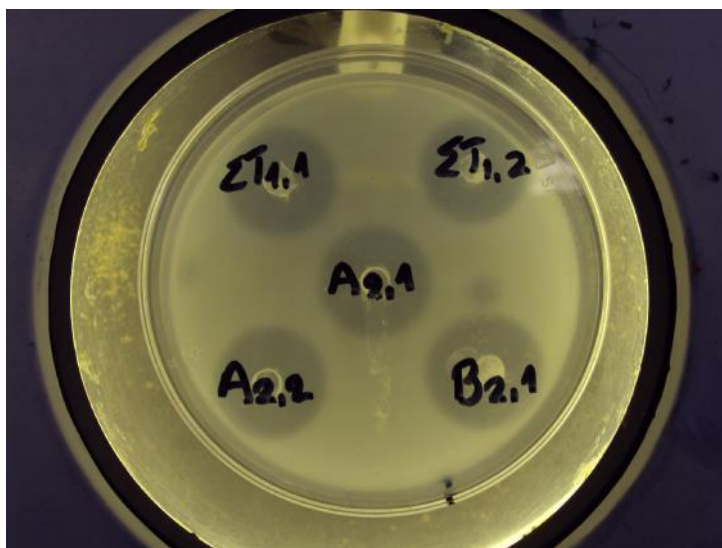
Δείγματα γάλακτος από 4 δειγματοληψίες, σε 6 ζώα	Διάμετρος (mm)
A	17,16±0,8
B	16,76±0,9
Γ	17,4±0,8
Δ	17,12±0,4
E	16,96±0,5
ΣΤ	16,31±0,8

Στην Εικόνα 1.4.1, απεικονίζονται οι δίσκοι ανάσχεσης του *Micrococcus lysodeikticus* στο εμπλουτισμένο άγαρ, λόγω της δράσης της λυσοζύμης, σε συγκεντρώσεις των 16.000 και 12.000 mg/l. Στην Εικόνα 1.4.2, απεικονίζονται οι δίσκοι ανάσχεσης του *Micrococcus lysodeikticus*, λόγω της δράσης της λυσοζύμης που περιέχεται στο γάλα του όνου.

Εικόνα 1.4.1 Απεικόνιση δίσκων ανάσχεσης λόγω της δράσης της καθαρής λυσοζύμης, σε τρυβλίο με εμβολιασμένο άγαρ με *Micrococcus lysodeikticus*. Η συγκέντρωση της λυσοζύμης είναι 16.000 και 12.000 mg/l.

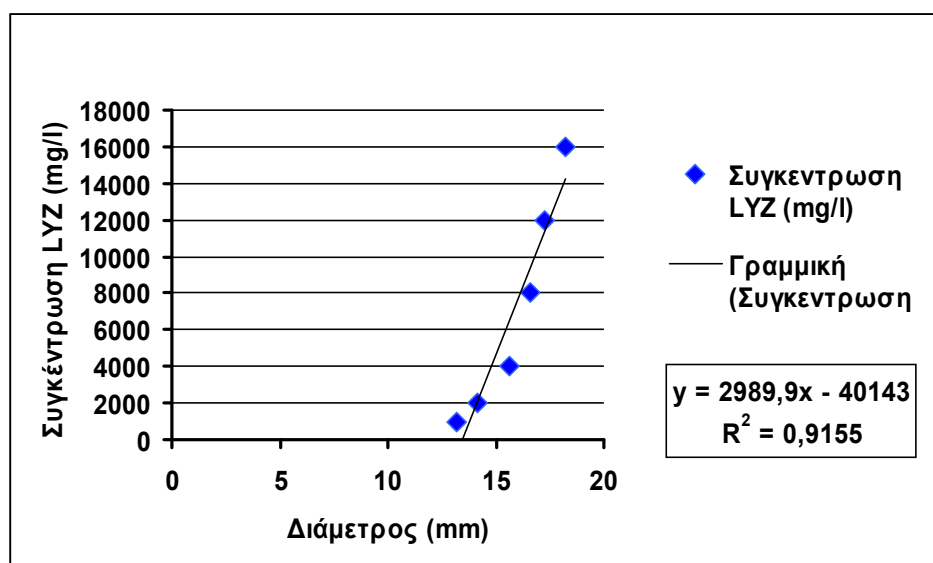


Εικόνα 1.4.2 Απεικόνιση δίσκων ανάσχεσης λόγω της δράσης της λυσοζύμης του γάλακτος όνου.



Σύμφωνα με την καμπύλη του Διαγράμματος 1.4.1, διαπιστώνεται στους μάρτυρες λυσοζύμης, ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, αυξάνεται αντίστοιχα και η διάμετρος των δίσκων ανάσχεσης.

Διάγραμμα 1.4.1 Πρότυπη καμπύλη της συγκέντρωσης της λυσοζύμης που αφορά τους μάρτυρες. Δίδεται η γραμμική εξίσωση της συγκέντρωσης.



- Από την εξίσωση $y = 2989,9x - 40143$, αντικαθιστώντας το x με τις διαμέτρους από τον Πίνακα Γ.2, προκύπτουν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων γάλακτος, στον Πίνακα 1.4.3..

Πίνακας 1.4.3 Συγκέντρωση λυσοζύμης στα δείγματα γάλακτος όνου σε mg/l.

Δείγματα γάλακτος από 4 δειγματοληψίες, σε 6 ζώα	Συγκέντρωση λυσοζύμης (mg/l)
A	11.163,6
B	9.967,7
Γ	11.881,2
Δ	11.044,1
E	10.565,7
ΣΤ	8.622,2
M.O.	10.540,7±1135,5

Διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση της λυσοζύμης, στα δείγματα γάλακτος έξι ζώων, τα οποία εκτρέφονταν όλα υπό τις ίδιες συνθήκες και λάμβαναν παρόμοιο σιτηρέσιο, κυμαίνεται από 8.620 έως 11.880 mg/l με μέσο όρο τις 10.540 mg/l. Η διαφορά στην συγκέντρωση της λυσοζύμης, που παρουσιάζεται ανάμεσα στα ζώα, οφείλεται στο ότι τα ζώα ανήκουν σε διαφορετικές φυλές και κάθε φυλή προέρχεται από διασταυρώσεις, διαφορετικών φυλών και επίσης, το κάθε ζώο βρίσκεται σε διαφορετική φάση της γαλακτοπαραγωγής. Συνεπώς τα δείγματα γάλακτος, δεν

αποτελούν συγκρίσιμα μεγέθη μεταξύ τους, για να μπορεί να εξαχθεί γενικό, ποιοτικό συμπέρασμα για τη συγκέντρωση της λυσοζύμης στο γαϊδουρινό γάλα.

