

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΕΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ
ΣΤΑ ΖΥΜΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΓΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΚΗΣ Κ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΕΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ
ΣΤΑ ΖΥΜΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΓΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΚΗΣ Κ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζέρβας Γ. Καθηγητής (Επιβλέπων)

Οικονόμου Γ. Αν. Καθηγήτρια

Φεγγερός Κ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΕΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΤΑ
ΖΥΜΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΑΙΓΩΝ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζέρβας Γ. Καθηγητής

Λάμπρου Ν. Αν.Καθηγητής

Πολυσιού Μ. Καθηγητής

Οικονόμου Γ. Αν.Καθηγήτρια

Τσιπλάκου Ε. Επίκ. Καθηγήτρια

Φεγγερός Κ. Καθηγητής

Φλεμετάκης Ε. Επίκ.καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

A Περίληψη

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να εξετάσει αν ο χρόνος αποθήκευσης της ρίγανης (*Origanum vulgare subsp. hirtum*) μετά τη συγκομιδή της, η άλεση και η ανάμειξη αυτής στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών μειώνει την περιεκτικότητά της σε αιθέριο έλαιο. Οι μετρήσεις αυτές έδειξαν ότι στα αποξηραμένα φυτά ρίγανης παραμένει τουλάχιστον το 94 % των αιθερίων ελαίων που περιέχουν έξι μήνες μετά τη συγκομιδή και το 95,1 % μετά την άλεση και ανάμειξη αυτών στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών τέσσερις εβδομάδες μετά την ανάμειξη. Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων και στην γαλακτοπαραγωγή αιγών. Στο 1^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οκτώ αίγες φυλής Alpine οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες. Οι δύο ομάδες κατανάλωναν το ίδιο σιτηρέσιο με μόνη διαφορά ότι στο σιτηρέσιο της ομάδας της επέμβασης είχαν προστεθεί 20 g ξηράς δρόγης ρίγανης που περιείχαν 1g αιθέριου ελαίου. Από τις αίγες λαμβάνονταν δείγματα υγρού μεγάλης κοιλίας κάθε 15 ημέρες για χρονικό διάστημα 69 ημερών. Στα δείγματα αυτά προσδιορίστηκαν: το pH, η συγκέντρωση της αμμωνίας και των πτητικών λιπαρών οξέων, οι μικροβιακοί πληθυσμοί και ένας αριθμός πεπτικών ενζύμων (πρωτεάση, α-αμυλάση, κυταρινάση, ξυλανάση, λιπάση). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξήθηκε ($P < 0,05$) η συγκέντρωση της αμμωνίας στην ομάδα της διατροφικής επέμβασης καθ'όλη την πειραματική περίοδο. Εκ των μικροβιακών ενζύμων, παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεάσης ($P < 0,001$), ενώ εκ των μικροβιακών πληθυσμών παρατηρήθηκε μείωση των μεθανοβακτηρίων ($P < 0,05$) και του *Methanosphaera stadtmanae* ($P < 0,05$). Στο 2^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα αίγες φυλής Alpine οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες. Ο διατροφικός χειρισμός ήταν ίδιος με το πρώτο πείραμα. Από τις αίγες λαμβάνονταν δείγματα γάλακτος και αίματος για χρονικό διάστημα 30 ημερών. Στα δείγματα αυτά προσδιορίστηκαν: η χημική σύσταση του γάλακτος, ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα (δεσμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση, μεταφοράση γλουταθειόνης, οξειδάση γλουταθειόνης, ρεδοκτάση γλουταθειόνης, λακτουπεροξειδάση), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων του γάλακτος. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ($P < 0,001$), της υπεροξειδάσης ($P < 0,001$) και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης ($P < 0,001$).

Λέξεις κλειδιά: ρίγανη, αίγες, μηρυκαστικά, ζυμωτικά φαινόμενα, ποιότητα γάλακτος.

B Abstract

The objective of the present study was to determine if the storage time of the oregano after harvesting, milling and mixing this mixture of concentrates, reduces its content of essential oil. These measurements showed that in the dried oregano plants remains at least 94 % of essential oils six months after harvest, and 95.1 % after grinding and mixing them in a mixture of concentrated feed, four weeks after mixing. Then, the second objective was to study the effect of dietary addition of oregano (*Origanum vulgare subsp. Hirtum*) in ruminal fermentation and in milk production and quality in goats. In the first experiment, eight Alpine goats were divided into two equal groups. Both groups received the same diet except that in the ration of the treatment group were added 20 g dried oregano plant containing 1g of oregano essential oil. Rumen fluid samples were taken every 15 days for a period of 69 days. In those samples, the following parameters were determined: pH, the concentration of ammonia and volatile fatty acids, the microbial populations and several digestive enzymes (protease, α -amylase, cellulase, xylanase, lipase). The results showed that ammonia concentration was increased ($P<0,05$) throughout the experimental period. From the microbial enzymes, an increase of protease ($P<0,001$) was observed, while from the microbial populations a reduction of methanobacteria ($P<0,05$) and *Methanosphaera stadtmanae* ($P<0,05$) was observed. In the second experiment, twelve Alpine goats were divided into two equal groups. Dietary oregano addition was identical to the first experiment. Milk and blood samples were taken for a period of 30 days. In those samples, the chemical composition of milk, various antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, lactoperoxidase), the total antioxidant capacity and the concentrations of the milk fatty acids were determined. The dietary addition of oregano increased total antioxidant capacity ($P<0,001$), peroxidase ($P<0,001$) and glutathione reductase ($P<0,001$).

Keywords: Oregano, goats, ruminants, fermentation, milk quality.

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς το εργαστήριο χημείας και συγκεκριμένα προς τον κ. Μ., Πολυσίου και την κ. Δ., Δαφερέρα για την συνεργασία και άψογη επιστημονική βοήθεια που μου παρείχαν στο θέμα των αρωματικών φυτών, των αποστάξεων και των τεχνικών αναλύσεων των αιθέριων ελαίων κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Προς τον κ. Γ.Ζέρβα και την κ. Ε.Τσιπλάκου για την επιστημονική και καθοδήγηση και προς τον Χ.Πετρόπουλο για τη βοήθεια στα ζώα. Προς το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και συγκεκριμένα προς τον κ. Ν.Λάμπρου και κ. Ε. Φλεμετάκη για την ολοκλήρωση των εργαστηριακών αναλύσεων των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των μικροβιακών πληθυσμών αντίστοιχα.

Τέλος, εκφράζονται ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής και με υποστήριξαν ηθικά (την οικογένεια μου) αλλά και επιστημονικά (Δ. Σκληρός και πολλοί άλλοι).

Πίνακας περιεχομένων

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Θεωρητικό μέρος	1
Κεφάλαιο 1	Εισαγωγή	1-3
Κεφάλαιο 2	Τα αρωματικά φυτά	3
2.1	Ιστορική αναδρομή	3-7
2.2	Τα αρωματικά φυτά της Ελλάδας	7-8
2.3	Αιθέρια έλαια, βιοσύνθεση, ιδιότητες και μηχανισμοί δράσης	9
2.3.1	Αιθέρια έλαια, ορισμός, γενικά στοιχεία και αλληλεπιδράσεις	9-14
2.3.2	Ο ρόλος των αιθέριων ελαίων στη φύση	14-15
2.3.3	Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα των αιθέριων ελαίων	15-16
2.4	Μηχανισμοί δράσης	16
2.4.1	Διέγερση πέψης και όρεξης	16-17
2.4.2	Αντιμικροβιακή δράση	17-19
2.4.3	Αντιμυκητιακή δράση	19-20
2.4.4	Αντιϊκή δράση	20
2.4.5	Αντιπρωτοζωϊκή δράση	20
2.4.6	Αντιοξειδωτική δράση	21
2.4.7	Αντιφλεγμονώδης δράση	22
2.4.8	Εντομοαπωθητική, εντομοκτόνος, εντομοελκυστική δράση	22-25
2.4.9	Αντικαρκινική δράση	25-26
2.4.10	Αντιπαρασιτική δράση	26-27
2.4.11	Ακαρεοκτόνος δράση	27
2.4.12	Αυξητική δράση	28
2.4.13	Άλλες ιδιότητες	28-29
2.4.14	Μελλοντικές εφαρμογές αιθέριων ελαίων	29
2.5	Η χρήση αιθέριων ελαίων στη διατροφή των παραγωγικών ζώων	30-44
Κεφάλαιο 3	Η ρίγανη	44
3.1	Εισαγωγή	44-45
3.2	Ταξινόμηση και καλλιέργεια του φυτού	45-49
3.3	Συστατικά και ιδιότητες αιθέριου της ρίγανης	49
3.3.1	Τα συστατικά του αιθέριου ελαίου της	49-50

	ρίγανης	
3.3.2	Αντιμικροβιακή δράση	51
3.3.3	Αντιμυκητιακή δράση	51
3.3.4	Αντιπρωτοζωική δράση	52
3.3.5	Αντιοξειδωτική δράση	52-53
3.3.6	Υποχοληστερολαιμική και ηπατοπροστατευτική δράση	53
3.4	Χρήση ρίγανης στην διατροφή των παραγωγικών ζώων	53-54
B	Πειραματικό μέρος	54
Κεφάλαιο 4	Πείραμα εκτίμησης της απώλειας αιθέριου ελαίου κατά την αποθήκευση των φυτών και την ανάμειξη αυτών στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών	54
4.1	Εισαγωγή	54-56
4.2	Υλικά και μέθοδοι	56
4.2.1	Φυτικό υλικό	56
4.2.2	Προσδιορισμός απώλειας αιθέριου ελαίου κατά την ξήρανση και αποθήκευση	56
4.2.3	Προσδιορισμός απώλειας αιθέριων ελαίων κατά την άλεση και την ανάμειξη αυτού σε μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών	57-58
4.3	Μετρήσεις	58
4.3.1	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο	58-59
4.3.2	Ποσοτικοποίηση του αιθέριου ελαίου στην ζωοτροφή (3,1% ξηρά δρόγη w/w)	59-60
4.3.3	Προφίλ του αιθέριου ελαίου στην ξηρά δρόγη και στη ζωοτροφή	60
4.3.4	Ποσοτικοποίηση καρβακρόλης	61
4.3.5	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	61
4.4	Αποτελέσματα και σχολιασμός	62
4.4.1	Περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο και προφίλ αυτού	62-66
4.4.2	Περιεκτικότητα της ζωοτροφής σε αιθέριο έλαιο και προφίλ αυτού	66-69
4.5	Συμπεράσματα	69-70
Κεφάλαιο 5	Πείραμα μελέτης ζυμωτικών φαινομένων	70

5.1	Εισαγωγή	70-73
5.2	Υλικά και μέθοδοι	73
5.2.1	Ζωικό υλικό και πειραματικός σχεδιασμός	73-75
5.2.2	Μετρήσεις	75
5.2.2.1	Σωματικά βάρη, ποσοτικοποίηση αιθέριου ελαίου ξηράς δρόγης και προφίλ αυτού	75-76
5.2.2.2	pH, συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων και αμμωνίας στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	76
5.2.2.3	Πεπτικά ένζυμα στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	76-77
5.2.2.4	Μικροβιακοί πληθυσμοί στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	77-83
5.2.2.5	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	83
5.3	Αποτελέσματα και σχολιασμός	83
5.3.1	Αιθέριο έλαιο, προφίλ αιθέριου ελαίου και σωματικά βάρη	83-85
5.3.2	pH, συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων και αμμωνίας στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	85-92
5.3.3	Πεπτικά ένζυμα στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	92-96
5.3.4	Μικροβιακοί πληθυσμοί στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	97-103
5.4	Συμπεράσματα	103
Κεφάλαιο 6	Πείραμα γαλακτοπαραγωγής	104
6.1	Εισαγωγή	104-105
6.2	Υλικά και μέθοδοι	105
6.2.1	Προετοιμασία της ξηράς δρόγης και η ενσωμάτωση της στο μείγμα ΣΖ	105
6.2.2	Αίγες, σταβλισμός και διατροφικές επεμβάσεις	105-108
6.2.3	Μετρήσεις	108
6.2.3.1	Σωματικό βάρος	108
6.2.3.2	Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος	108-109
6.2.3.3	Αντιοξειδωτικά ένζυμα και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος	109-110
6.2.3.4	Μετρήσεις παραμέτρων αίματος	110

6.2.3.5	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	110
6.3	Αποτελέσματα και σχολιασμός	110
6.3.1	Σωματικά βάρη	111-112
6.3.2	Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος	112-115
6.3.3	Αντιοξειδωτικά ένζυμα και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος	115-125
6.3.4	Αντιοξειδωτικά ένζυμα στο πλάσμα του αίματος	125-128
6.3.5	Προφίλ αιθέριων ελαίων στο αίμα και στο γάλα	129-132
6.4	Συμπεράσματα	133
Κεφάλαιο 7	Γενικός σχολιασμός	133-135
Γ	Βιβλιογραφία	136
	Ελληνική	136
	Ξενόγλωσση	136-173

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
2.1	Συνηθισμένα αρωματικά φυτά, τα κύρια συστατικά και οι δράσεις τους	5-6
2.2	Οι κυριότερες θεραπευτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων	6
2.3	Διεθνείς τιμές διαφόρων αρωματικών φυτών στην αγορά της Μεγάλης Βρετανίας	6-7
2.4	Τα κυριότερα εμπορικά αρωματικά φυτά της Ελλάδας	7-8
2.5	Οι κλάσεις των τερπενίων	10
2.6	Επίδραση διάφορων αρωματικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις αποδόσεις χοιριδίων	30-31
2.7	Επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στις αποδόσεις και τη θνησιμότητα χοιριδίων	31-32
2.8	Χρήση διάφορων ελαίων ως αυξητικοί παράγοντες σε σύγκριση με συμβατικό αντιβιοτικό	32
2.9	Επίδραση διάφορων αρωματικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις αποδόσεις πτηνών	33-34
2.10	<i>In vivo</i> μελέτες που αφορούν την προσθήκη αιθέριων ελαίων στην διατροφή μηρυκαστικών ζώων.	36-41
3.1	Προφίλ αιθέριων ελαίων (%) ρίγανης: <i>Origanum vulgare ssp.hirtum</i> (φύλλα και ταξιανθίες)	49-50
4.1	Χημική σύσταση μείγματος συμπηκνωμένων ζωοτροφών	57-58
4.2	Απώλεια αιθέριου ελαίου και μεταβολή του προφίλ αυτού κατά την αποθήκευση της ξηράς δρόγης για 6 μήνες	62-63
4.3	Απώλεια αιθέριου ελαίου και μεταβολή του προφίλ αυτού κατά την αποθήκευση της ζωοτροφής (47,2% w/w)	67
5.1	Συστατικά και χημική σύσταση μείγματος ΣΖ	74-75
5.2	Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του σανού μηδικής και του μείγματος ΣΖ.	75
5.3	Μικροοργανισμοί-στόχοι και οι αντίστοιχοι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίησή	79-80

		τους (αλληλουχία, μέγεθος αμπλικονίων)	
5.4		Προφίλ του αιθέριου ελαίου της ρίγανης που κατανάλωσαν οι αίγες κατά την πειραματική περίοδο	83-84
5.5		Μετρήσεις του σωματικού βάρους καθ'όλη την πειραματική περίοδο	84
5.6		Επίδραση της ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα	87
5.7		Επίδραση της ρίγανης στο ενζυμικό προφίλ της μεγάλης κοιλίας	94
5.8		Μικροβιακοί πληθυσμοί, 4 ώρες μετά την λήψη τροφής	98
6.1		Συστατικά και χημική σύσταση βασικού μείγματος	107
6.2		Συστατικά και χημική σύσταση μείγματος γαλακτοπαραγωγής	107-108
6.3		Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων w/w) του σανού μηδικής, του βασικού μείγματος και του μείγματος γαλακτοπαραγωγής	108
6.4		Σωματικό βάρος, ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος καθ'όλη την πειραματική περίοδο	111
6.5		Επίδραση της ρίγανης στα αντιοξειδωτικά ένζυμα και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος	118-119
6.6		Επίδραση της ρίγανης στα αντιοξειδωτικά ένζυμα στο πλάσμα του αίματος	125-126
6.7		Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του πλάσματος του αίματος	129
6.8		Προφίλ λιπαρών οξέων στο γάλα (% των συνολικών λιπαρών οξέων)	129-130