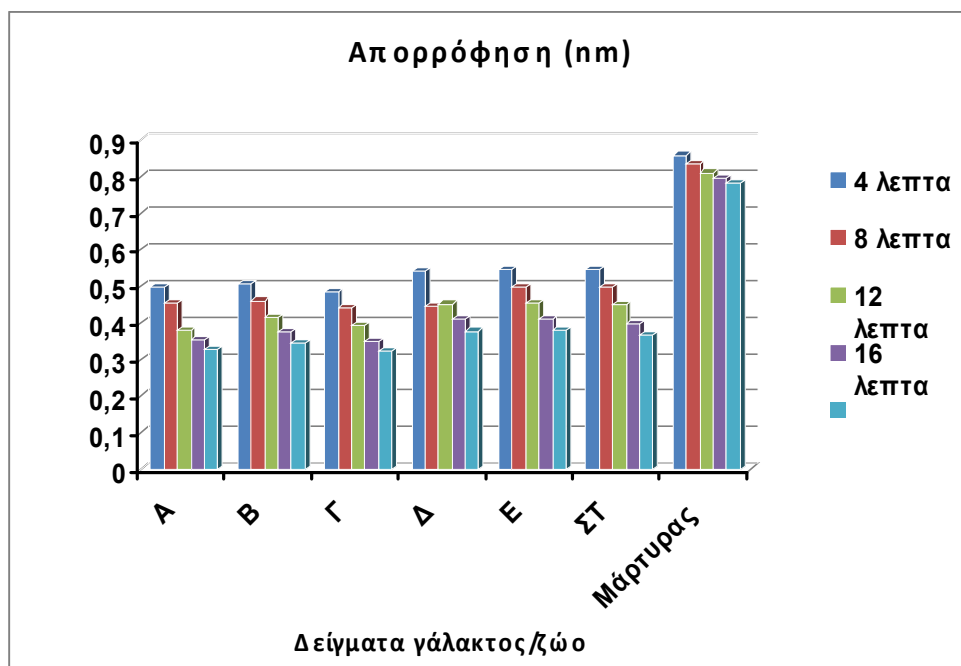
1.4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης λυσοζύμης με τη νεφελομετρική μέθοδο

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της λυσοζύμης και την απόδειξη της επίδρασής της, στην ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού που έχει ορισθεί ως δείκτης όπως είναι ο *Micrococcus lysodeikticus*.

Σκοπός της μεθόδου, ήταν να διαπιστωθεί, αν υπάρχει, σταδιακή μείωση της απορρόφησης στα δείγματα του γάλακτος όνου, σε σχέση με το δείγμα του μάρτυρα, που δεν περιείχε το ένζυμο, στη διάρκεια του χρόνου. Η καταγραφή της μείωσης της απορρόφησης στα 570 nm, απεικονίζεται στο Διάγραμμα 1.4.2.1. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μείωση της απορρόφησης, στα δείγματα γάλακτος, με την πάροδο του χρόνου, καθώς οι μετρήσεις της απορρόφησης έχουν ληφθεί σε πέντε επαναλήψεις, κάθε τέσσερα λεπτά. Στο μάρτυρα, η απορρόφηση ήταν σταθερή, καθώς δεν περιλάμβανε το ένζυμο.

Συνεπώς, σύμφωνα με το διάγραμμα, διαπιστώνεται η δράση της λυσοζύμης του γάλακτος όνου, ενάντια στον μικροοργανισμό δείκτη, *M. lysodeikticus*. Η δράση της λυσοζύμης, εντοπίζεται το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, καθώς προκαλεί τη διάσπασή του και με αυτόν τον τρόπο, το διάλυμα γίνεται περισσότερο διαυγές άρα μειώνεται η απορρόφηση, με την πάροδο του χρόνου. Στο δείγμα του μάρτυρα, δεν περιλαμβάνεται λυσοζύμη, οπότε η απορρόφηση είναι μεγάλη.

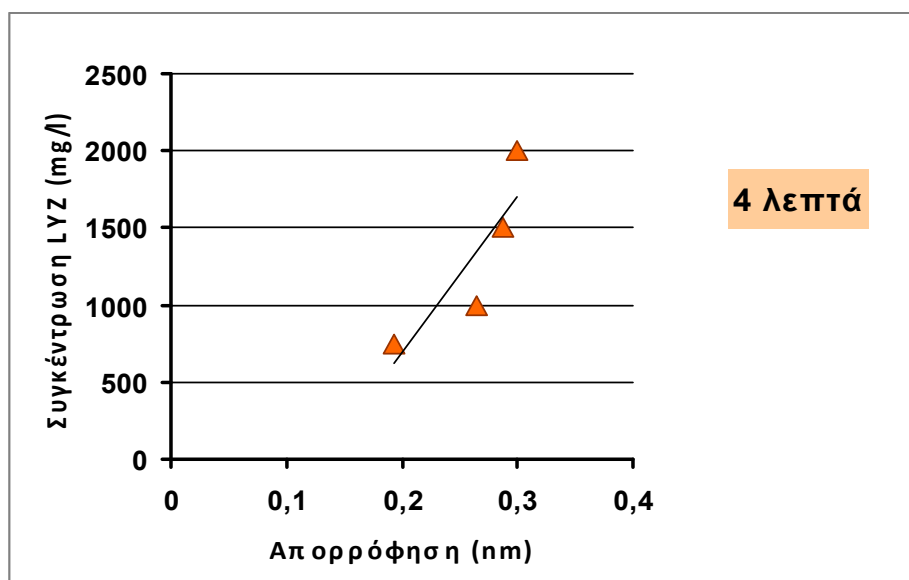
Διάγραμμα 1.4.2.1 Απορρόφηση σε nm, στα δείγματα γάλακτος όνου και στο δείγμα του μάρτυρα, με την πάροδο του χρόνου.