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα	Τίτλος	Σελίδα
2.1	Σταθερές τιμές ρίγανης 1983-2006	47
4.1	Ανάλυση PCA των 15 επιμέρους συστατικών του αιθέριου ελαίου	65
5.1	Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μικρού μεγέθους (150 bp)	81
5.2	Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μέσου μεγέθους (300 bp)	82
5.3	Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μεγαλύτερου μεγέθους (≥ 1000 bp)	82
5.4	Επίδραση της ρίγανης στην πρωτεάση εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας (U/mL)	95
5.5	Επίδραση της ρίγανης στην πρωτεάση εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας (U/mg)	95
6.1	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο γάλα	120
6.2	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο γάλα	121
6.3	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο γάλα	121
6.4	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοκτάσης (U/mg) της γλουταθειόνης στο γάλα	122
6.5	Επίδραση της ρίγανης στην τιμή FRAP του γάλακτος	123
6.6	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο πλάσμα του αίματος	126
6.7	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο πλάσμα του αίματος	126
6.8	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο πλάσμα του αίματος	127
6.9	Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο πλάσμα του αίματος	127

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα	Τίτλος	Σελίδα
2.1	Η δομή του ισοπρένιου	9
2.2	Βασικές αντιδράσεις κατά την σύνθεση των τερπενίων	10
2.3	Η δομή του φαινύλ-προπενίου	12
2.4	Αδένες στο φύλλο της λεβάντας (<i>Lavandula angustifolia</i>)	14
2.5	Το φαινόμενο της εντομοελκυστικής δράσης των τερπενίων με σκοπό την προστασία του φυτού	24
3.1	Η χημική δομή των κυριότερων συστατικών του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.	50
4.1	Η συσκευή Clevenger (modified) που χρησιμοποιήθηκε στις ύδρο-αποστάξεις	59
5.1	Αίγα του πειράματος	74

A. Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Στην Ευρώπη, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί πολλά αιθέρια έλαια στην κτηνιατρική πρακτική για την αντιμετώπιση ασθενειών των παραγωγικών ζώων από τον 18^ο αιώνα (Franz et al., 2009). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν η χρήση αιθέριου ελαίου πεύκου για την αντιμετώπιση εκτοπαρασίτων και απολύμανση των πληγών, το χαμομήλι και το μυριόφυλλο για την αντιμετώπιση φλεγμονών ή το μάραθο και ο γλυκάνισος για την αντιμετώπιση πεπτικών διαταραχών και του τυμπανισμού. Ωστόσο, η μετέπειτα ανάπτυξη της φαρμακευτικής επιστήμης του Δυτικού κόσμου οδήγησε στην αντικατάσταση των αρωματικών φυτών και των φυσικών συστατικών τους από συνθετικές ουσίες για τη θεραπεία των ζώων (Franz et al., 2009). Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη διατροφή των ζώων (σε υπο-θεραπευτικές δόσεις) κατά τα τελευταία 60 χρόνια, προκειμένου να βελτιώσουν τις αποδόσεις σε υγιή ζώα (Benchaar et al., 2009) και να τα προστατεύσουν από παθογόνους μικροοργανισμούς του πεπτικού συστήματος (Franz et al., 2009). Ωστόσο, από την δεκαετία του 90' και μετά, η ζήτηση των καταναλωτών για προϊόντα υψηλής ποιότητας, η ολοένα αυξανόμενη εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων καθώς επίσης και τα κατάλοιπα αντιβιοτικών στα διάφορα ζωικά προϊόντα, οδήγησαν στην απαγόρευση της χρήσης των αντιβιοτικών ως αυξητικούς παράγοντες (οδηγία 1831/2003/EK) στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Benchaar et al., 2009). Σημειώνεται ότι στις ΗΠΑ έχει, επίσης, σημειωθεί μείωση στην χρήση αντιβιοτικών όχι μέσω της νομοθεσίας αλλά με διάφορους άλλους τρόπους (Rochfort et al., 2008). Επίσης, τα προαναφερθέντα δικαιολογούν το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών για εύρεση εναλλακτικών τρόπων βελτίωσης των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των μηρυκαστικών (Benchaar et al., 2008). Κατά την τελευταία κυρίως δεκαετία, πολυάριθμες εργασίες μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης αιθέριων ελαίων στην τροφή στις αποδόσεις των παραγωγικών ζώων και στην ποιότητα των ζωικών προϊόντων (Bampidis et al., 2005; Ciftci et al., 2005; Simitzis et al., 2008; Chaves et al., 2008a; Chaves et al., 2008b; Kung et al., 2008; Fandino et al., 2008; Meyer et al., 2009; Malecky et al., 2009; Soltan 2009 ; Soltan et al., 2009; Santos et al., 2010; Ariza-Nieto et al., 2011; Giannenas et al., 2011; Kirkpinar et al., 2011; Tekippe et al., 2011).

Τα αιθέρια έλαια είναι μια πολλά υποσχόμενη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης (οι οποίοι στο παρελθόν χαρακτηρίστηκαν ως αντιδιαιτητικοί παράγοντες), επειδή παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Greathead, 2003). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν ευνοϊκά τα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας (Busquet et al., 2006) και να τονώσουν την λειτουργία του ανοσοβιολογικού συστήματος (Concha et al., 1996). Σε *in vivo* μελέτες, αν και τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά, έχει παρατηρηθεί βελτίωση των αποδόσεων και της ποιότητας των ζωικών προϊόντων τόσο μονογαστρικών (Zigger 2001; Botsoglou et al., 2003; Namkung et al., 2004; Allan et al., 2005; Lippens et al., 2005; Cabuk et al., 2006; Janz et al., 2007) όσο και μηρυκαστικών ζώων (Greathead, 2003; Cardozo et al., 2006; Benchaar et al., 2007; Simitzis et al., 2007; Simitzis et al., 2008; Giannenas et al., 2011).

Ως εκ τούτου, τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών για τη βελτίωση της παραγωγικότητας και της υγείας των μηρυκαστικών ζώων (Benchaar et al., 2009). Επίσης, τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών στη βιολογική κτηνοτροφία, επειδή χαρακτηρίζονται ως γενικά ασφαλείς φυσικές ενώσεις (Burt, 2004, Tolouee et al., 2010). Σε αντίθεση με κάποια άλλα πρόσθετα, τα υπολείμματα αιθέριων ελαίων στα ζωοκομικά προϊόντα είναι αναμφίβολα ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία (Huang et al., 1994), κυρίως μέσω αντικαρκινικών (Chen et al., 2010), αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν (Bakkali et al., 2008). Έτσι, τα αιθέρια έλαια έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν τα ζωικά προϊόντα και να τα μετατρέψουν σε λειτουργικά τρόφιμα (Pizzoferrato et al., 2007).

Όμως, οι ερευνητές δίνουν έμφαση στην πιθανή επίδραση της προσθήκη αιθέριου ελαίου στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων στην ποσότητα και στην ποιότητα των ζωικών προϊόντων, αλλά από την άλλη μεριά, ελάχιστη ή καμία προσοχή δεν έχει δοθεί στο αν το αιθέριο έλαιο παραμένει στο αποθηκευμένο αποξηραμένο φυτό ή στην αποθηκευμένη ζωοτροφή και για ποια χρονική διάρκεια. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα επειδή τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται ως πτητικές ενώσεις (Maffei, 2010). Επομένως, ο προσδιορισμός της απώλειας του αιθέριου ελαίου κατά την αποθήκευση είναι ουσιώδους σημασίας, αφού επιτρέπει στον παραγωγό να γνωρίζει πόσο συχνά θα πρέπει να αναμιγνύει τα αρωματικά φυτά με τις συμυκνωμένες ζωοτροφές ώστε να μην υφίστανται σημαντικές απώλειες σε αιθέριο έλαιο.

Στις περισσότερες ερευνητικές εργασίες, χρησιμοποιούνται κυρίως διάφορα εμπορικά παρασκευάσματα που περιέχουν αιθέρια έλαια, ενώ σε άλλες λαμβάνει χώρα ψεκασμός των αιθέριων ελαίων στις συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Σε ελάχιστες εργασίες έχει χρησιμοποιηθεί ξηρά δρόγη (Bampridis et al., 2005, Tekippe et al., 2011). Όμως, η χρήση της ξηράς δρόγης προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα την μείωση του κόστους εφαρμογής αφού δεν χρειάζεται να μεσολαβήσει η βιομηχανία παραλαβής των αιθέριων ελαίων. Έτσι, ο παραγωγός μπορεί να προσθέσει το αποξηραμένο βότανο στο μείγμα των συμπυκνωμένων ζωοτροφών, χωρίς την ανάγκη να απομονωθεί το αιθέριο έλαιο πριν από τη χρήση. Επιπλέον, η ανάμειξη της ξηράς δρόγης με την μείγμα είναι πιο ομοιογενής. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης των αιθέριων ελαίων από την φυτική ύλη στο πεπτικό σύστημα του ζώου, συμβάλλοντας πιθανώς στην αύξηση της αποτελεσματικότητας του αιθέριου ελαίου. Τέλος, προσφέρει το πλεονέκτημα του συνδυασμού όλων των συστατικών που περιέχει το φυτό της ρίγανης και όχι μόνο του αιθέριου ελαίου.

Κεφάλαιο 2. Τα αρωματικά φυτά

2.1. Ιστορική αναδρομή

Ο άνθρωπος αναγνώρισε τις θεραπευτικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών από αρχαιοτάτων χρόνων (Benchaar et al., 2008). Στα έργα τέχνης των Ασσύριων και των Σουμέριων (οι αρχαιότεροι γνωστοί πολιτισμοί) υπάρχουν έργα τέχνης που απεικονίζουν αρωματικά φυτά. Στην Ασία δημιουργήθηκε πριν 6000-7000 χρόνια από τους κινέζους ένα μεγάλο εμπόριο αρωματικών φυτών το οποίο στην συνέχεια υιοθέτησαν οι Άραβες (Σκουμπρής, 1985). Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, χρησιμοποιούσαν τα αιθέρια έλαια τόσο για αισθητικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς, καθώς επίσης και για την ταρίχευση των νεκρών. Φυτά όπως ο γλυκάνισος, το κύμινο, η κανέλλα και πιθανόν η μαντζουράνα ήταν τα κύρια φυτά που χρησιμοποιούσαν (Σκουμπρής 1985). Υπάρχουν γραπτές αναφορές που αφορούν την χρήση των αρωματικών φυτών και των προϊόντων της απόσταξής τους οι οποίες χρονολογούνται από το 2600 π.Χ στη Μεσοποταμία (Newman et al., 2000). Ωστόσο, οι πρώτες γραπτές αναφορές χρονολογούνται από το 484-425 π.Χ από τον Ηρόδοτο (Urdang, 1948). Η Παλαιά Διαθήκη περιγράφει τα αρωματικά φυτά ως τόσο πολύτιμα όσο και ο χρυσός. Παρόλα

αυτά, οι πρώτες αναφορές για την σωστή παραγωγή και χρήση των αιθέριων ελαίων έγιναν πολύ αργότερα, δηλαδή στα τέλη του 13^{ου} -αρχές του 14^{ου} αιώνα (Urdang, 1948). Ο ιατρός Arnald de Villanova από την Καταλονία δημοσίευσε ένα βιβλίο στο οποίο περιέγραψε με επιστημονικό τρόπο την παραγωγή των αιθέριων ελαίων του δενδρολίβανου και του φασκόμηλου. Λίγο αργότερα, μέσα στον 16^ο αιώνα, ξεκίνησε η εμπορική εκμετάλλευση των αιθέριων ελαίων στην πόλη του Λονδίνου γεγονός ορόσημο αφού σηματοδότησε την εξάπλωση των αιθέριων ελαίων στην Ευρώπη (Burt, 2004). Ωστόσο, τα επίσημα κείμενα της εποχής αναφέρουν μόνο τέσσερα αιθέρια έλαια και συγκεκριμένα της λεβάντας, του δενδρολίβανου, του γιουνίπερου και του πεύκου, όπως περιγράφονται στο βιβλίο ‘‘Liber De Arte Distillandi’’ του Brunshwig.

Ένα γεγονός ορόσημο αποτέλεσε η δημοσίευση δύο βιβλίων από τον γερμανό ιατρό Adam Lonicer και από τον Giovanni Battista το 1551 και 1563 αντίστοιχα. Τα βιβλία αυτά περιέχουν μεθόδους παραλαβής αιθέριων ελαίων από τα αρωματικά φυτά, καθώς επίσης και αναλυτικές περιγραφές των απαραίτητων συσκευών (Urdang, 1948). Έτσι λοιπόν, κατά την διάρκεια του 17^{ου} αιώνα, ο γάλλος Ιατρός Joseph Du Chesne αναφέρει στο βιβλίο του ‘‘Pharmacopoea Dogmaticorum Restituta’’ ότι τρόποι παραλαβής και προετοιμασίας των αιθέριων ελαίων είναι γνωστοί σε όλους ενώ τουλάχιστον 20 αιθέρια έλαια υπήρχαν ήδη στα ράφια των φαρμακείων. Το 1881 ο επιστήμονας De la Croix ανέφερε ότι πραγματοποίησε την πρώτη εργαστηριακή εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης των αιθέριων ελαίων (Burt, 2004).

Εν συνεχεία, κατά την διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, οι μεγάλες πρόοδοι στον τομέα της χημείας επεκτάθηκαν και στον τομέα των αιθέριων ελαίων (Urdang, 1948). Το 1887, ο Otto Wallach πρότεινε τη δομή του ισοπρενίου για τα τερπενοειδή ενώ το 1894 έγινε γνωστή η χημική δομή της καμφοράς και του α -πινένιου (Banthorpe, 1994). Κατά την διάρκεια του ίδιου αιώνα τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνταν κυρίως από την βιομηχανία τροφίμων και δευτερευόντως για φαρμακευτικούς σκοπούς (Urdang, 1948) κάτι που συνέχισε να αποτελεί τον κανόνα μέχρι τη σημερινή εποχή, αφού το 90 % της παγκόσμιας παραγωγής των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων και αρωμάτων (Holmes, 2007). Έτσι, τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ένα πολύ μακρύ ιστορικό χρήσης από τον άνθρωπο, γεγονός που μειώνει και την αυστηρότητα της νομοθεσίας γύρω από την ασφάλεια της χρήσης τους (Isman, 2006).

Σήμερα, πολυάριθμα αρωματικά φυτά και τα αιθέρια έλαιά τους χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο ως καλλυντικά, αρώματα, σε εναλλακτικές και συμπληρωματικές θεραπείες, στη βιομηχανία τροφίμων κ.α., ενώ ταυτόχρονα η χρήση τους εξαπλώνεται ολοένα και περισσότερο (Bakkali et al., 2008). Ειδικότερα, όσον αφορά τις φαρμακευτικές εφαρμογές των αιθέριων ελαίων, παρατηρείται αύξηση της χρήσης τους κυρίως κατά την τελευταία δεκαετία (Benchaar et al., 2008).

Στη σημερινή εποχή είναι γνωστά 17.500 αρωματικά φυτά (Bruneton, 1999) τα οποία κατατάσσονται σε έναν περιορισμένο αριθμό οικογενειών του φυτικού βασιλείου: όπως οικ. Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae (Enan, 2001). Σημειώνεται ότι έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 30.000 αιθέρια έλαια (Chen, 2008), εκ των οποίων μόνο 300 είναι εμπορικής σημαντικά (Bakkali et al., 2008, Burt, 2004).

Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αρωματικά φυτά καθώς επίσης και η δράση αυτών. Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι κυριότερες φαρμακευτικές δράσεις των αιθέρων ελαίων.

Πίνακας 2.1 Συνηθισμένα αρωματικά φυτά, τα κύρια συστατικά και οι δράσεις τους (Frankic et al., 2009).

Αρωματικό φυτό	Χρησιμοποιούμενο φυτικό τμήμα	Κύριο ενεργό συστατικό	Δράσεις
Μοσχοκάρυδο	Σπέρματα	Σαβινένιο	Διέγερση πέψης, αντιμετώπιση διαρροιών
Κανέλλα	Φλοιός	Κιναμαλδεΐδη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό
Γαρύφαλλο	Άνθη	ευγενόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό
Κάρδαμο	Σπέρματα	κινεόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης
Κόλιανδρο	Φύλλα, σπέρματα	Λιναλοόλη	Διεγερτικό πέψης
Κύμινο	Σπέρματα	Κυμναλδεΐδη	Διεγερτικό πέψης, μείωση τυμπανισμού
Γλυκάνισο	Καρπός	Ανηθόλη	Διεγερτικό πέψης
Σέλινο	Καρπός, φύλλα	Φθαλίδη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης
Μαϊντανός	Φύλλα	Απιόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό
Κοκκινόπιπερο	Καρπός	Καπσαΐσίνη	Διεγερτικό πέψης
Πιπέρι	Καρπός	Πιπερίνη	Διεγερτικό πέψης
Πιπερόριζα	Ρίζες	τζιντζερόνη	Διέγερση στομάχου
Σκόρδο	Βολβός	Αλλισίνη, αλλυλικά δισουλφίδια	Διεγερτικό πέψης, αντισηπτικό

		και τρισουλφίδια, διαλλυτικά δισουλφίδια και τρισουλφίδια	
Δενδρολίβανο	Φύλλα	κινεόλη	Διεγερτικό πέψης, αντισηπτικό, Αντιοξειδωτικό
Θυμάρι	Όλα τα μέρη	θυμόλη	Διεγερτικό πέψης, αντισηπτικό, Αντιοξειδωτικό
Φασκόμηλο	Φύλλα	κινεόλη	Διεγερτικό πέψης, αντισηπτικό, Αντιοξειδωτικό
Δάφνη	Φύλλα	Κινεόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό
Μέντα	Φύλλα	Μενθόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό

Πίνακας 2.2. Οι κυριότερες θεραπευτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων (Steflitsch & Steflitsch, 2008).

Χαλαρωτικές, κατασταλτικές, αντικαταθλιπτικές
Σπασμολυτικές, πεπτικές, διουρητικές
Επουλωτικές
Εντομοκτόνες, απωθητικές
Αποχρεμπτικές
Αποσμητικές
Αντισηπτικές, αντιβακτηριακές, αντικές, αντιμυτιακές
Ανοσοδιεγερτικές, ορμονικές
Αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιτοξικές, υπεραιμικές

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διεθνείς τιμές των αρωματικών φυτών είναι πολύ υψηλές ενώ χαρακτηρίζονται ως οι υψηλότερες εκ των αγροτικών προϊόντων (Παπαναγιώτου και συν., 2001). Στον πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι διεθνείς τιμές ορισμένων αρωματικών φυτών.

Πίνακας 2.3. Διεθνείς τιμές διαφόρων αρωματικών φυτών στην αγορά της Μεγάλης Βρετανίας (Παπαναγιώτου και συν., 2001).

Προϊόν	Τιμή (€/kg)
Ρίγανη (αποξηραμένη)	2.2

Νωπά	
Κορίανδρος	8.0
Μαντζουράνα	9.6
Ρίγανη	9.6
Μελισσόχορτο	9.6
Θυμάρι	9.6
Φασκόμηλο	12.0
Βασιλικός	12.0
Δυόσμος	12.0

2.2. Τα αρωματικά φυτά της Ελληνικής χλωρίδας

Στην Ελλάδα ευδοκιμεί πληθώρα αρωματικών φυτών αφού οι εδαφικές και κλιματικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους (Σκουμπής, 1998). Η Ελλάδα είναι η 3η χώρα σε βιοποικιλότητα στον κόσμο ενώ πολλά αρωματικά φυτά είναι σπάνια και υπάρχουν μόνο στον Ελλαδικό χώρο. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν η ρίγανη, το θυμάρι, το τσάι του βουνού και η μέντα (Σκουμπής, 1998). Στον πίνακα 2.4 παρουσιάζονται τα κυριότερα, από εμπορικής σκοπιάς, αρωματικά φυτά της χώρας μας.

Πίνακας 2.4. Τα κυριότερα εμπορικά αρωματικά φυτά της Ελλάδας (Σκουμπής, 1998).

Αρωματικό φυτό	Επιστημονική ονομασία	Τρόπος παραγωγής
Ελληνική ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Τσάι του βουνού	<i>Sideritis spp.</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Φασκόμηλο	<i>Salvia fruticosa</i>	Αυτοφυές
Γλυκάνισο	<i>Pimpinella anisum</i>	Καλλιεργούμενο
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum</i>	Καλλιεργούμενο
Μάραθο	<i>Foeniculum vulgare</i>	Καλλιεργούμενο
Χαμομήλι	<i>Matricaria recutita</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Δάφνη	<i>Laurus nobilis</i>	Αυτοφυές
Μέντα	<i>Mentha spp.</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Δυόσμος	<i>Mentha spicata</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Θυμάρι	<i>Thymus capitatus</i>	Αυτοφυές
Κόλιανδρο	<i>Coriandrum sativum</i>	Καλλιεργούμενο
Κίμινο	<i>Cuminum cuminum</i>	Καλλιεργούμενο
Μαστίχα Χίου	<i>Pistacia lentiscus</i>	Καλλιεργούμενο
Κρόκος Κοζάνης	<i>Crocus sativus</i>	Καλλιεργούμενο
Δίκταμο Κρήτης	<i>Origanum dictamnus</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές
Ματζουράνα	<i>Origanum microphyllum</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφυές

Φασκόμηλο	<i>Salvia pomifera</i>	Αυτοφύες
Φλησκούνι	<i>Mentha pulegium</i>	Καλλιεργούμενο και αυτοφύες
Βάλσαμο	<i>Calamintha cretica</i>	Αυτοφύες
Κυπαρισσάκι	<i>Micromeria juliana</i>	Αυτοφύες

Τα αρωματικά φυτά καλλιεργούνται για τα αιθέρια έλαια ή τις ξηρές δρόγες τους (Σκουμπής, 1985). Λόγω των πολλαπλών βιολογικών ιδιοτήτων τους, χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία φαρμάκων (για θεραπευτικούς σκοπούς, αρωματοθεραπείες, συμπληρωματικές και εναλλακτικές θεραπείες κτλ.), στην βιομηχανία τροφίμων (ενισχυτικά γεύσης, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά), ως αφεψήματα, στην βιομηχανία καλλυντικών, στην σαπωνοποιία, την οδοντοκρεμοποιία (Pedro et al., 2009), στην αρωματοποιία (Aburjai and Natscheh, 2003), στην ποτοποιία, στη ζαχαροπλαστική καθώς επίσης και σε πολλές άλλες εφαρμογές (Σκουμπής, 1985, Burt, 2004).

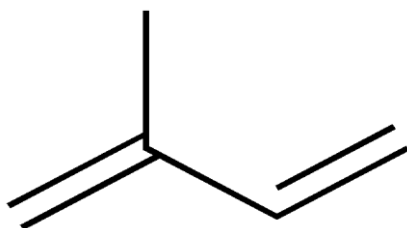
Η καλλιέργεια των αρωματικών φυτών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως η αξιοποίηση ορεινών και ημιορεινών περιοχών (αύξηση του γεωργικού εισοδήματος) αφού δεν έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις ως προς την καλλιέργειά τους. Η ανθεκτικότητά τους σε εχθρούς και ασθένειες καθιστά την καλλιέργεια των αρωματικών φυτών ιδανική για βιολογική. Επιπλέον, οι καλλιέργειες αυτές παρουσιάζουν προοπτικές και εμπορικό ενδιαφέρον (Σκουμπής, 1998). Άλλα πλεονεκτήματα είναι η αναδιάρθρωση των καλλιεργειών, η εκμετάλλευση φτωχών ή εγκαταλειμμένων περιοχών, η δημιουργία μικρών βιομηχανικών μονάδων στην ύπαιθρο, η αξιοποίηση γυναικείων και μεγάλης ηλικίας εργατικών χεριών, η ανάπτυξη της μελισσοκομίας, η τουριστική αξιοποίηση διάφορων περιοχών και τέλος η εξοικονόμηση συναλλάγματος (Σκουμπής, 1985).

Όμως στην χώρα μας η εμπορική εκμετάλλευση των καλλιεργειών αρωματικών φυτών βρίσκεται ακόμη σε εμβρυικό στάδιο. Αυτό γιατί από το σύνολο των 39.000.000 στρεμμάτων καλλιεργήσιμης έκτασης, μόνο το 0,1 % καταλαμβάνεται από αρωματικά φυτά (Σκουμπής, 1998). Λόγω των ιδιαίτερων εδαφοκλιματικών συνθηκών της χώρας μας υπάρχει η δυνατότητα εξάπλωσης της καλλιέργειας αρωματικών φυτών, γεγονός που θα μπορούσε να ενισχύσει και το αγροτικό εισόδημα.

2.3. Αιθέρια έλαια, βιοσύνθεση, ιδιότητες και μηχανισμοί δράσης

2.3.1. Αιθέρια έλαια (ορισμός, γενικά στοιχεία, αλληλεπιδράσεις)

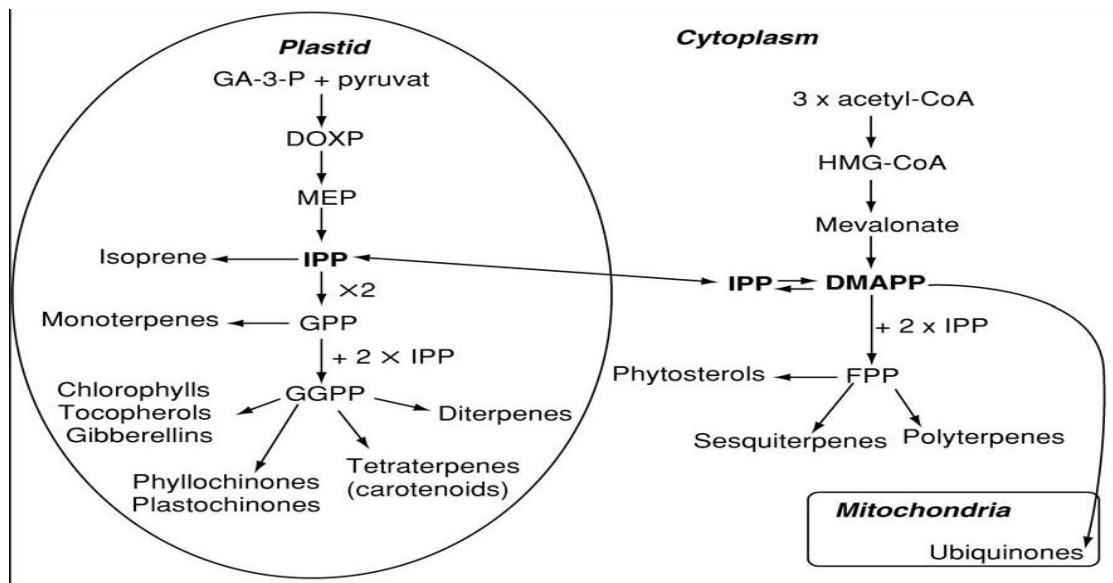
Τα αιθέρια έλαια παράγονται από τα αρωματικά φυτά και κατατάσσονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες (Patra and Saxena, 2010). Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αιθέριων ελαίων: τα **τερπένια** (συμπεριλαμβανομένων και των παραγώγων τους) και τα παράγωγα του **φαινυλ-προπενίου** (Benchaar et al., 2009). Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται ενώσεις που αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου (Εικόνα 2.1) και ακολουθούν τον χημικό τύπο $(C_5H_8)_n$, όπου n είναι ο αριθμός των μονάδων ισοπρενίου οι οποίες αποτελούν το τερπένιο. Όταν το n παίρνει την τιμή 2 τότε το αιθέριο έλαιο ονομάζεται μονοτερπένιο, όταν το n παίρνει την τιμή 3 τότε ονομάζεται σεσκιτερπένιο, ενώ για μεγαλύτερες τιμές το αιθέριο έλαιο ονομάζεται πολυτερπένιο.



Εικόνα 2.1. Η δομή του ισοπρενίου.

Τα τερπένια παράγονται από δευτερογενείς μεταβολίτες μέσω του συνενζύμου A ενώ αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία αιθέριων ελαίων στη φύση (Jian Qin, 1993). Ο σχηματισμός των τερπενίων γίνεται σε τρεις φάσεις (Grabman 2005): η πρώτη περιλαμβάνει την δημιουργία της C5-υπομονάδας, η δεύτερη την σύνδεση των επιμέρους μονάδων για τη δημιουργία του σκελετού διάφορων τερπενίων και τέλος, η τρίτη περιλαμβάνει τη μετατροπή των αντίστοιχων πρενυλ-διφωσφατιδίων στα τελικά προϊόντα. Η σύνθεση επιτυγχάνεται μέσω δύο βιοσυνθετικών οδών (εικόνα 2.2): του μεβαλονικού οξέος (mevalonate pathway) και του μεθυλ-ερυθρυτολ-4- φωσφορικού εστέρα (Deoxyululose pathway). Από την πρώτη βιοσυνθετική οδό, η οποία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, συντίθενται τα σεσκιτερπένια, τα τριτερπένια και τα πολυτερπένια (Bruneton, 1999). Από την δεύτερη βιοσυνθετική οδό παράγονται τα μονοτερπένια, τα διτερπένια και τα πολυτερπένια (Lichtenthaler, 1999). Ο κοινός ενδιάμεσος μεταβολίτης των δύο προαναφερθέντων βιοσυνθετικών οδών είναι ο ισο-πεντενυλ-

πυροφωσφορικός εστέρας (“ενεργοποιημένο ισοπρένιο”) από τον οποίο προέρχονται όλα τα τερπένια. Μία ομάδα ενζύμων, οι πρενυλ-τρανσφεράσες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού του πεντενυλ-πυροφωσφορικού εστέρα σε πρενυλ-πυροφωσφορικούς εστέρες. Στην τρίτη φάση οι πρενυλ-πυροφωσφορικοί εστέρες μετατρέπονται σε τερπένια από τις συνθετάσες τερπενίων (Krauwieser et al., 1999).



Εικόνα 2.2. Βασικές αντιδράσεις κατά την σύνθεση των τερπενίων (Grabman, 2005).

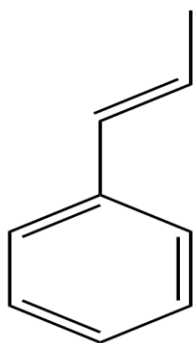
Η ονομασία τερπένιο προέρχεται από τη γερμανική λέξη *terpentin* (νέφτι), διότι από το προϊόν αυτό απομονώθηκαν τα πρώτα μέλη της ομάδας (Καραμπουρνιώτης, 2003). Έχουν προσδιορισθεί πάνω από 23.000 διαφορετικά τερπένια με διαφορετική δομή (Αϊναλίδου, 2008). Στον πίνακα 2.5 παρουσιάζονται οι κλάσεις των τερπενίων.