Επίσης, μέσω της μεθόδου, είναι δυνατό να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις της λυσοζύμης στα δείγματα γάλακτος. Με βάση τις μετρήσεις της απορρόφησης για κάθε τέσσερα λεπτά, στα δείγματα της καθαρής λυσοζύμης, κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες. Από τις αντίστοιχες γραμμικές εξισώσεις, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της λυσοζύμης στα δείγματα του γαϊδουρινού γάλακτος.

Παρατίθεται, το διάγραμμα που κατασκευάστηκε με βάση τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 570 nm, στο μάρτυρα (καθαρή λυσοζύμη), για το χρόνο των πρώτων τεσσάρων λεπτών.

Διάγραμμα 1.4.2.2 Πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης (570nm) στο μάρτυρα.



Με βάση τη γραμμική εξίσωση, της πρότυπης καμπύλης του Διαγράμματος 1.4.2.2, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των έξι δειγμάτων γάλακτος, που αντιστοιχούν σε έξι διαφορετικά ζώα.

- Γραμμική εξίσωση : $\psi = 10135\chi - 1332,7$, για τα 4 πρώτα λεπτά απορρόφησης.

Οι πρότυπες καμπύλες που αντιστοιχούν στις επόμενες επαναλήψεις, σε χρόνο 8,12,16 και 20 λεπτών παρουσίας της λυσοζύμης στα διαλύματα του *Micrococcus lysodeiktiticus* , παραθέτονται στο παράρτημα.

Οι συγκεντρώσεις της λυσοζύμης, των δειγμάτων γαϊδουρινού γάλακτος, που υπολογίστηκαν από τις γραμμικές εξισώσεις, αναφέρονται στον Πίνακα 1.4.2.1 (βλ. παράρτημα). Η τιμή της λυσοζύμης, στα δείγματα γάλακτος, υπολογίστηκε στα πρώτα 4 λεπτά της απορρόφησης και είναι 3.900 mg/l. Συγκριτικά, με τη μέθοδο lysoplate, κατά την οποία οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 8.000 έως 11.000 mg/l, παρατηρείται διαφορά η οποία όμως έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία σύμφωνα με τους Greenwald και Moy (1976). Το συμπέρασμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς, όπως έχει αναφερθεί, η μέθοδος lysoplate δίνει 3-4 φορές μεγαλύτερα ποσοστά λυσοζύμης από τη νεφελομετρική μέθοδο.

Στη βιβλιογραφία, η συγκέντρωση της λυσοζύμης του γαϊδουρινού γάλακτος, έχει καταγραφεί ότι κυμαίνεται από 1.000 (Vincenzetti et al., 2007) έως 4.000 mg/l (Guo et al., 2007).

1.5 Ποιοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης του γάλακτος όνου

1.5.1 Έλεγχος της δράσης της λυσοζύμης γάλακτος όνου με τη μέθοδο του Delvotest

Το αποτέλεσμα της εφαρμογής του Delvotest στο γάλα της όνου, ήταν θετικό στην παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών. Το άγαρ που χρησιμοποιείται στο τεστ, δεν αποχρωματίστηκε, συνεπώς ο μικροοργανισμός που είχε εμβολιαστεί στο άγαρ, *Bacillus stearothermophilus*, δεν αναπτύχθηκε. Είναι πιθανό, η παρουσία της λυσοζύμης στο γάλα της όνου, να ήταν υπεύθυνη για την παρεμπόδιση του μικροοργανισμού. Η δράση κάποιας μορφής αντιβιοτικού, όπως οι πενικιλίνες ή οι κεφαλοσπορίνες θα έδιναν παρόμοιο αποτέλεσμα, συνεπώς το ένζυμο λυσοζύμη παρουσιάζει τον ίδιο τρόπο δράσης με τα αντιβιοτικά, ενάντια στα βακτήρια. Οι αντιβιοτικές ουσίες διασπών το στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων (Gram (+),(-)), ενώ παρόμοια δράση έχει και η λυσοζύμη στα Gram (+) βακτήρια. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, *Bacillus stearothermophilus*, ανήκει στα Gram (+) βακτήρια.

1.5.2 Εφαρμογή SDS – PAGE ηλεκτροφόρησης

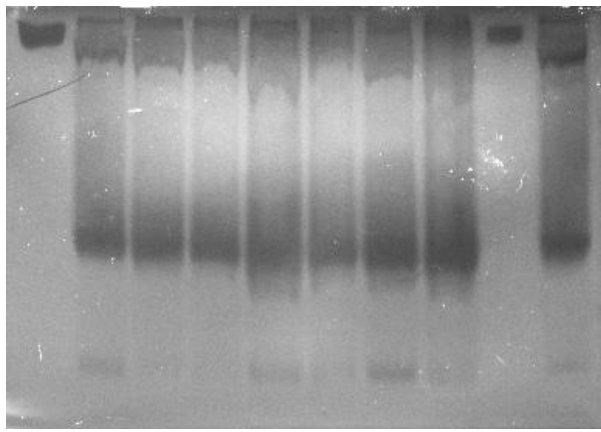
Τα δείγματα γάλακτος όνου, αφού αφαιρέθηκε το λίπος, ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της λυσοζύμης. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε καθαρή λυσοζύμη. Το gel που παρασκευάστηκε ήταν 15% ακρυλαμίδα-δισ ακρυλαμίδης το οποίο χρησιμοποιείται στην ανάλυση των πρωτεϊνών του ορού, λόγω του μικρού τους μοριακού βάρους, ενώ για την ηλεκτροφόρηση των καζεϊνών του γάλακτος, χρησιμοποιείται αντίστοιχο gel 12%.

Στις Εικόνες 1.5.1 και 1.5.2, απεικονίζονται στις θέσεις 1, 2, 3, 4 οι μπάντες της λυσοζύμης, με την θέση 3 να αποδίδεται η σωστότερη συγκέντρωση λυσοζύμης η οποία ήταν 250mg/l. Στις θέσεις από Α έως Θ στην Εικόνα 1.5.1 και από I έως O στην Εικόνα 1.5.2, βρίσκονται τα δείγματα του γάλακτος όνου και μπορεί να διακριθεί η μπάντα της λυσοζύμης σε κάθε δείγμα.