Πίνακας 2.5. Οι κλάσεις των τερπενίων (Grabman 2005)

Κλάση	Αριθμός ατόμων C	Αριθμός μονάδων ισοπρενίου
Μονοτερπένια	10	2
Σεσκιτερπένια	15	3
Διτερπένια	20	4
Τριτερπένια	30	6
Τετρατερπένια	40	8
Πολυτερπένια	>40	>8

Τα παράγωγα του φαινυλ-προπενίου (εικόνα 2.3) είναι επίσης παράγωγα δευτερογενών μεταβολιτών ενώ βιοσυντίθενται από το σικιμικό οξύ το οποίο είναι ενδιάμεση ένωση κατά τη βιοσύνθεση της λιγνίνης. Οι ανθρακικοί σκελετοί για τη βιοσύνθεσή τους παρέχονται από αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη). Η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη καθώς επίσης και η τρυπτοφάνη βιοσυντίθενται από το σικιμικό οξύ (Benchaar et al., 2009). Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης των παραγώγων του φαινυλ-προπενίου είναι η συμπήκνωση του φωσφοενολο-πυροσταφυλικού οξέος και της φωσφορικής ερυθρόζης. Έπειτα, το σικιμικό οξύ ενώνεται με το φωσφοενολο-πυροσταφυλικό οξύ σχηματίζοντας προφανικό οξύ από το οποίο παράγονται η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη. Εν συνεχεία, ακολουθεί απαμίνωση των προαναφερθέντων αμινοξέων και ο σχηματισμός κινναμικού οξέος (η βασική δομική μονάδα των παραγώγων του φαινυλ-προπενίου) και 4-κουμαρικού οξέος. Η υδροξυλίωση και η μεθυλίωση του 4-κουμαρικού οξέος οδηγεί στην παραγωγή των κινναμικών οξέων (καφφεϊκό, φερουλικό και συναπτικό οξύ). Η αναγωγή των κινναμικών οξέων οδηγεί στην παραγωγή κινναμυλικών αλκοολών οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των παραγώγων του φαινυλ-προπενίου (όπως πχ., κινναμαλδεύδη, ευγενόλη, ανηθόλη, σαφρόλη κ.α.)

Σημειώνεται ότι τα παράγωγα του φαινυλ-προπενίου είναι σπανιότερα στη φύση (πχ. η *trans*-Anethole στο γλυκάνισο και η κινναμαλδεύδη στην κανέλλα). Εκτός όμως από τα τερπένια και τα παράγωγα του φαινυλ-προπενίου υπάρχουν και άλλες αρωματικές ενώσεις οι οποίες κατατάσσονται σε ένα ευρύ φάσμα χημικών ομάδων: αλδεύδες, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες, λακτόνες (σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των λιπιδίων και των γλυκοσιδίων), φαινόλες (σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των γλυκοσιδίων), σουλφίδια και αζωτούχες ενώσεις όπως πχ. μερκαπτάνες, τριαζόλες, πυραζίνες και πυριδίνες (σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών) και τέλος καρβοξυλικά οξέα (σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των σακχάρων και των γλυκεριδίων). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αιθέριων ελαίων αποτελούν το αιθέριο έλαιο του τριαντάφυλλου, του γιασεμιού και της βιολέτας (Jian Qin, 1993).



Εικόνα 2.3. Η δομή του φαινύλ-προπενίου

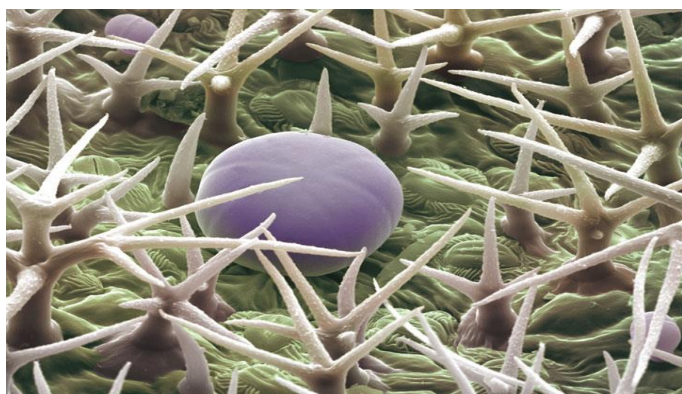
Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν αιθέρια έλαια που δεν υπάγονται σε καμία από τις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες. Για παράδειγμα, τα συστατικά του σκορδέλαιου (μεταξύ των οποίων η αλισίνη και διαλλυλικά δισουλφίδια) από την κυστεΐνη μεσσω της γ-γλουταμύλ-S-αλλυλ-κυστεΐνης (Amagase et al., 2001).

Στη φύση, τα αιθέρια έλαια εμφανίζονται σε φυσικά μείγματα που περιέχουν 20-60 χημικά συστατικά (Bakkali et al., 2008). Από ποσοτικής άποψης κυριαρχούν συνήθως δύο ή τρία συστατικά (Bakkali et al., 2008). Για παράδειγμα, στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου της ελληνικής ρίγανης, οι Vokou et al., (1993) βρήκαν ότι το άθροισμα της καρβακρόλης και της θυμόλης αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90 % του συνόλου του αιθέριου ελαίου σε φυτά τα οποία συλλέχθηκαν από την Εύβοια. Όμως, ο ρόλος των υπόλοιπων συστατικών θα πρέπει να τονιστεί, επειδή παρουσιάζουν συνεργιστική επίδραση με τα κύρια συστατικά (Hoet et al., 2006). Για παράδειγμα, μεταξύ του π-κυμένιου και της καρβακρόλης παρατηρήθηκε συνεργική δράση (Tajkarimi et al., 2010). Αν και το π-κυμένιο παρουσιάζει περιορισμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον του *B.cereus*, όταν συνδυάζεται με την καρβακρόλη διευκολύνει τη μεταφορά της καρβακρόλης στο μικροβιακό κύτταρο, ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητά της. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί συνέργεια και μεταξύ των κύριων συστατικών. Οι Lambert et al. (2001) έδειξαν ότι ο συνδυασμός της καρβακρόλης και της θυμόλης εμφανίζει υψηλότερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα από ότι το κάθε συστατικό ξεχωριστά. Για παράδειγμα, μεταξύ π-κυμένιου και θυμοκουϊνόνης παρατηρείται ισχυρή ανταγωνιστική δράση όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των συγκεκριμένων αιθέριων ελαίων (Milos and Makota, 2012). Ως εκ τούτου, διάφοροι συνδυασμοί αιθέριων ελαίων μπορεί να αποδειχθούν

πολύ χρήσιμοι για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των αιθέριων ελαίων. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν και ανταγωνιστικά φαινόμενα μεταξύ των αιθέριων ελαίων. Σημαντικό ρόλο, επίσης, κατέχει και η γεωμετρική δομή των διπλών δεσμών (για ισομερείς ενώσεις) στο μόριο ενός αιθέριου ελαίου. Για παράδειγμα, η cis-ασαρόνη παρουσιάζει ισχυρότερη εντομοκτόνο δράση από ότι η trans-ασαρόνη για το λεπιδόπτερο *Peridroma saucia* (Lahlou, 2004). Ωστόσο, ελάχιστη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί πάνω στο συγκεκριμένο θέμα (Lahlou, 2004).

Όσον αφορά τα εναντιόμορφα ζεύγη, ενδεχομένως οι οπτικοί αντίποδες ενός μορίου έχουν διαφορετική δράση στα βιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί για το (+)-λεμονένιο και την (+)-καρβόνη ότι διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο αίμα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εναντιομερή τα οποία μεταβολίζονται πολύ πιο γρήγορα, τουλάχιστον στον άνθρωπο (Lahlou, 2004). Πάντως είναι αδιαμφισβήτητο το γεγονός ότι τα εναντιομερή ενός αιθέριου ελαίου έχουν πολύ διαφορετική οσμή.

Σημειώνεται ότι τα αιθέρια έλαια παράγονται σε ειδικούς αδένες, ποικίλων μεγεθών και μη ομοιόμορφης κατανομής (φωτογραφία 2.1), ενώ εντοπίζονται σε όλα τα φυτικά μέρη (σπέρματα, καρπούς, φύλλα, ρίζες φλοιό, μέχρι και ταξιανθίες) (Jian Qin, 1993). Έτσι πχ., στο κάτω μέρος της επιφάνειας των φύλλων της μέντας υπάρχουν 10-25 αδένες/mm² ενώ στο πάνω μέρος υπάρχουν 1-6 αδένες/mm². Οι διαστάσεις και ο αριθμός των αδένων αυτών αυξάνεται σε περιοχές που βρίσκονται πιο κοντά στις νευρώσεις των φύλλων (Σκουμπής, 1998).



Εικόνα 2.4. Αδένες στο φύλλο της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*).

2.3.2. Ο ρόλος των αιθέριων ελαίων στη φύση

Για την αποφυγή των αντίξοων βιοτικών επιδράσεων και των εχθρών τους, τα φυτά εκτός από την κατάλληλη δομή έχουν αναπτύξει ένα «βιοχημικό οπλοστάσιο», καθώς δεν έχουν την ικανότητα κίνησης (Καραμπουρνιώτης, 2003). Τα αιθέρια έλαια προσφέρουν πληθώρα πλεονεκτημάτων στα φυτά από τα οποία παράγονται. Έτσι, προστατεύουν τα αρωματικά φυτά από περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλούν stress, βόσκοντα ζώα και παθογόνους μικροοργανισμούς (Frankic et al., 2009). Σύμφωνα με τον Σκουμπρή (1985), ο ρόλος των αιθέριων ελαίων είναι: η προστασία των αρωματικών φυτών από έντομα και παράσιτα, η προστασία από υψηλές θερμοκρασίες διότι λόγω της πτητικότητάς τους αποβάλλεται μέρος αυτής, η προστασία από τη σήψη των πληγών σε επιφανειακούς φυτικούς ιστούς, η προσέλκυση εντόμων επικονιαστών με αποτέλεσμα την καλύτερη γονιμοποίηση των φυτών, η προστασία από την ξηρασία διότι τα αιθέρια έλαια εισέρχονται στους μεσοκυττάριους χώρους και ελαττώνουν τη διαπνοή, η αύξηση της ταχύτητας κυκλοφορίας των θρεπτικών ουσιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των φυτών και η προστασία από τις χαμηλές θερμοκρασίες διότι λόγω πτητικότητας σχηματίζουν ένα προστατευτικό νέφος. Σε αυτά θα πρέπει να προστεθεί ότι τα μονοτερπένια βοηθούν τα

φυτά στο να διατηρήσουν την δραστηριότητα των φυτικών ενζυμικών συστημάτων όπως πχ., η μονοοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 (Epan, 2001).

2.3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα των αιθέριων ελαίων

Η παραγόμενη ποσότητα και η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι οι εξής (Lahlou, 2004, Brenes and Roura, 2010): το είδος και το υποείδος (ποικιλία) του αρωματικού φυτού, τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά της τοποθεσίας, οι εποχικές διακυμάνσεις και οι κλιματικές συνθήκες, η εποχή και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού κατά την συλλογή, το φυτικό μέρος και τέλος η μέθοδος παραλαβής.

Παρατηρείται υψηλή παραλλακτικότητα για φυτά του ίδιου είδους. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην εξέλιξη και την προσαρμογή των φυτών στο εκάστοτε περιβάλλον που αναπτύσσονται (Lahlou, 2004).

Όσον αφορά τις εποχικές διακυμάνσεις και τις κλιματικές συνθήκες, πχ., στην περίπτωση της Ελληνικής ρίγανης (*O. vulgare ssp. Hirtum*) το φθινόπωρο η απόδοση σε αιθέριο έλαιο μειώνεται, η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε π-κυμένιο αυξάνεται, ενώ η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε γ-τερπινένιο μειώνεται (Kokkini et al., 1996). Έτσι, η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε π-κυμένιο βρέθηκε να είναι 17,3-26,9 % σε αυτοφυή φυτά που συλλέχθηκαν το φθινόπωρο, έναντι 4,0-9,5 % σε φυτά που συλλέχθηκαν το καλοκαίρι στην Νότια Ελλάδα. Το αντίστοιχο εύρος τιμών για φυτά της βόρειας Ελλάδας ήταν 37,1-51,3 % (φθινόπωρο) και 12,0-12,2 % (καλοκαίρι).

Όσον αφορά τη χρονική στιγμή συλλογής, η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο γενικά είναι μέγιστη στην αρχή της άνθησης και κατά την διάρκειά της (Marino et al., 1999).

Όσον αφορά το συγκομιζόμενο φυτικό μέρος, σημειώνεται ότι τα αιθέρια έλαια εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών αλλά η περιεκτικότητα είναι διαφορετική για κάθε φυτικό μέρος. Έτσι πχ., τα άνθη της ρίγανης, του θυμαριού και του μπεργαμόντου, τα φύλλα του ευκάλυπτου, ο φλοιός της κανέλλας, το ξύλο της τριανταφυλλιάς και του σανδαλόξυλου, τα ριζώματα του τζίντζερ, οι καρποί του γλυκάνισου και τα σπέρματα

του μοσχοκάρυδου είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αιθέρια έλαια σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού (Enan, 2001).

Το προφίλ των αιθέριων ελαίων εξαρτάται ακόμη και από την μέθοδο παραλαβής (Cassel et al., 2009). Οι Packryasothy and Kyle (2002), έδειξαν πειραματικά για διάφορα αρωματικά φυτά, ότι το αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνεται μέσω εκχύλισης με εξάνιο χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από το αντίστοιχο που παραλαμβάνεται με απόσταξη. Το ίδιο ισχύει και για την απόδοση σε αιθέριο έλαιο. Έτσι, πχ., συνδυασμός απόσταξης και υπερήχων δίνει υψηλότερη απόδοση από ότι η μέθοδος της απόσταξης.

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση της ρίγανης, το κλίμα, η εποχή της συλλογής και τα χαρακτηριστικά του εδάφους επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό το προφίλ του αιθέριου ελαίου από ότι η ποικιλία της (Kokkini, 1994). Επιπλέον, φυτά ρίγανης σε μεγαλύτερο υψόμετρο χαρακτηρίζονται από υψηλότερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο (Kokkini, 1994).

2.4. Μηχανισμοί δράσης

2.4.1. Διέγερση όρεξης και πέψης

Τα κυριότερα αρωματικά φυτά που διεγείρουν την όρεξη είναι η κανέλλα, η μέντα, η δάφνη και το κάρδαμο (Loo and Richard, 1992). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι τα ζώα παρουσιάζουν προτιμήσεις σε διάφορα αιθέρια έλαια. Για παράδειγμα, οι χοίροι προτιμούν το σκόρδο ή το δενδρολίβανο αντί της ρίγανης, του θυμαριού και της πιπερόριζας (Janz et al., 2007). Όμως, εάν χορηγηθεί τροφή η οποία δεν περιέχει αιθέρια έλαια και τροφή με αιθέριο έλαιο, τότε οι χοίροι καταναλώνουν την τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σκόρδο το οποίο προστίθεται σε σιτηρέσια ζώων συντροφιάς (pet) προκειμένου να αυξηθεί η κατανάλωση τροφής (Leong et al., 2010). Επιπλέον, το σκόρδο προστίθεται συχνά σε σιτηρέσια αλόγων που συμμετέχουν σε αγώνες προκειμένου να αυξηθεί η κατανάλωση τροφής και οι αγωνιστικές αποδόσεις των ζώων αυτών (Horton et al., 1991).

Η διέγερση της πέψης γίνεται με διάφορους τρόπους. Η πλειοψηφία των αιθέριων ελαίων διεγείρει την έκκριση σιέλου (Frankic et al., 2009). Επίσης, ορισμένα αιθέρια έλαια αυξάνουν τη σύνθεση χολικών οξέων στο ήπαρ και την απέκκρισή τους στην χολή με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης των λιπιδίων (Frankic et al., 2009). Επιπλέον, τα περισσότερα αιθέρια έλαια διεγείρουν τη λειτουργία των παγκρεατικών ενζύμων (λιπάσες, αμυλάσες, πρωτεάσες), ενώ μερικά αιθέρια έλαια μπορούν να διεγείρουν την δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων του εντερικού επιθηλίου (Srinivasan, 2005).