Η επόμενη μπάντα που εμφανίζεται στα δείγματα γάλακτος, πιθανόν να αντιστοιχεί την α-λακταλβουμίνη, η οποία έχει παρόμοιο μοριακό βάρος, με τη λυσοζύμη (Vincenzetti et al., 2008).

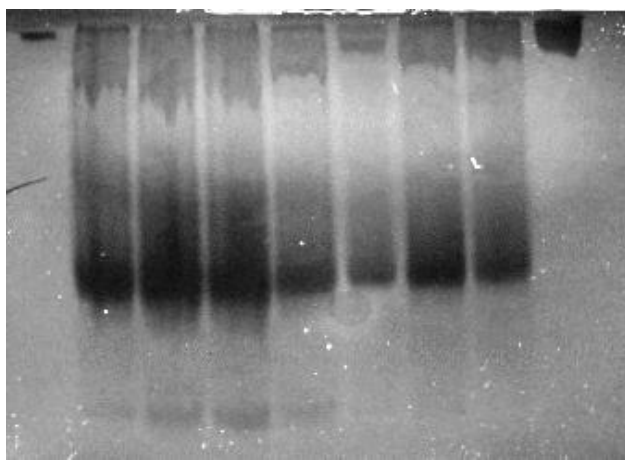
Εικόνα 1.5.1 Προφίλ ηλεκτροφόρησης σε 15% SDS gel ακρυλαμίδης, με χρώση Coomassie Brilliant Blue, διακρίνεται στις θέσεις 1 και 2, η καθαρή λυσοζύμη και στις υπόλοιπες θέσεις τα δείγματα γάλακτος όνου και λυσοζύμη που περιέχουν.

1 A B Γ Δ E Z H 2 Θ



Εικόνα 1.5.2 Προφίλ ηλεκτροφόρησης, στις θέσεις 3 και 4 διακρίνεται η καθαρή λυσοζύμη και στις υπόλοιπες, τα δείγματα γάλακτος όνου.

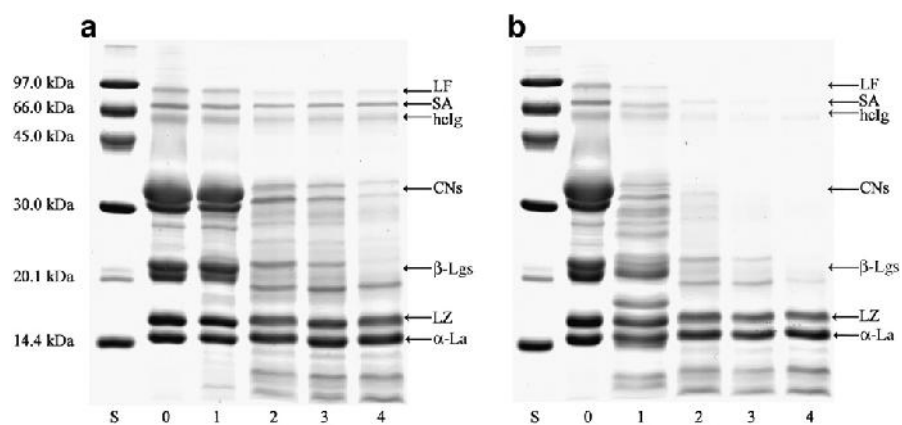
3 I K Λ M N Ξ Ο 4



Σύμφωνα με την Vincenzetti et al. 2007, το μοριακό βάρος της λυσοζύμης του γάλακτος όνου, προσδιορίστηκε στα 14 kDa. Τα μοριακά βάρη της λυσοζύμης του γάλακτος διάφορων ζώων, αναφέρονται παρακάτω. Η λυσοζύμη του βουβαλίσσιου γάλακτος έχει μοριακό βάρος 16 kDa και του λευκώματος του αυγού 14,3 kDa (Subhadra και Kansal, 2001). Η λυσοζύμη του ανθρώπινου γάλακτος έχει μοριακό βάρος 15 kDa (Finkelstein et al., 1996), του γάλακτος καμήλας (Elagami et al., 1996) και του αλόγου είναι 14,4 kDa, ενώ η λυσοζύμη του αγελαδινού γάλακτος (Eitenmiller et al., 1975) έχει μοριακό βάρος 18 kDa.

Στην Εικόνα 1.5.3 απεικονίζονται οι μπάντες διαφόρων πρωτεϊνών έπειτα από SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση. Οι τελευταίες μπάντες αποδίδουν την λυσοζύμη (LYZ) και την α-λακταλβουμίνη (α-La).

Εικόνα 1.5.3 Προφίλ ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών γάλακτος όνου (Tidona et al., 2011)



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Κατά τη σύγκριση του γαϊδουρινού γάλακτος με τα είδη γάλακτος, που χρησιμοποιούνται ήδη από τον καταναλωτή, διαπιστώθηκε ότι το γαϊδουρινό γάλα παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό λίπους, μόλις 1%, παράγοντας ο οποίος ευνοεί την ένταξή του στο πρόγραμμα διατροφής του ανθρώπου. Το αγελαδινό γάλα έχει ποσοστό λίπους 3,9%, το αίγιο 3,5% και το πρόβειο 6% και πλέον, λόγω του μοντέρνου τρόπου διαβίωσης, που εύκολα οδηγεί στην αύξηση του σωματικού βάρους, προτιμώνται τρόφιμα με χαμηλά ποσοστά λίπους. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η σύσταση του γαϊδουρινού γάλακτος, είναι παρόμοια με αυτή του ανθρώπινου γάλακτος. Τα ποσοστά πρωτεϊνών και λακτόζης των δύο ειδών, είναι παρόμοια, ενώ το ποσοστό πρωτεϊνών και των δύο είναι χαμηλότερο από εκείνο των υπολοίπων ειδών γάλακτος. Το ποσοστό της λακτόζης είναι μεγαλύτερο στο ανθρώπινο και το γάλα όνου από τα υπόλοιπα είδη γάλακτος, ενώ το ποσοστό λίπους στο γαϊδουρινό γάλα είναι το χαμηλότερο όλων. Επίσης, το ανθρώπινο γάλα είναι πιο πλούσιο σε ενέργεια από το γαϊδουρινό. Σύμφωνα με τους Oftedal και Jenness (1988), το χαμηλό ενεργειακό επίπεδο που παρατηρείται στο γάλα της όνου, οφείλεται στις υψηλές ποσότητες του εκκρινόμενου γάλακτος, το οποίο είναι απαραίτητο για την κάλυψη των θρεπτικών απαιτήσεων του νεαρού ζώου, για την ταχεία ανάπτυξή του.
- Το γάλα της όνου, χαρακτηρίζεται από τη βιβλιογραφία, ως προϊόν με χαμηλό μικροβιακό πληθυσμό και έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, μέχρι σήμερα και αφορούν την υγιεινή του γάλακτος όνου. Κατά τη μελέτη, της μικροβιολογικής κατάστασης του γαϊδουρινού γάλακτος, στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε ότι το νωπό γάλα όνου παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό μικροοργανισμών, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος που καταναλώνονται. Μελετήθηκε η παρουσία δέκα διαφορετικών κατηγοριών μικροοργανισμών από τους οποίους, οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης χλωρίδα, των Εντερόκοκκων, των Λακτόκοκκων, των Ζυμών – Μυκήτων και των θερμοανθεκτικών βακτηρίων, βρέθηκαν να είναι χαμηλότεροι στο εξεταζόμενο γάλα, από τους αντίστοιχους πληθυσμούς του γαϊδουρινού γάλακτος στις συγκεκριμένες κατηγορίες μικροοργανισμών, στη βιβλιογραφία. Οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί ενδημούν στο περιβάλλον και είναι πιθανό να εντοπιστούν στο γάλα. Επίσης, ο αριθμός των σωματικών κυττάρων του γαϊδουρινού γάλακτος, κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά του αγελαδινού γάλακτος.
- Μελετήθηκε, η πιθανή αναχαιτιστική δράση του γαϊδουρινού γάλακτος στην ανάπτυξη οκτώ σημαντικών για την ανθρώπινη υγεία, παθογόνων βακτηρίων

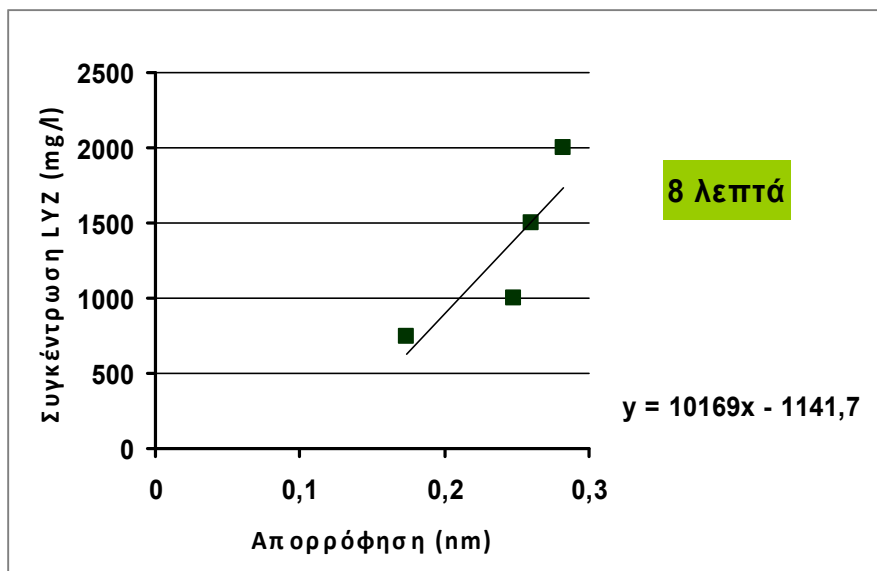
τα οποία μολύνουν τα τρόφιμα και προκαλούν τροφιμογενείς ασθένειες, στον άνθρωπο. Τα παθογόνα βακτήρια που μελετήθηκαν, ήταν τα εξής, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *E. coli* 015, και αποτελούν μικροοργανισμούς που ενδημούν στο περιβάλλον και συχνά μολύνουν τροφές όπως το γάλα, τα τυριά το κρέας και τα αυγά. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι το γαϊδουρινό γάλα, δεν παρουσιάζει κάποια επίδραση στην ανάπτυξη τους.

- Μέσω της μεθόδου lysoplate, η οποία εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της λυσοζύμης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της στο γάλα του όνου. Διαπιστώθηκε ότι στα δείγματα γάλακτος όνων της Κυπραϊκής και Αρκαδικής φυλής, η συγκέντρωση της λυσοζύμης κυμάνθηκε από 8.000 έως 11.000 mg/L. Στη βιβλιογραφία, η ανώτερη τιμή συγκέντρωσης λυσοζύμης που έχει προσδιορισθεί είναι 4.000 mg/L (Guo et al., 2007).
- Κατά την εφαρμογή της νεφελομετρικής μεθόδου στο γαϊδουρινό γάλα, διαπιστώθηκε αρχικά η παρουσία λυσοζύμης στο γαϊδουρινό γάλα λόγω της δράσης της στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, *Micrococcus lysodeikticus*. Επίσης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων γάλακτος όνου, και η τιμή της κυμαίνεται στα 3.000 mg/l. Η τιμή που προσδιορίστηκε με τη νεφελομετρική μέθοδο ήταν χαμηλότερη από αυτή της μεθόδου lysoplate. Όμως, αυτή η διαφορά ήταν αναμενόμενη, σύμφωνα με τους Greenwald και Moy (1976), καθώς η μέθοδος lysoplate δίνει περίπου 3-4 φορές υψηλότερες τιμές. Τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων προσδιορισμού της λυσοζύμης, έδειξαν τη διακύμανση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, ανάμεσα στα δείγματα γάλακτος των ζώων. Τα ζώα, όπως έχει αναφερθεί, βρίσκονταν σε διαφορετική φάση της γαλακτοπαραγωγής τους και σύμφωνα με την Vincenzetti (2008), η συγκέντρωση της λυσοζύμης μειώνεται, όσο προχωρά η γαλακτοπαραγωγή. Επίσης, τα ζώα ανήκουν σε δύο διαφορετικές φυλές.
- Ο προσδιορισμός της λυσοζύμης, έγινε και μέσω της ηλεκτροφορητικής μεθόδου σε gel. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε καθαρή λυσοζύμη, με την πάντα της οποίας ταυτίστηκαν οι πάντες της λυσοζύμης του γάλακτος όνου.
- Στην παρούσα εργασία, δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση του γαϊδουρινού γάλακτος, σε συγκεκριμένα παθογόνα, αλλά στη δοκιμή για την παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα, με την εφαρμογή του Delvotest, διαπιστώθηκε ότι το γαϊδουρινό γάλα είναι θετικό στην παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών. Όμως, πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο τεστ, έχει παρασκευασθεί για την ανίχνευση αντιβιοτικών στο αγελαδινό γάλα, συνεπώς είναι εξειδικευμένο για αυτό το είδος γάλακτος και δεν μπορεί να δώσει ασφαλές αποτέλεσμα για διαφορετικά είδη γάλακτος. Το Delvotest, περιλαμβάνει τον μικροοργανισμό *Bacillus stearothermophilus*, ως δείκτη στη