2.4.2. Αντιμικροβιακή δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δράση αλλά ο μηχανισμός δράσης εξαρτάται κυρίως από τη χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου (Benchaar et al., 2009).

Σημειώνεται ότι τα gram+ βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram- (Lambert et al., 2001, Al-Reza et al., 2010). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαφορές του κυτταρικού φάκελου όπου στην περίπτωση των Gram- βακτηρίων η κυτταρική μεμβράνη έχει μικρότερο μέγεθος, είναι υδρόφιλη και χαρακτηρίζεται από μικρότερη διαπερατότητα στα αιθέρια έλαια (Calsamiglia et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με τους Deans and Richie (1987) αλλά και τους Dorman and Deans (2000), τόσο τα Gram+ όσο και τα Gram- βακτήρια είναι ευαίσθητα στα αιθέρια έλαια διότι αιθέρια έλαια πολύ μικρού μεγέθους μπορούν να εισέλθουν εντός του κυταροπλάσματος των Gram- βακτηρίων μέσω πρωτεϊνών-πορινών που επιτρέπουν την διόδό τους.

Ωστόσο ορισμένοι ερευνητές αποδίδουν την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων στην αλληλεπίδραση των λειτουργικών ομάδων τους (κυρίως φαινολικές) με τον κυτταρικό μικροβιακό φάκελο (Lahlou, 2004). Σημειώνεται ότι τα αιθέρια έλαια με υδροξυλική ομάδα σε φαινολικό δακτύλιο χαρακτηρίζονται από ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση (Benchaar et al., 2009). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν η καρβακρόλη, η θυμόλη (οξυγονομένα τερπένια) και η ευγενόλη (παράγωγο του φαινυλ-προπενίου). Αυτό αποδίδεται στο ότι η υδροξυλική ομάδα εμπλέκεται στην μεταφορά ιόντων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Ultee et al., 2002) αλλά και στην αδρανοποίηση μικροβιακών ενζύμων (Burt, 2004).

Οι Deans and Richie (1987), σε σχετική εργασία μελέτησαν την επίδραση 50 αιθέριων ελαίων σε 25 γένη βακτηρίων και παρατήρησαν ότι αρωματικά φυτά όπως η ρίγανη, το θυμάρι, η κανέλλα, το αμύγδαλο, η δάφνη, το γλυκοπίπερο, το γαρύφαλλο, η ματζουράνα, η αγγέλικα και το μοσχοκάρυδο χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα έντονη αντιμικροβιακή δράση.

Ειδικότερα, στην περίπτωση του ριγανελαίου, προκαλείται βλάβη στην βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη (αύξηση διαπερατότητας) η οποία οδηγεί σε απώλεια των περιεχομένων του κυτταροπλάσματος και λύση του βακτηρίου (Paparella et al., 2008). Έτσι, η απώλεια ιόντων H^+ και K^+ οδηγεί σε εξάντληση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ATP, είτε μέσω αναστολής της σύνθεσης ATP είτε μέσω αυξημένης υδρόλυσής του. Επίσης, η υδροξυλική ομάδα δρα ως μεταφορέας των ιόντων H^+ και K^+ στην κυτταρική μεμβράνη. Ειδικότερα για τα αιθέρια έλαια φαινολικού τύπου (πχ., καρβακρόλη και θυμόλη), όταν εισέρχονται εντός του κυτταροπλάσματος, δρουν ως δότες πρωτονίων (όξινες ιδιότητες) και προσλαμβάνουν ιόντα καλίου. Κατόπιν εξέρχονται από το κυτταρόπλασμα και απελευθερώνουν τα ιόντα καλίου και επαναπροσλαμβάνουν πρωτόνια καθώς ο κύκλος επαναλαμβάνεται (Calsamiglia, 2007). Επιπλέον, η καρβακρόλη αυξάνει τη σύνθεση της πρωτεΐνης 60 HSP (heat shock protein) και αναστέλλει τη σύνθεση της φλαγγελίνης στο βακτήριο *Escherichia coli* (Burt et al., 2007).

Η κινναμαλδεύδη (κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου της κανέλλας) δρά ως αντιμικροβιακή ουσία μέσω αδρανοποίησης των μικροβιακών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα (Ultee, 2002). Σύμφωνα με τους Frankic et al. (2009), η ακριβής εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης είναι πολύ δύσκολη *in vivo*, εξαιτίας της υψηλής πολυπλοκότητας και της ισορροπίας των μικροοργανισμών που υπάρχουν εντός του πεπτικού συστήματος των ζώων. Επιπλέον, υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιθέριων ελαίων και διάφορων άλλων συστατικών εντός του εντερικού περιεχομένου. Σημειώνεται ότι παρουσία χηλικών ενώσεων (EDTA), χαμηλών θερμοκρασιών και χαμηλού pH, η αποτελεσματικότητα των αιθέριων ελαίων αυξάνεται λόγω του ότι διευκολύνεται η διείσδυσή τους στα μικροβιακά κύτταρα (Muyima et al., 2002).

Τέλος, τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν την διαπερότητα όχι μόνο της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και άλλων βιολογικών μεμβρανών (μιτοχόνδρια, περοξυσώματα), να προκαλέσουν απώλεια ενδοκυτταρικών μεταβολιτών (πρωτεΐνες,

κυτόχρωμα C, Ca²⁺), πήξη του μικροβιακού κυτταροπλάσματος (πιθανώς μέσω μετουσίωσης πρωτεϊνών), να προκαλέσουν βλάβες σε πρωτεΐνες και λιπίδια, και τελικά να προκαλέσουν λύση του βακτηριακού κυττάρου (Bakkali et al., 2008). Σημειώνεται ότι η τοξικότητα των αιθέριων ελαίων στα κύτταρα των θηλαστικών προκαλείται από πρόκληση απόπτωσης ή νέκρωσης (Bakkali et al., 2008).

Λόγω του ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων, μπορούν κάλλιστα να ενσωματωθούν σε ζωικά προϊόντα όπως πχ., αλεσμένο κρέας προκειμένου να μειώσουν το μικροβιακό φορτίο και να καταστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Σε σχετική εργασία (Gonaris et al., 2010) προσθήκη 0,6 % ή 0,9 % ριγανελαίου σε πρόβειο αλεσμένο κρέας παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της σαλμονέλλας (*Salmonella enteritidis*).

2.4.3. Αντιμυκητιακή δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από μυκητοκτόνο δράση (Ahmet et al., 2005) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες τόσο σε φυτά (Hossain et al., 2008) όσο και σε ζώα και ανθρώπους (Cavaleiro et al., 2006). Αυτό αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή διότι οι παθογόνοι μύκητες παρουσιάζουν πλέον ανθεκτικότητα στις περιορισμένου αριθμού αντιμυκητιακές χημικές ενώσεις (Cavaleiro et al., 2006).

Στην περίπτωση του ανθρώπου, η αρωματοθεραπεία έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην καταπολέμηση των δερματόφυτων (όπως πχ., *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. Mentagrophytes*) τα οποία προσβάλλουν κυρίως άτομα με ανοσοκαταστολή (Cavaleiro et al., 2006). Επίσης, σημειώνεται ότι συνδυασμός αιθέριων ελαίων με διάφορες αντιμυκητιακές χημικές ενώσεις βελτιώνει την αποτελεσματικότητά τους (Amber et al., 2010).

Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης, τα αιθέρια έλαια αναστέλλουν την διαπνοή των μυκητιακών κυττάρων (Carson et al., 2006) και προκαλούν αλλαγές στην ρευστότητα και την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Hammer et al., 2004). Επιπλέον, προκαλούν αποκόλληση της κυτταρικής μεμβράνης από το κυτταρικό τοίχωμα, αποδιοργάνωση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων, απώλεια κυτταροπλάσματος, πλήρη

αποδόμηση των υφών (Tolouee et al., 2010) ενώ ενδεχομένως αναστέλλουν τη σύνθεση εργοστερόλης από τους μύκητες (Pauli, 2006).

2.4.4. Αντιϊκή δράση

Αιθέρια έλαια που προέρχονται από πληθώρα αρωματικών φυτών, όπως το μάραθο (*Foeniculum vulgare*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*), η μέντα (*Mentha spicata*), το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) κ.α. χαρακτηρίζονται από αντιϊκή δράση (Reichling et al., 2009).

In vitro, έχει παρατηρηθεί μείωση της μολυσματικότητας (ερπητοϊός HSV-1) σε ποσοστό >96% για το αιθέριο έλαιο ευκάλυπτου και θυμαριού και σε ποσοστό >80% για αιθέρια έλαια που περιέχουν μόνο τερπένια (Astani et al., 2010).

Σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης ελάχιστα είναι γνωστά. Σε σχετική ερευνητική εργασία (Reichling et al., 2009) παρατηρήθηκε ότι οι ελεύθεροι ιοί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στα αιθέρια έλαια. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα αιθέρια έλαια τροποποιούν τον ιικό φάκελο ή καλύπτουν ιικά συστατικά απαραίτητα για την προσκόληση και απορρόφηση στα κύτταρα στόχους. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι όταν ο ιός έχει ήδη εισέλθει εντός του κυττάρου στόχου, δεν επηρεάζεται από τα αιθέρια έλαια.

2.4.5. Αντιπρωτοζωική δράση

Σε σχετική εργασία (Machado et al., 2010) παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση (*in vitro*) στην ανάπτυξη του πρωτόζωου *Leishmania infantum*. Οι τιμές της ημίσειας αποτελεσματικής συγκέντρωσης κυμαινόταν από 16-51 μg/ml για τα αιθέρια έλαια των φυτών *Cymbopogon citratus*, *Juniperus oxycedrus* (Γιουνίπερος), *Thymus capitellatus* (είδος θυμαριού). Έτσι, τα αιθέρια έλαια μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα στο μέλλον σε έρευνες για νέους θεραπευτικούς παράγοντες κατά ασθενειών που προκαλούνται από πρωτόζωα.

2.4.6. Αντιοξειδωτική δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση μέσω αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες και μέσω ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δεσμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (Frankic et al., 2009). Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται κυρίως σε φαινολικά τερπένια στα οποία η ρίγανη, το θυμάρι, το φασκόμηλο, το δενδρολίβανο, το χαμομήλι και το πράσινο τσάι είναι ιδιαίτερα πλούσια. Εξ αυτών, το πιο καλά μελετημένο για την αντιοξειδωτική του δράση είναι το δενδρολίβανο (Yanishlieva et al., 2006). Σήμερα, το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται στο φασκόμηλο και στη ρίγανη και συνεχώς αυξάνουν οι ερευνητικές εργασίες που μελετούν την αντιοξειδωτική τους δράση.

Ωστόσο, τα αρωματικά φυτά περιλαμβάνουν και άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση εκτός των αιθέριων ελαίων, όπως πχ., φλαβονοειδή, υδροδιαλυτές ταννίνες, προανθοκυανιδίνες, φαινολικά οξέα και βιταμίνες (E,C,A) (Frankic et al., 2009).

Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των αρωματικών φυτών υπάρχουν αναρίθμητες εφαρμογές. Για παράδειγμα, μπορούν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα προκειμένου να τα προστατεύσουν κατά την αποθήκευσή τους και κυρίως τα λιπίδια τα οποία όταν οξειδωθούν δίνουν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις στα προϊόντα (Yanishlieva et al., 2006). Η ερευνητική μελέτη των Chipault et al., (1956), στην οποία μελετήθηκαν 70 αρωματικά φυτά, έδειξε ότι το δενδρολίβανο και το φασκόμηλο είναι τα πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά όταν προστίθενται σε χοιρινό λίπος. Επίσης, το δενδρολίβανο είναι κατάλληλο για προστασία ελαίων τα οποία χρησιμοποιούνται για τηγάνισμα (Gordon et al., 1995) ενώ έχει παρατηρηθεί συνέργεια μεταξύ του αιθέριου ελαίου του και της α-τοκοφερόλης (Wada and Fang., 1992) καθώς επίσης και με το κιτρικό οξύ (Chipault et al., 1952).

Στην πράξη, χρησιμοποιείται κυρίως το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) το οποίο μπορεί να συνδυάζεται με τοκοφερόλες ή συνθετικά αντιοξειδωτικά (Jacobsen et al., 2008). Άλλα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία τροφίμων είναι ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) και το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) (Seung-Joo et al., 2005).

2.4.7. Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα κυριότερα αιθέρια έλαια με αντιφλεγμονώδη δράση είναι τα τερπένια. *In vivo* μελέτες σε επίμυς έχουν δείξει αντιφλεγμονώδη δράση των αιθέριων ελαίων για διάφορα αρωματικά φυτά όπως το μοσχοκάρυδο, το κύμινο, η κανέλλα, το τζίντζερ, η μέντα (Srinivasan, 2005), το δενδρολίβανο και ο ευκάλυπτος (Santos and Rao, 2000). Η αντιφλεγμονώδης δράση των αιθέριων ελαίων αποδίδεται στη λιπόφιλη φύση τους. Τα αιθέρια έλαια ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που παράγουν ισταμίνη (mast cells) μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο λειτουργικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την καταστολή τους (Lahlou, 2004). Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια μειώνουν την παραγωγή προσταγλαδινών που σχετίζονται με τις φλεγμονές (Srinivasan, 2005, Santos and Rao, 2000). Σε πειράματα που έχουν γίνει σε ανθρώπους έχει παρατηρηθεί αναστολή της σύνθεσης κυτοκινών και μείωση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος από την 1,8-κινεόλη (Santos and Rao, 2000). Η 1,8-κινεόλη είναι ένα τερπενικό οξείδιο το οποίο απαντάται στο αιθέριο έλαιο πολλών αρωματικών φυτών όπως πχ., ο ευκάλυπτος και το δενδρολίβανο.

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η επαναλαμβανόμενη χρήση αιθέριων ελαίων μπορεί να προκαλέσει ορισμένα προβλήματα (πχ. αλλεργική δερματίτιδα). Σε σχετική εργασία (Anderson et al., 2000) χρησιμοποιήθηκαν 36 αιθέρια έλαια για την θεραπεία του εκζέματος σε παιδιά. Παρατηρήθηκε ότι μέχρι τις πρώτες 8 εβδομάδες της αρωματοθεραπείας υπήρξε βελτίωση των ασθενών, αλλά μετά τις 8 εβδομάδες τα αιθέρια έλαια προκάλεσαν αλλεργική δερματίτιδα. Έτσι, οι αρωματοθεραπείες θα πρέπει να γίνονται με προσοχή ενώ απαιτείται περισσότερη έρευνα στο θέμα αυτό.