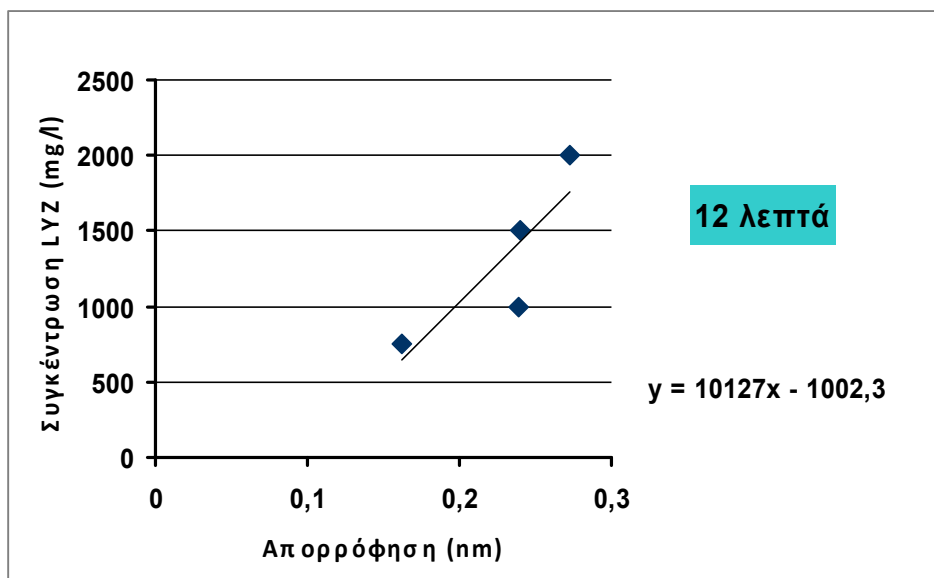
δράση των αντιβιοτικών. Είναι πιθανό, το αποτέλεσμα του τεστ να προήλθε από τη δράση της λυσοζύμης του γαϊδουρινού γάλακτος ενάντια στον μικροοργανισμό. Ο μικροοργανισμός ανήκει στα θετικά κατά Gram βακτήρια και η λυσοζύμη παρουσιάζει εξειδικευμένη δράση, σε αυτή την κατηγορία βακτηρίων. Συνεπώς, είναι πιθανό να επεξηγηθεί και με αυτόν τον τρόπο το αποτέλεσμα του συγκεκριμένου τεστ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

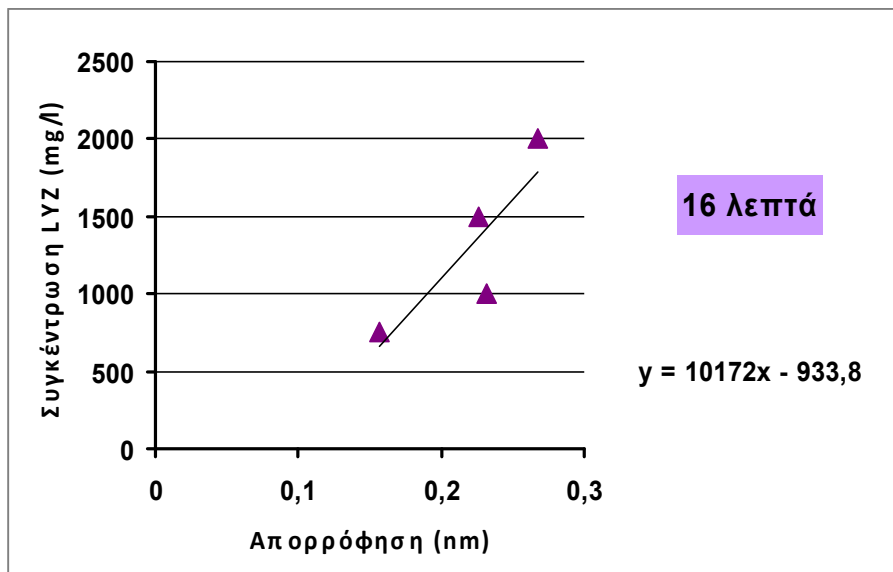
Διάγραμμα 1.4.2.3 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα δείγματα του μάρτυρα, στα 8 λεπτά παρουσίας της λυσοζύμης στο διάλυμα του *Micrococcus lysodeikticus*, με τη γραμμική εξίσωση.