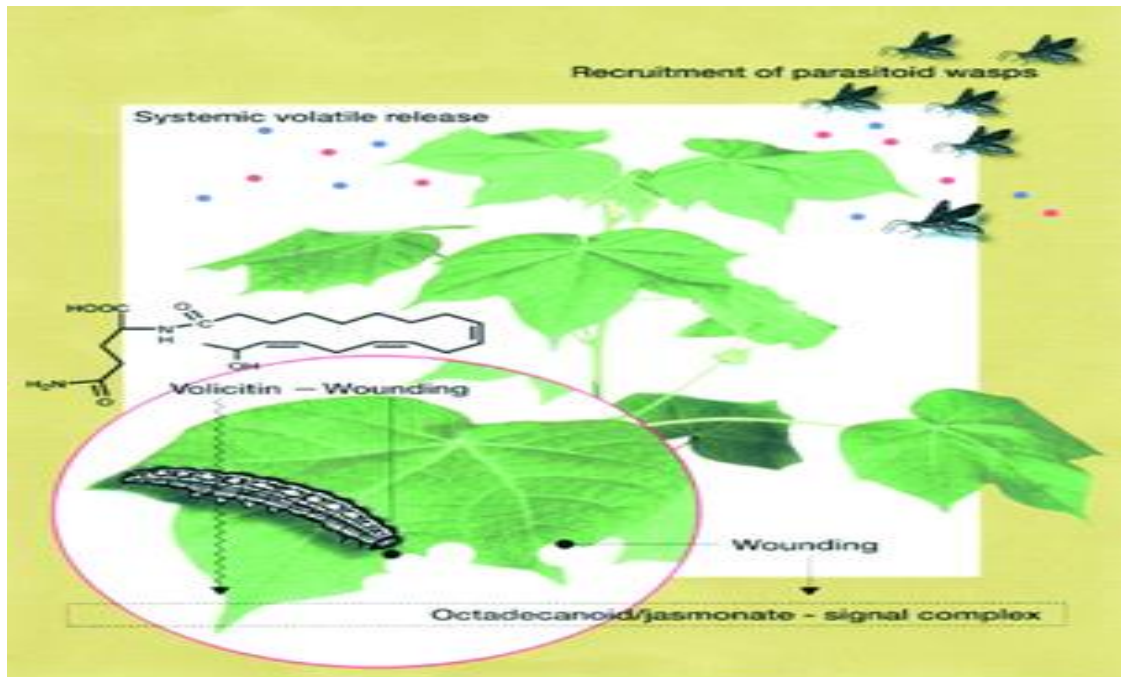
2.4.8. Εντομοαπωθητική, εντομοκτόνος, εντομοελκυστική δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από εντομοαπωθητική, εντομοκτόνο ή εντομοελκυστική δράση αφού η δράση ενός αιθέριου ελαίου εξαρτάται κυρίως από το είδος του εντόμου (Epan, 2001). Σημειώνεται ότι τα οξυγονωμένα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ισχυρότερη εντομοκτόνο (Priestley et al., 2006) και εντομοαπωθητική δράση (Nerio et al., 2010).

Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο του ευκάλυπτου χαρακτηρίζεται από εντομοκτόνο δράση για τις ψείρες που προσβάλλουν τον άνθρωπο (*Pediculus humanus capitis*), την οικιακή μύγα (*Musca domestica*) και διάφορα άλλα έντομα όπως π.χ., *Sitophilus zeamais*, *Callosobruchus maculatus*, *Sitophullis oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Lycoriella mali*, *Coccyra cephalonica* (Batish et al., 2008). Η χρήση αιθέριων ελαίων έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την εξάλειψη της ψείρας στον άνθρωπο (Priestley et al., 2006).

Η εφαρμογή αιθέριων ελαίων ευκάλυπτου στο δέρμα μπορεί να απωθήσει έντομα όπως για παράδειγμα τα κουνούπια μέχρι και 8 ώρες από τη χρήση τους (Trigg, 1996). Ωστόσο η εφαρμογή τους σε ενδύματα μπορεί να επιμηκύνει την εντομοαπωθητική δράση τους ακόμη και για 8 ημέρες (Mumcuoglu et al., 1996). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το Αμερικάνικο κέντρο ελέγχου και πρόληψης ασθενειών (CDC) συνιστά την χρήση του αιθέριου ελαίου *p-menthane-3,8-diol* για την αποφυγή της μόλυνσης από τον ιό του δυτικού Νείλου ο οποίος προσβάλλει το νευρικό σύστημα και μεταδίδεται από τα κουνούπια (Kuehn, 2005). Σημειώνεται ότι από ιστορικής άποψης, η έρευνα σχετικά με την εντομοαπωθητική δράση των αιθέριων ελαίων ξεκίνησε κατά τον 2^ο παγκόσμιο πόλεμο λόγω της μείωσης της αποτελεσματικότητας των συμβατικών εντομοαπωθητικών (Nerio et al., 2010). Επίσης, η συγκεκριμένη έρευνα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη σημερινή εποχή λόγω της υπερθέρμανσης του πλανήτη όπου τα κουνούπια (μετάδοση μαλάριας, κίτρινου πυρετού) μετατοπίστηκαν σε νέες γεωγραφικές περιοχές (πιο εύκρατες, μεγαλύτερο υψόμετρο). Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι εκτίθενται άνθρωποι των περιοχών αυτών σε ασθένειες στις οποίες είναι πιο ευάλωτοι.

Ωστόσο τα αιθέρια έλαια δεν χαρακτηρίζονται μόνο από εντομοκτόνο και εντομοαπωθητική δράση αλλά και από εντομοελκυστική ωφέλιμων εντόμων. Για παράδειγμα, ορισμένα μονοτερπένια εκκρίνονται κατά τη διάρκεια επίθεσης φυτοφάγων εντόμων τα οποία μπορούν να δράσουν και ως οδηγός για θηρευτές (π.χ. παρασιτικές σφήκες) (Pare and Tumlinson, 1999). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός παρουσιάζεται στην εικόνα 2.5. Επιπλέον, ορισμένα αιθέρια έλαια μπορούν να προσελκύσουν έντομα επικονιαστές όπως για παράδειγμα τις μέλισσες (Isman, 2000).



Εικόνα 2.5. Το φαινόμενο της εντομοελκυστικής δράσης των τερπενίων με σκοπό την προστασία του φυτού (πηγή: *Essential oil international journal*)

Η εντομοκτόνος δράση των αιθέριων ελαίων ασκείται μέσω διείσδυσης του περιβλήματος των εντόμων και σύνδεση σε υποδοχείς-πρωτεΐνες με νευρολογική δράση (Lahlou et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ευγενόλη, η α-τερπινεόλη και η κινναμική αλκοόλη ή μείγμα αυτών (1/1/1) προκαλεί θανάτωση της Αμερικάνικης κατσαρίδας (*Periplaneta americana*), των μυρμηγκιών του ξύλου (*Camponotus pennsylvanicus*) και της Γερμανικής κατσαρίδας (*Blattella germanica*) μέσω μείωσης της συγκέντρωσης του cAMP και μπλοκάροντας τους υποδοχείς της οκτοπαμίνης (Epan, 2001). Σημειώνεται ότι η οκτοπαμίνη είναι μια ουσία που υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες στο νευρικό σύστημα των αρθροπόδων (συμπεριλαμβανομένων των κλάσεων Insecta και Crustaceae) και η οποία κατέχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων όπως πχ. δρα ως νευρομεταβιβαστής και νευρο-ορμόνη). Ενδεικτικά σημειώνεται η LC50 για την Αμερικάνικη κατσαρίδα (η οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στα αιθέρια έλαια) η οποία είναι 0.047 mg/cm² για την ευγενόλη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αιθέρια έλαια βιοαποδομούνται εύκολα και γρήγορα στο περιβάλλον (Zygodlo and Grosso, 1995), δεν αφήνουν υπολείμματα στο νερό και στο έδαφος (Isman, 2006) ενώ χαρακτηρίζονται από μηδαμινή έως ανύπαρκτη τοξικότητα

σε πτηνά, ιχθείς και θηλαστικά (Epan et al., 1998). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της α-τερπινεόλης, όταν εκτίθεται σε αερόβιες συνθήκες αποδομείται πλήρως σε 50 h (Misra and Pavlostathis, 1997). Η ευγενόλη αποδομείται πλήρως σε κοινά οργανικά οξέα από βακτήρια (*Pseudomonas*) του εδάφους (Rabenhorst, 1996).

Όλες αυτές οι ιδιότητες τα καθιστούν ασφαλή για οποιαδήποτε χρήση (πχ. ψεκασμός καλλιεργειών, χορήγηση σε ζώα) ακόμη και σε ευαίσθητες περιοχές όπως πχ., σχολεία, νοσοκομεία και οικίες (Batish et al., 2008). Ωστόσο, η επίδραση τέτοιων εφαρμογών στα οικοσυστήματα έχει ελάχιστα μελετηθεί (Isman, 2000). Έτσι, παραδείγματος χάριν, ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση σε έντομα τα οποία δεν αποτελούν εχθρούς καλλιεργειών όπως για παράδειγμα οι μέλισσες οι οποίες είναι έντομα επικονιαστές. Επιπλέον, τα πιο αποτελεσματικά αιθέρια έλαια για την καταπολέμηση των διάφορων παρασίτων είναι ταυτόχρονα και τα πιο φυτοτοξικά (Isman, 2000). Τέλος, η εμπορευματοποίηση των αιθέρων ελαίων στην διεθνή αγορά αντιμετωπίζει τρία εμπόδια (Isman, 2000): την σπανιότητα των αιθέρων ελαίων στη φύση, την απουσία ποιοτικού ελέγχου και τυποποίησης της χημικής σύστασης και τα νομοθετικά εμπόδια.

2.4.9. Αντικαρκινική δράση

Ο αριθμός των εργασιών που αποδεικνύουν την αντικαρκινική δράση των αιθέρων ελαίων συνεχώς αυξάνεται (Vicuna et al., 2009). Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από αντικαρκινική δράση μέσω αναστολής της αγγειογένεσης η οποία αποδίδεται στην αναστολή της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών (Chen et al., 2010). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το φαινόμενο της αγγειογένεσης κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων. Το λεμονένιο μπορεί να αποδειχθεί στο μέλλον ως ένα πολύτιμο φυσικό συστατικό για την καταπολέμηση του καρκίνου (Grabman 2005).

Ωστόσο, η αναστολή της αγγειογένεσης είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη κατά την εγκυμοσύνη, αφού κατά την ανάπτυξη του ενδομητρίου και του πλακούντα η έντονη αγγειογένεση είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που χαρακτηρίζουν την εγκυμοσύνη (Rowe et al., 2004). Σε πειραματικό επίπεδο, το αιθέριο έλαιο του φυτού *Artemisia monosperma* προκάλεσε αποβολές κατά την εγκυμοσύνη σε επίμυς, και ως εκ τούτου η κατανάλωση του φυτού ή του αιθέρου ελαίου θα πρέπει να αποφεύγεται από κυοφορούντα ζώα αλλά και γυναίκες (Hijazi and Salhab, 2010). Έτσι, θεωρητικά θα

πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση αιθέριων ελαίων σε υψηλές δόσεις κατά την κυοφορία, αφού δεν έχουν εκτιμηθεί οι επιπτώσεις όλων των αρωματικών φυτών και η μέγιστη δοσολογία που μπορεί να προκαλέσει αποβολές.

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι η πρόκληση απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) στα καρκινικά κύτταρα *in vivo* (Lai et al., 2004) και *in vitro* (Sharma et al., 2009).

Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη ασκούν προστατευτική δράση στο DNA απέναντι σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες (Vicuna et al., 2009). Ειδικά για την θυμόλη, έχει βρεθεί ότι αυξάνει και την δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δεσμουτάση του υπεροξειδίου και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης σε επίμυες (Vicuna et al., 2009). Σε γενικές γραμμές, η προστατευτική δράση της θυμόλης και της καρβακρόλης φαίνεται να οφείλεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Επίσης σημειώνεται ότι σε γενικές γραμμές τα αιθέρια έλαια δεν προκαλούν μεταλλάξεις σε κανένα είδος εντόμου, βακτηρίου ή μύκητα (Bakkali et al., 2008), αν και φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις (Zani et al., 1991, Franzios et al., 1997).

Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν ορισμένα αιθέρια έλαια όπως πχ. η μεθυλική τσαβικόλη, η μεθυλική ευγενόλη, η πουλεγόνη, η εστραγόλη και το D-λεμονένιο τα οποία χαρακτηρίζονται από καρκινική δράση (Bakkali et al., 2008). Η παρατήρηση αυτή έχει γίνει σε τρωκτικά (μυς και επίμυς). Ειδικότερα, η μεθυλική ευγενόλη εντοπίζεται στο αιθέριο έλαιο των φυτών *Laurus nobilis* και *Melaleuca leucadendron* (Burkey et al., 2000), η εστραγόλη εντοπίζεται στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού και της αρτεμισίας (Anthony et al., 1987), ενώ η πουλεγόνη δε διάφορα είδη μέντας (Zhou et al., 2004). Όμως, απαιτείται μακροχρόνια κατανάλωση των συγκεκριμένων αιθέριων ελαίων προκειμένου να προκληθεί καρκίνος.

2.4.10. Αντιπαρασιτική δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ανθελμινθική δράση. Σε σχετική εργασία (Camurca-Vasconcelos et al., 2008) παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο (283 mg/kg ZB) του φυτού *Lippia sidoides* (οικ. Verbenaceae) προκαλεί υψηλή θνησιμότητα νηματωδών σκωλήκων (*Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*) σε πρόβατα.

Μάλιστα η θνησιμότητα που προκαλείται από μια δόση αιθέριου ελαίου της τάξεως των 283 mg/kg ZB είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη που προκαλείται από το συμβατικό φάρμακο ivermectin σε δόση 200 µg/kg ZB.

Οι Macedo et al. (2010), παρατήρησαν ότι προσθήκη αιθέριου ελαίου ευκαλύπτου (*Eucalyptus staigeriana*) στα σιτηρέσια αιγών (500 mg/kg) προκαλούν σχεδόν πλήρη αναστολή (99,27%) της εκκόλαψης ωών του νηματώδους σκώληκα *Haemonchus contortus*. Παρόμοια αποτελέσματα (λιναλοόλη, ευγενόλη, μενθόλη, κινεόλη) έχουν δημοσιευτεί και για νηματώδεις σκώληκες που προσβάλλουν φυτά (Sangwan et al., 1990).

Η χρήση των αιθέριων ελαίων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή και αιτιολογείται από το γεγονός ότι σήμερα υπάρχει ανάπτυξη ανθεκτικότητας των νηματωδών σκωλήκων σε όλα τα συμβατικά φάρμακα (Melo et al., 2003).

Επίσης, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι τα αιθέρια έλαια προκαλούν θανάτωση των τσιμπουριών. Οι Cetin et al. (2009) παρατήρησαν πλήρη θνησιμότητα του *Rhipicephalus turanicus* σε 120 min κατόπιν έκθεσης στο αιθέριο έλαιο (>10 µL/L) του φυτού *Origanum minutiflorum* το οποίο περιείχε υψηλά ποσά καρβακρόλης. Σημειώνεται ότι το συγκεκριμένο είδος τσιμπουριού κατατάσσεται στην οικογένεια Ixodidae (‘‘σκληρά τσιμπούρια’’).

2.4.11. Ακαρεοκτόνος δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ισχυρή ακαρεοκτόνο δράση. Σε σχετική εργασία (Sertkaya et al., 2010) βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, του θυμαριού, της λεβάντας και της μέντας προκαλούν πλήρη θνησιμότητα του *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina:Tetranychidae) σε συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για το φυτό ξενιστή. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης και του θυμαριού ήταν πολύ ισχυρότερα από τα αιθέρια έλαια της μέντας και της λεβάντας. Έτσι, η LC50 ήταν 0.53, 0.69, 1.83, 2.92 µg/ml αέρα αντίστοιχα για το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, του θυμαριού, της μέντας και της λεβάντας. Υψηλή θνησιμότητα σε κόκκινα ακάρεα (*Dermanyssus gallinae*) που προσβάλλουν πτηνά παρατήρησαν και οι George et al. (2008) και κυρίως για το αιθέριο έλαιο του θυμαριού.

2.4.12. Αυξητική δράση

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα αρωματικά φυτά ενισχύουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, το σκόρδο και το μοσχοκάρυδο ευνοούν την ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum* ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την ικανότητα του μικροοργανισμού να ζυμώνει τη γλυκόζη (Nes and Skjelkvale, 1982). Αρωματικά φυτά και τα αιθέρια έλαιά τους με αυξητική δράση μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να τροποποιήσουν τα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων των μηρυκαστικών όπως για παράδειγμα να ενισχύσουν την ανάπτυξη βακτηρίων που διασπών τις ινώδεις ουσίες του σιτηρεσίου. Ωστόσο, γύρω από το συγκεκριμένο θέμα έχει γίνει ελάχιστη έρευνα (Greathead, 2003).

2.4.13. Άλλες ιδιότητες

Τα αιθέρια έλαια εκτός των προαναφερθείσων ιδιοτήτων χαρακτηρίζονται, επίσης, και από αναλγητική (Matsuda et al., 2004) αντι-αλλεργική (Navarro Dde et al., 2002), ανοσοδιεγερτική (Craig, 1999) και νευρολογική δράση (Lahlou, 2004).

Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Alpinia galanga*, όπως παρατηρήθηκε σε μυς, αναστέλλει τις αναφυλακτικές αντιδράσεις μέσω αναστολής της παραγωγής του α -TNF και της IL-4, δύο παράγοντες οι οποίοι συμμετέχουν στην ύστερη φάση του τύπου I αλλεργικών αντιδράσεων σε RBL-2H3 κύτταρα (Matsuda et al., 2003).

Τα αιθέρια έλαια των φυτών της γλυκόριζας και του σκόρδου μπορούν να ενισχύσουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων μέσω αύξησης του φαινομένου της φαγοκυττάρωσης ή μέσω αύξησης της παραγωγής ιντερφερόνης (Craig, 1999).

Η λιναλοόλη, καθώς επίσης και το αιθέριο έλαιο του φυτού *L. angustifolia*, μπορεί να προκαλέσει καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος και τοπική αναισθησία τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Ghelagrini et al., 1999). Αυτό αποδίδεται στην αντι-μουσκαρινική δράση και/ή στην παρεμπόδιση της μεταφοράς ιόντων (Na^+ ή Ca^{2+}) μέσω κορεσμού των κυτταρικών μεμβρανών. Τα αιθέρια έλαια λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων,

μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο λειτουργικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τις διόδους μεταφοράς των ιόντων (Buchbauer, 1993). Επίσης, ορισμένα αιθέρια έλαια αλληλεπιδρούν με την πρωτεϊνική κινάση C, ένα ένζυμο το οποίο επηρεάζει τον καρδιακό παλμό και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος (Colby and Blaustein, 1988). Τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του κεντρικού συστήματος αλλά υπάρχουν δύο αντικρουόμενες θεωρίες όσον αφορά τον μηχανισμό (Lahlou, 2004). Η πρώτη θεωρία υποστηρίζει ότι τα αιθέρια έλαια λόγω της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Bagetta et al., 2010) και μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος μέσω σύνδεσής τους με υποδοχείς των νευρικών κυττάρων. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι τα αιθέρια έλαια διεγείρουν τα οσφρητικά νεύρα τα οποία αντιστοιχούν στο δεξιό ημισφαίριο του εγκεφάλου, το οποίο σχετίζεται με λειτουργίες όπως τα συναισθήματα, οι αισθήσεις, η αγωνία, ο φόβος, η αρμονία και πολλές άλλες. Ωστόσο, σε σχετική μελέτη (Nasel et al., 1994), παρατηρήθηκε ότι η εισπνοή 1,8-κινεόλης (το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του ευκαλύπτου) από ανθρώπους οδήγησε σε αύξηση της εγκεφαλικής ροής του αίματος και αύξηση της δραστηριότητας του φλοιού, ακόμη και σε υγιή άτομα που δεν ήταν σε θέση να αντιληφθούν την οσμή του αιθέριου ελαίου.

2.4.14. Μελλοντικές εφαρμογές των αιθέριων ελαίων

Λόγω των πολυάριθμων ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων είναι πολύ πιθανόν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν για ποικίλες εφαρμογές, όπως πχ., για απολύμανση χώρων, προσωπική υγιεινή, για καταπολέμηση των εχθρών των καλλιεργειών, για συντήρηση τροφίμων κ.α. Ωστόσο, μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές αναμφίβολα είναι η χρήση των αιθέριων ελαίων στην καταπολέμηση του καρκίνου χωρίς να προκαλούν τοξικότητα ή παρενέργειες σε υγιείς ιστούς. Υπάρχουν αναρίθμητα αρωματικά φυτά με αντικαρκινική δράση στην περίπτωση του ανθρώπου (Bakkali et al., 2008) όπως πχ. : *Myrica gale*, *Nigella sativa*, *Ocimum sativum*, *Citrus citrates*, *Alpinia officinarum*, *Lavandula angustifolia*, *Vetiveria zizanioides*, *Zingiber montanum*, *Piper nigrum*, *Cymbopogon nardus*, *Curcuma longa*, *Ocimum basilicum*, *Citrus basilicum*, *Citrus hystrix*, *Piper betle*, *Albizia lebbek*, *Ocimum americanum*, *Mentha spicata*, *Psidium guajava*, τα οποία θα μπορούσαν να μεταβούν από τις παραδοσιακές στις μοντέρνες ιατρικές θεραπείες.

2.5. Χρήση αιθέριων ελαίων στη διατροφή των παραγωγικών ζώων

Αναρίθμητες εργασίες κατά την τελευταία κυρίως δεκαετία, έχουν μελετήσει την επίδραση των αιθέριων ελαίων στην διατροφή των παραγωγικών ζώων. Στον πίνακα 2.6 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της προσθήκης αιθέριων ελαίων και ξηράς δρόγης στις ζωοτεχνικές αποδόσεις σε χοίρους.

Πίνακας 2.6. Επίδραση διάφορων αρωματικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις αποδόσεις χοιριδίων.

Πρόσθετη ύλη	Δόση (g/kg)	Επίδραση % σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα			ΣΕΤ	Βιβλιογραφική αναφορά
		Κατανάλωση τροφής	Ζων βάρος	Ρυθμός ανάπτυξης		
<u>Αιθέρια</u>						
<u>έλαια</u>						
Κύμνο	0,1	-9/-2	-/0	-7/-	-3/-2	Schone et al.,(2004), Schone et al.,(2006)
Κανέλλα	0,1	+5	+2		+3	Gollnisch et al., (2001)
Κανέλλα	0,1	-5	0		-5	Wald et al., (2001)
Γαρούφαλλο	(5mL)	-5		0	-5	Tartrakoon et al., (2003)
Γαρούφαλλο	0,1	+1	0		+3	Gollnisch et al., (2001)
Γαρούφαλλο	0,1	+3	+7		-4	Wald et al., (2001)
Μείγμα αιθ. ελαίων	0,04	+4		+6	-2	Kroismayr et al., (2008)
Μείγμα αιθ. Ελαίων	0,04	+3		0	+3	Gollnisch et al. (2001)
Μάραθο	0,1	+3/+3	-/+6	+4/-	-2/-3	Schone et al.,(2004), Schone et al.,(2006)
Λεμονόχορτο	(5mL)	-3		+2	-5	Tartrakoon et al., (2003)
Λεμονόχορτο	0,1	-2	+2		-4	Wald et al.,(2001)
Ρίγανη	0,1	+3	+2		0	Gollnisch et al., (2001)
Ρίγανη	0,1	0	+5		-5	Wald et al. (2001)
Ρίγανη	0,5	-3	+7		-9	Gunther and Bossow (1998)
Ρίγανη	0,5	+12	+23		-9	Kyriakis et al., (1998)
Peppermint	(5 mL)	-4			-2	Tartrakoon et al., (2003)
Peppermint	0,1	-9	-3	-3	-7	Wald et al., (2001)
Γλυκοπίπερο	0,1	-8	-4		-5	Wald et al., (2001)
<u>Ξηρά δρόγη</u>						
Κολιάνδρο	2,0	+4	+7		-3	Schuhmacher et al., (2002)
Σκόρδο	1,0	-7/+5	+2/+1		-8/+4	Schuhmacher et al., (2002)
Ρίγανη	2,0	-1/+4	+9/+5		-10/0	Schuhmacher et al., (2002)

Φασκόμηλο	2,0	+3	+7		-4	Schuhmacher et al., (2002)
Θυμάρι	2,0	+4	+6		-3	Schuhmacher et al., (2002)
Θυμάρι	1,0	-1	+1	-1	-4	Hagmuller et al., (2006)
Θυμάρι	5,0	-1	-2	-1	+4	Hagmuller et al., (2006)
Μυριόφυλλο	2,0	+1	+4		-4	Schuhmacher et al., (2002)

Από τα στοιχεία του πίνακα αυτού, παρατηρούμε ότι η πλειοψηφία των ερευνητών χρησιμοποιεί κυρίως αιθέρια έλαια και όχι ξηρές δρόγες. Επίσης, παρατηρούμε βελτίωση των αποδόσεων σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο όχι θεαματικές. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των χοιριδίων από 2 % μέχρι 6% με την προσθήκη αιθέριων ελαίων στα σιτηρέσια. Επιπλέον, είναι χαρακτηριστική η περίπτωση της αύξησης του βάρους σφαγής κατά 23 % στην περίπτωση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης. Όμως, θα πρέπει να σημειωθεί συνοπτικά ότι τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά αφού σε πολλές περιπτώσεις οι αποδόσεις των χοιριδίων μειώνονται όπως πχ. η αύξηση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής. Ακόμη, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε ελάχιστες από τις ερευνητικές εργασίες που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα έχει μελετηθεί το κατά πόσο τα ζώα αποδέχονται την τροφή που περιέχει αιθέρια έλαια. Έτσι, αυξάνοντας την προσθήκη μάραθου, κύμινου, θυμαριού και ρίγανης έχει παρατηρηθεί μείωση στην κατανάλωση τροφής. Ο Ungerhoder (2004), παρατήρησε ότι τα χοιρίδια προτιμούν την τροφή χωρίς αιθέρια έλαια όταν τους δίνεται η δυνατότητα επιλογής (μάρτυρας vs ζωοτροφή με 1,2% ξηρά δρόγη w/w). Όταν δίνεται η δυνατότητα επιλογής μεταξύ ζωοτροφής που περιέχει θυμάρι και ζωοτροφής που περιέχει ρίγανη, τότε τα χοιρίδια προτιμούν την τροφή που περιέχει θυμάρι. Αυτό αποδίδεται στην δυνατότερη οσμή και γεύση της ρίγανης.

Στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζεται η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη θνησιμότητα και η σύγκριση της επίδρασης στις αποδόσεις ενός συμβατικού αντιβιοτικού με διάφορα αιθέρια έλαια. Παρατηρούμε ότι εκτός της βελτίωσης των αποδόσεων, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης μειώνει σημαντικά τη θνησιμότητα σε παχυνόμενα χοιρίδια ηλικίας 25-161 ημερών (από 25 % σε 10 %).

Πίνακας 2.7. Επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στις αποδόσεις και τη θνησιμότητα χοιριδίων (Franz et al., 2009).

Παράμετρος	Μάρτυρας	Ριγανέλαιο
------------	----------	------------

		250 g/t	500g/t
Ρυθμός ανάπτυξης (g)	573	653	687
ΣΕΤ ¹	3,04	2,74	2,66
Ποσοστό διάρροιας	2,88	2,16	1,81
Θνησιμότητα (%)	25	13	10

Ηλικία ζώων: 25-161 ημ.

¹Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής

Πίνακας 2.8. Χρήση διάφορων ελαίων ως αυξητικοί παράγοντες σε σύγκριση με συμβατικό αντιβιοτικό (Franz et al., 2009).

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4	Ομάδα 5
	Control	Avilamycin	oregano oil	clove oil	cinnamon oil
Ρυθμός ανάπτυξης (g/ημ)	398	437	407	392	407
Κατανάλωση τροφής (g/ημ)	596	636	614	602	625
ΣΕΤ (kg/kg)	1,50	1,46	1,51	1,54	1,54

Όταν συγκρίθηκαν, ως αυξητικοί παράγοντες διάφορα αιθέρια έλαια (ρίγανης, γαρύφαλλου, κανέλλας), με κάποιο συμβατικό αντιβιοτικό (Avilamycin) τότε οι ομάδες που λάμβαναν αιθέρια έλαια παρουσίασαν παρόμοιες ή ακόμη και υψηλότερες αποδόσεις (πίνακας 2.8). Αυτό το γεγονός είναι πολύ σημαντικό γιατί δείχνει ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αυξητικοί παράγοντες αντικαθιστώντας τα αντιβιοτικά.

Οι Leong et al. (2010) τονίζουν τα πλεονεκτήματα της προσθήκης σκόρδου στα σιτηρέσια παχυνόμενων χοιριδίων (αντί σε αλεσμένο κρέας): το σφάγιο χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο μικροβιακό φορτίο, θεωρείται δε ως πιο φυσικό προϊόν από την πλευρά των καταναλωτών, καταπολεμά τα παράσιτα και τις εντερικές φλεγμονές και τέλος δεν απαιτείται επεξεργασία του κρέατος (άλεση και ανάμειξη με αιθέρια έλαια). Ωστόσο, το μοναδικό μειονέκτημα είναι η υψηλότερη απαιτούμενη ποσότητα αιθέριων ελαίων (X25-37 φορές) η οποία εκτιμάται σε 3191-4681 mg/kg σφάγιου.

Στον πίνακα 2.9 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της προσθήκης διάφορων αιθέριων ελαίων και ξηράς δρόγης στις αποδόσεις πτηνών.

Πίνακας 2.9. Επίδραση διάφορων αρωματικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις αποδόσεις πτηνών.

Πρόσθετη ύλη	Δόση (g/kg)	Επίδραση % σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα				Βιβλιογραφική αναφορά
		Κατανάλωση τροφής	Ζων βάρος	Ρυθμός ανάπτυξης	ΣΕΤ	
<u>Αιθέρια έλαια</u>						
Γλυκάνισο	0,15	-1	+1		-1	Maylland-Quellhost (2002)
Καρβακρόλη	0,2	+2		+2	-1	Lee et al., (2003)
Κινναμαλδεϋδη	0,1	-2		-3	0	Lee et al., (2003)
Κανέλλα	0,1	-4	-3		-1	Wald (2002)
Γαρούφαλλο	0,1	-3	-4		+1	Wald (2002)
Λεμονόχορτο	0,1	+1	-1		+2	Wald (2002)
Ρίγανη	0,15/0,3	-6/-3		-2/+1	-4/-2	Besmacioglu et al., (2004)
Ρίγανη	0,1/1	-1/+3	+8/+6		-9/-3	Halle et al., (1999)
Ρίγανη	0,1	-2	-1		-1	Wald (2002)
Peppermint	0,1	-3	-2		-1	Wald (2002)
Δενδρολίβανο	0,15/0,3	0/-2		-1/+1	-1/-4	Besmacioglu et al., (2004)
Θυμόλη	0,1/0,2	+1/-5		+1/-3	-1/-3	Cabuk et al., (2006)
Μείγμα αιθ.ελαίων	0,024/0,048	-4/-5	0/0		-4/-6	Besmacioglu et al., (2004)
Μείγμα αιθ.ελαίων	0,075/0,15	-7/-7		-3/-1	-4/-1	Alcicek et al., (2004)
Μείγμα αιθ.ελαίων	0,036/0,048	+3/+2	-8/-8		-5/-4	Alcicek et al., (2003)
Μείγμα αιθ.ελαίων	0,024/0,048	-2/0	0/+14		-2/-12	Halle et al., (2001)
Μείγμα αιθ.ελαίων	1,0	-7	-3		-4	Westendarp et al., (2006)
Μείγμα αιθ.ελαίων		+2		0	+2	
<u>Ξηρές δρόγες</u>						
Σκόρδο	1,0	-5	-5		0	Sarica et al., (2005)
Ρίγανη	5,0	+5		+7	-2	Florou-Paneri et al., (2006)
Θυμάρι	1,0	+1	+2		-1	Sarica et al., (2005)
Θυμάρι	1,0/10	0/-1	-3/-5	-2/-4	+3/+6	Haselmeyer (2007)
Θυμάρι	0,06	0		+6		Denli et al., (2004)
Black seed	0,06	+1		+2		Denli et al., (2004)
Λυκίσκος	0,25	+2	+5	+4	-3	Cornelison et al.,

Γαλοπούλες						
Ξηρές δρόγες						
Ρίγανη	1,25	-5	+2			Bampidis et al., (2005b)
Ρίγανη	2,5	-6	+1			Bampidis et al., (2005b)
Κορίανδρος	5	+3		+1	+1	Guller et al., (2005)
Κορίανδρος	10	+3		+5	-1	Guller et al., (2005)
Κορίανδρος	20	+4		+8	-4	Guller et al., (2005)
Κορίανδρος	40	+5		+4	+1	Guller et al., (2005)

Στην περίπτωση των πτηνών και για την πλειοψηφία των μελετών, η προσθήκη αιθέριων ελαίων ή ξηράς δρόγης δεν έχουν δείξει καμία σημαντική επίδραση στην κατανάλωση της τροφής, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής σε πολλά πειράματα βελτιώθηκε (Πίνακας 9).