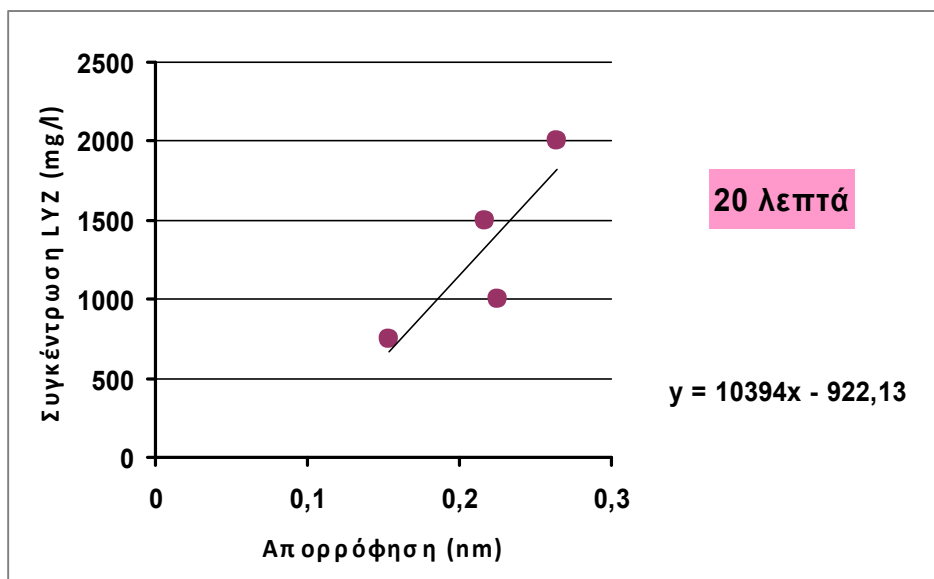
Διάγραμμα 1.4.2.4 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα δείγματα του μάρτυρα, στα 12 λεπτά παρουσίας της λυσοζύμης εναντίον του μικροοργανισμού.



Διάγραμμα 1.4.2.5 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα δείγματα του μάρτυρα, στα 16 λεπτά, με την γραμμική εξίσωση.



Διάγραμμα 1.4.2.6 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα δείγματα του μάρτυρα, στα 20 λεπτά, με τη γραμμική εξίσωση.



Οι διαφορές της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, ανάμεσα στα δείγματα γάλακτος των ζώων, πιθανόν να οφείλονται στις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα ζώα, καθώς ανήκουν σε διαφορετικές φυλές ή ακόμα και αυτά που προέρχονται από την ίδια φυλή, δεν αποτελούν καθαρές σειρές. Επίσης, τα ζώα βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της γαλακτοπαραγωγής. Η πρωτική τάση της λυσοζύμης στο χρόνο, για κάθε δείγμα γάλακτος, πιθανόν να οφείλεται σε καθίζηση του δείγματος και συνεπώς ακολουθεί μείωση της απορρόφησης. Για τους παραπάνω λόγους μπορεί να εξαχθεί ένα γενικό ποιοτικό συμπέρασμα για τη συγκέντρωση της λυσοζύμης.

Πίνακας 1.4.2.1 Συγκεντρώσεις λυσοζύμης γάλακτος όνου με βάση την απορρόφηση, στα 570 nm.

Ζώο/LYZ	Lyz (mg/l) 4 λεπτά	Lyz (mg/l) 8 λεπτά	Lyz (mg/l) 12λεπτά	Lyz (mg/l) 16λεπτά	Lyz (mg/l) 20λεπτά
A	3718	3483	2848	2656	2472
B	3803	3546	3200	2881	2678
Γ	3584	3335	2990	2616	2432
Δ	4145	3386	3577	3235	3005
E	4214	3941	3584	3236	3027
ΣΤ	4192	3924	3542	3104	2875

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd-El-Salam, M. H., 1992. A comparative study on milk proteins of some mammals. 281–287, *5th Egyptian Conf. Dairy Sci. Technol.*, Egypt.
- Agamy E. I., 1992. Antimicrobial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J of Dairy Research*, 59:169-175.
- Alabiso, M., 2008. The effects of different milking intervals and milking times per day in jennet milk production, *Animal 1*, 1-5.
- Benkerroum N., 2004. Antimicrobia; activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Inter J of Dairy Tech*, 57: 39-43.
- Bonomi F. 1994. Thermal sensitivity of mares' milk proteins. *J. Dairy Res.* 61: 419–422.
- Businco L., 2000. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:1031–1034.
- Carroccio A., 1999. Cross reactivity between milk proteins of different animals, *Clin. Exp. Allergy* 29:1014–1016.
- Carroccio, A., 2000. Intolerance to hydrolyzed cow's milk protein in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical and Experimental Allergy*, 30:1597-1603.
- Chandan, R. C., 1965. Lysozyme, lipase, and ribonuclease in milk of various species. *J of Dairy Research*, 51:606-607.
- Chatterton, D. E. W., 2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formula: Research on biological functions. *Food Science and Technology*, 15: 373–383.
- Chiavari, C 2005. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Lait* 85, 481-490.
- Chiofalo, B., 2004 I parametri chimico-fisici del latte di asina Ragusana nel corso della lattazione, *Proceedings of the 6th congress 'Nuove acquisizioni in materia di Ippologia*, 77-84.
- Coppola, R. 2002. Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*, 52, 55-60.
- Criscione A., 2009. Donkey's milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *International Dairy J.*, 19: 190-197.

- Dell'orto, V., 1993. Produzione e composizione di latte equino: osservazioni sperimentali, *Proceedings of the S.I.S.Vet.* XLVII, 2073-2077.
- De Wit, J. N. (1998). Marschall Rho[^]ne-Poulenc award lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597–608.
- Donnet-Hughes, A., 2000. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor- β . *Immunol. Cell Biol.* 78:74-79.
- Doreau M. 1991. Le lait de jument, *Prod. Anim.* 4, 297-302.
- Egito, A.S., 2002. Separation and characterization of mares' milk as1-, b-, k-caseins, g-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. *Journal of Dairy Science*, 85, 697-706.
- Eitenmiller, R. R., 1975. Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme. *Journal of Dairy Science* 59 834-839.
- Elagamy, E. I., 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research* 59 169-175.
- Elagamy, E. I., 1996. Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal* 6 129-145.
- Fantuz F., 2001. Study on protein fractions of donkey milk, *Proceedings of 14th Congress ASPA (Associazione Scientifica di Produzioni Animali)*, Firenze, Italy, 635–637.
- Fantuz. F., 2007. Nutritional status of dairy asses managed with different machine milking strategies Italian. *Journal of Animal Science*, Volume 6, Issue SUPPL. 1, 2007, Pages 647-649.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2005. FAOSTAT Data. <http://faostat.fao.org/site/409/DesktopDefault.aspx?PageID=409>
- Finkelstein, M. B. & Finkelstein, R. A. 1982 Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. *FEBS Letters* 144 1-5.
- Fox, P.F., 1998. Milk proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London, p. 146.
- Giosuè, C., 2008. Jennet milk production during the lactation in a Sicilian farming system, *Animal* 2, 1491-1495.
- Greenwald R. and Moy W. W., 1976. Effect of agarose variability on the measurement of lysozyme activity. *Clinica Chimica Acta*, 13 299-305.

- Guo H. Y., 2007. Composition, physiochemical properties, nitrogen Fraction Distribution, and amino acid profile of donkey milk, *J. Dairy Sci.* 90:1635-1643.
- Hambling, S. G., 1992. Beta-lactoglobulin. In F. P. Fox (Ed.). *Advanced Dairy Chemistry* Vol. 1, 141–190. London: Elsevier Applied Science.
- Herrouin M., 2000. New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins, *J. Protein Chem.* 19, 105-115.
- Iacono G., 1992. Use of ass's milk in multiple food allergy. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* 14:177-181.
- Ivankovic A., 2009. Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littoral-Dinaric ass, *Mljekarstvo* 59 (2), 107-113.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Maidment C., 2009. A study into measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing foods. Vol. 39 No. 1, 29-35 *q Emerald Group Publishing Limited*.
- Malacarne, M., 2002. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk, *International Dairy Journal* 12, 869-877.
- Min S., 2005. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci*, 70: 332-8.
- Miranda, G., 2004. Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk. *Proteomics* 4:2496–2509.
- Monti G., 2008. Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatric Allergy and Immunology* 19: 85–88.
- Monti G., 2007. Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18:258-264.
- Muraro, M. A., 2002. Soy formulas and nonbovine milk. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89(Suppl.1):97–101.
- Oftedal O.T., Jenness R., 1988. Interspecies variation in milk composition among horses, zebras and asses (*Perissodactyla: Equidae*), *J. Dairy Res.* 55: 57–66.
- Pagliarini E., 1993. Chemical and physical characteristics of mare's milk. *Italian Journal of Food Science* ,4, 323-332.

- Pilla R., 2010. Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow – up study, *J of Dairy Research*, 77: 392-397.
- Polidori P., 2009. Donkey milk production: state of the art, *Anim Sci*. Vol 8: 677-683.
- Proctor, V.A. and Cunningham, F.E., 1988. “The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 26, No. 4, 359-95.
- Pugh D. G. Donkey Reproduction, 2002. *Annual Convention of AAEP*.
- Restani, P., 2002. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89(Suppl. 1):11-15.
- Salimei E. 2004. Composition and characteristics of ass’s milk. *Anim. Res.* 53: 67–78.
- Salimei, E., 2005. Different fibre sources in dairy ass’s diet: effects on milk yield and composition, *Italian Journal of Animal Science 4* (suppl. 2), 430-432.
- Salimei E. 2010. Advances on *Equus asinus* as a dairy species, *Annual Meeting for Animal Production*, EAAP.
- Sotirov, L., 2004. Lysozyme and complement concentrations in horses, donkeys and mules.
- Subhadra Pryadarshini and Vinod K. Kansal, 2001. Purification, characterization, antibacterial activity and N-terminal sequencing of buffalo-milk lysozyme. Division of Animal Biochemistry. National Dairy Research Institute. Karnal. India.
- Taha, N. M., and G. Kielwein. 1990. Pattern of peptide-bound and free amino acids in camel, buffalo and ass milk. *Milchwissenschaft* 45:22–25.
- Uniacke – Lowe T., 2010. Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance, *Inter Dairy J.* 20: 609-629.
- Vincenzetti S., 2008. Donkey’s milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*. 106: 640-649.
- Vincenzetti, S., 2007. Nutritional characteristics of donkey’s milk protein fraction. In: *J.R. Ling* (ed.) *Protein Research Trends*. Nova Science Publishers inc., New York, USA, 207-225.
- Vincenzetti, S., 2005. Donkey’s milk caseins characterization. *Ital. J. Anim. Sci.* 4(Suppl. 2):427-429.
- White, C.H. 2001. Testing milk and milk products. In E. H. Marth & J. L. Steele (Eds), *Applied dairy microbiology* 645-680.
- Wolter R., 1996. Osteocondrosi e alimentazione nel cavallo. *Riv. SIDI*, 2, 2, 27-

32.

Zhang X. Y. 2008. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage, *Food Control*, 19: 1191-1195.

Ψαρράκης Μ. 2011. Εκτροφή όνων: Γενικές αρχές και υγιεινή. *Πτυχιακή Μελέτη*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας. Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών.

Δ1, http://en.wikipedia.org/wiki/Sheep_milk

Δ2, [http://en.wikipedia.org/wiki/Asses%27_milk_\(Donkey%27s_milk\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Asses%27_milk_(Donkey%27s_milk))

Δ3, <http://www.slideshare.net/lwolberg/donkey-milk>

Δ4, http://www.eaap.org/Crete/Papers/06_Colavita.pdf

Δ5, <http://aem.asm.org/cgi/reprint/70/9/5644>

Δ6, http://books.google.gr/books?id=C0sO1gNFWLAC&pg=PA156&lpg=PA156&dq=raw+cow+milk+composition+microbiology+generally&source=bl&ots=mpwtE6aAZn&sig=Q1nV9bWWT9DNT_WFmSxZIDnqWG8&hl=el#v=onepage&q&f=false

Δ7, <http://www.acad.carleton.edu/curricular/BIOL/resources/rlink/lab1p5.html>

Δ8, <http://www2.heidelberg.edu/depts/chm/lypozyme.html>

Δ9, <http://en.wikipedia.org/wiki/Donkey>

Δ10, <http://www.equineseek.com/donkey/e/Donkeys-Mules/Donkey-Breeds/>