Ωστόσο, τα δημοσιευμένα αποτελέσματα ποικίλουν. Για παράδειγμα, στην εργασία των Lee et al. (2003) όπου τα παχυνόμενα ορνίθια κατανάλωσαν σιτηρέσιο με 200 mg καρβακρόλης ή θυμόλης /kg τροφής, η καρβακρόλη μείωσε την πρόσληψη τροφής, οδήγησε σε αύξηση του σωματικού βάρους σφαγής και βελτίωσε το συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής, ενώ η θυμόλη δεν έδειξε καμία επίδραση. Επιπλέον, η προσθήκη ξηράς δρόγης ρίγανης, σε ποσότητες 2-20 g/kg ζωοτροφής ή αιθέριου ελαίου ρίγανης (100-1000 mg/kg τροφής) είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των αποδόσεων σε παχυνόμενα ορνίθια (Halle et al., 2004).

Σε άλλη μελέτη (Westendarp et al., 2006), χρησιμοποιώντας καρβακρόλη, π-κυμένιο και γ-τερπινένιο ως σε 50 (καρβακρόλη) ή 25 (τερπινένιο,π-κυμένιο) mg/kg δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση. Οι Haselmayer et al. (2007), μελέτησαν τη θυμόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (από 0,1% έως 1,0% w/w) σε broilers. Δεν παρατήρησαν καμία σημαντική διαφορά στις αποδόσεις καθ' όλη την πειραματική περίοδο (35 ημέρες). Από την άλλη πλευρά, σε γαλοπούλες που κατανάλωσαν σιτηρέσια με 1,25-3,75 g/kg αποξηραμένα φύλλα ρίγανης διαπιστώθηκε σημαντική βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (Bampidis et al., 2005). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και σε ορτύκια όπου κατανάλωσαν σιτηρέσιο με αιθέριο έλαιο θυμαριού πλούσιο σε καρβακρόλη (60 ppm) και παρατηρήθηκε αύξηση του σωματικού βάρους και βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (Denli et al., 2004). Επιπλέον, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε μείωση της εναπόθεσης κοιλιακού λίπους. Τέλος, η προσθήκη 250 mg/kg λυκίσκου στη διατροφή παχυνόμενων ορνιθίων οδήγησε

σε σημαντική βελτιώση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής σε όλες τις ηλικίες των ορνιθίων, ενώ βελτιώθηκε και το τελικό σωματικό βάρος σε σύγκριση πάντα με τον μάρτυρα (Cornelison et al., 2006).

Σημειώνεται ότι όταν τα αιθέρια έλαια καταναλώνονται από όρνιθες ωοπαραγωγής, τα αιθέρια έλαια μεταφέρονται στον κρόκο του αυγού αλλά σε χαμηλές ποσότητες. Οι Krause and Ternes (1999) κατόπιν προσθήκης 1% (w/w) αιθέριου ελαίου σε όρνιθες, εκτίμησαν ότι το 0,004 % του π-κυμένου και το 0,006 % της θυμόλης μεταφέρεται και αποθηκεύεται στον κρόκο του αυγού. Ωστόσο, το γεγονός αυτό είναι σημαντικό λόγω του ότι βελτιώνεται η ποιότητα των αυγών (περιορισμένη οξείδωση λιπιδίων, κατανάλωση αιθέριων ελαίων από τους καταναλωτές).

Το γεγονός ότι το ίδιο αρωματικό φυτό ή το αιθέριο έλαιο δίνει διαφορετικά πειραματικά αποτελέσματα, αποδίδεται στην παραλλακτικότητα του προφίλ του αιθέριου ελαίου (Brenes and Roura, 2010). Όμως, το βέλτιστο προφίλ για κάθε αιθέριο έλαιο δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ενώ είναι απολύτως επιτακτικό να προσδιοριστεί στο μέλλον.

Θετικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και για παρασκευάσματα του εμπορίου τα οποία περιέχουν αιθέρια έλαια. Ωστόσο, τα παρασκευάσματα δεν δίνουν πάντοτε πληροφορίες σχετικά με την πλήρη χημική σύσταση, γεγονός που δυσκολεύει την αξιολόγηση των *in vivo* αποτελεσμάτων. Έτσι, παρόλο που υπάρχουν πολλές αβεβαιότητες σχετικά με τις δημοσιευμένες εργασίες, υπάρχουν αρκετές αποδείξεις ότι τα αιθέρια έλαια και οι ξηρές δρόγες των αρωματικών φυτών μπορούν να βελτιώσουν τις αποδόσεις χοίρων και πτηνών. Στον πίνακα 2.10 παρουσιάζονται οι δοσολογίες, η μορφή χορήγησης των αιθέριων ελαίων και η επίδρασή τους στις αποδόσεις και στην ποιότητα των προϊόντων σε μηρυκαστικά ζώα.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των μηρυκαστικών ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση που έχει η προσθήκη αιθέριων ελαίων στην κατανάλωση της τροφής (Greathead, 2003). Οι Estell et al. (1998) ανέφεραν ότι τα τερπένια μπορούν να επηρεάσουν την κατανάλωση τροφής στα πρόβατα, γεγονός πολύ σημαντικό για ζώα που εκτρέφονται και βόσκουν σε μεσογειακές χώρες. Επιπλέον, η δυνατότητα των αιθέριων ελαίων να επηρεάζουν τα ζυμωτικά φαινόμενα είναι υψίστης σημασίας (Franz et al., 2009).

Στην περίπτωση των μηρυκαστικών, το εύρος της δόσολογίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεταξύ 0.043-5000 mg/kg μείγματος.

Πίνακας 2.10. *In vivo* μελέτες που αφορούν την προσθήκη αιθέριων ελαίων στην διατροφή μηρυκαστικών ζώων.

Βιολογική Αναφορά Ποιότητα	Είδος/ποσότητα αιθέριων ελαίων	Μορφή χορήγησης	Είδος ζώου	Διάρκεια πειράματος (ημ)	Δειγματοληψία (εβδ)	NH3	pH	Παράμετροι			Αριθμός Δ W	
								ΠΛΟ	Οξικό	Βουτυρικό		CH4
προτόζων												
Bampidis (=)	Ριγανέλαιο	Ξηρά δρόγη	Αμνοί	70	κατά την σφαγή	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
et al., 2005	144 ή 288 mg/kg ΣΖ											
Chaves (=)	Καρβαρόλη ή Κιναμαλδεΐδη (0,2 g/kg ξ.ο)	Έλαιο	Αμνοί	77	3, 5, 7, 9 ⁿ (2, 6h)	(=)	(-)	(+)	(=)	(=)	(=)	(=)
et al., 2008												
Villalba (--)	μείγμα τερπενίων (3,1 g/kg)	Έλαιο	Αμνοί	28	2 ⁿ εβδ. (0, 2, 4, 6, 8h)	(--)	(+)	(-)	(=)	(=)	(-)	(-)
Et al., 2006												
Castillejos (=)	Crina ruminants* 110 mg/ημ/ζώο	Έλαιο	Πρόβατα (ξ.π)	28	4 ⁿ (0h, 3h)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
et al., 2007												
Newbold (=)	Crina ruminants* 110 mg/ημ/ζώο	Έλαιο	Πρόβατα (ξ.π)	42	6 ⁿ (4h, 6h)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
et al., 2004												
Simitzis (+)	Ριγανέλαιο (1mL/kg)	Έλαιο	Αμνοί	60	1 ⁿ , 2 ⁿ	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
et al., (2008)												

Βιβλιογραφική Αναφορά Ποιότητα	Είδος/ποσότητα αιθέριων ελαίων	Μορφή χορήγησης	Είδος ζώου	Διάρκεια πειράματος (ημ)	Δειγματοληψία (εβδ)	NH3	pH	Παράμετροι			Αριθμός Δ W		
								ΠΛΟ	Οξικό	Προπτονικό		Βουτυρικό	CH4
Ando et al., 2003 (=)	Peppermint (200 g/ημ/ζώο)	ξηρά	Μόσχοι	14	4 h	(-)	(-)	(=)	(-)	(=)	(=)	(=)	(-)
Beauchemin and Mc Ginn., 2006 (=)	Crina ruminants* 1g/ημ/ζώο	Έλαιο	Μόσχοι	21	2 ^η (4h)	(=)	(=)	(=)	(-)	(+)	(=)	(=)	(=)
Cardozo Et al., 2006 (=)	Μείγμα κινναμολδεΐδης Και ευγενόλης 0,27 /ημ/ζώο	Έλαιο	Μόσχοι	21	3 ^η	(-)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(+)
Cardozo Et al., 2006 (=)	Μείγμα κινναμολδεΐδης Και ευγενόλης 0,30 /ημ/ζώο	Έλαιο	Μόσχοι	21	3 ^η	(-)	(=)	(=)	(-)	(+)	(=)	(=)	(=)
Cardozo Et al., 2006 (=)	έλαιο γλυκανίσου 2 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Μόσχοι	21	3 ^η	(-)	(=)	(=)	(-)	(+)	(=)	(=)	(-)
Cardozo Et al., 2006 (=)	Έλαιο καρπού πιπεριάς 1 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Μόσχοι	21	3 ^η	(=)	(=)	(=)	(-)	(+)	(=)	(=)	(=)

Βιολογική Αναφορά Ποιότητα	Είδος/ποσότητα αιθέριων ελαίων	Μορφή χορήγησης	Είδος ζώου	Διάρκεια πειράματος (ημ)	Δειγματοληψία (εβδ)	NH3	pH	Παράμετροι ΠΛΟ	Οξικό	Προπιοτικό	Βουτυρικό	CH4	Αριθμός	Δ W
Benchaa (=) et al.,2008	Κινημαλδεύδη 1 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ.αγελάδες	28	16-17 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Fandino (=) et al.,2008	Έλαιο γλαυκάνισσο (ανηθόλη) 500 mg/ημ/ζώο	Σε κάμουλα	Μόσχοι	24	3-4 ^η (0h,4h,8h,12h)	(=)	(=)	(=)	(-)	(=)	(+)	(=)	(=)	(=)
Fandino (=) et al.,2008	Έλαιο πεπεριάς 500 mg/ημ/ζώο	Σε κάμουλα	Μόσχοι	24	3-4 ^η (0h,4h,8h,12h)	(-)	(=)	(-)	(-)	(=)	(+)	(=)	(=)	(=)
Benchaa (=) et al.,2007	Crina ruminants* 750 mg/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ. αγελάδες	28	3 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Benchaa (=) et al.,2008	Κινημαλδεύδη 1 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ. αγελάδες	28	20 ^η ημ	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Kung (=) Et al.,2008	Crina ruminants* 1,2 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ. αγελάδες	63	9 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Yang (=) et al.,2007	5 g σκόρδο/ημ/ζώο (1,5 %αλισίνη) 2 g μόυρα γουνίπερου /ημ/ζώο (35% α-πινένιο)	Έλαιο	Γάλα κτ. αγελάδες	21	2-3 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Malecky Et al., 2009 (=)	Μείγμα μονοτερπενίων (ανιλόλη, p-κυμένιο, α-πινένιο, β-πινένιο 0,043 ή 0,43)	Έλαιο στο σιτηρέσιο	Γάλακτ. 42 άγες	42	6 ^η (1,3,7)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Benchaa	Crina ruminants* Έλαιο	Γάλακτ.αγελάδες	28	3 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)

Βιολογική Αναφορά	Είδος/ποσότητα αιθέριων ελαίων	Μορφή χορήγησης	Είδος ζώου	Διάρκεια πειράματος (ημ)	Δοσολογία (εφδ)	Παράμετροι	Υψος γάλακτοπαραγωγής	Προσείνες	Λίπος	Λακτόζη	Ουρία	Προφιλ
Benchaa et al., 2007	Crina ruminants* 750 mg/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ.	28	21-28 ^η ημ	(=)	(=)	(=)	(+)	(=)	(=)	(=)
Benchaa et al., 2008	Κινναμάλδευδη 1 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ	28	21-28 ^η ημ	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Kung et al., 2008	Crina ruminants* 1,2 g/ημ/ζώο	Έλαιο	Γάλακτ.	63	κάθε εφδ.	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Spangero et al., 2009	Μείγμα καρβακρόλης, Κινναμάλδευδης Ευγενόλης, θυμόλης Τερπενίων 0,32 ή 0,64 ή 0,96 g/ημ/ζώο	Μικροκάνουλες	Γάλακτ.	21	3 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Yang et al., 2007	5 σκόρδο/ημ/ζώο (1,5 %αλισίνη) 2 g μούρα γιουνίτερου /ημ/ζώο (35% α-πινένιο)		Γάλακτ. αγελάδες	21	2-3 ^η	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Tekippe et al., 2011	500 g/ζώο (<i>Origanum vulgare</i>)	ξηρά δρόγη	Γάλακτ.	21	3 ^η	(=)	(=)	(=)	(+)	(=)	(=)	(=)
Serbestor et al., 2012.	25 mg/kg (Next enhance)	Μικροκάνουλες	Γάλακτ.	77	κάθε 3 μέρες	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
			Αγελ.									

Βιολογική Αναφορά	Είδος/ποσότητα αιθέριων ελαίων	Μορφή χορήγησης	Είδος ζώου	Διάρκεια πειράματος (ημ)	Δοσολογία (εβδ)	Παράμετροι	Υψος γάλακτοπαραγωγής	Πρωτεΐνες	Λίπος	Λακτόζη	Ουρία	Προφύλα
Malecky Et al., 2009 (=)	Μείγμα μονοτερπενίων (ανισοολίνη, p-κινένιο, α-πινένιο, β-πινένιο (0,043 ή 0,43 g/kg ξο)	Έλαιο	στο στήθος	Γάλακτ. 42	6 ^η (1,3,7 h)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Simitzis et al., (2007) (=)	Ριγανέλαιο (1mL/kg)	Έλαιο	Γάλακτοπαραγωγή πρόβατα	90	καθημερινά	(=)	(+)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)
Giannenas et al., (2011) (=)	Crina ruminants (50-150mg/kg)	Έλαιο	Γάλακτοπαραγωγή πρόβατα	147	σε εβδομαδιαία βίωση	(+)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)	(=)

(=) καμία επίδραση, (+) θετική επίδραση, (-) αρνητική επίδραση, (--) δεν μελετήθηκε. *Πατέντα της CRINA SA (Akzo Nobel, Gland, Switzerland) η οποία περιέχει θυμόλη, ευγενόλη, βανιλίνη, γκουαϊακόλη, λεμονένιο.

Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 10 οι ερευνητές χρησιμοποιούν αιθέρια έλαια είτε με την μορφή παρασκευασμάτων είτε με τη μορφή καθαρών συστατικών (πχ.καρβακρόλη, κινναμαλδεύδη) ενώ ελάχιστοι έχουν χρησιμοποιήσει ξηρές δρόγες (Ando et al., 2003, Bampidis et al., 2005) αρωματικών φυτών. Όμως η χρήση παρασκευασμάτων απαιτεί την απομόνωση των αιθέριων ελαίων από τη βιομηχανία, κάτι που ανεβάζει το κόστος αυτών των εφαρμογών. Στην περίπτωση των μεγάλων μηρυκαστικών, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως το εμπορικό παρασκεύασμα Crina Ruminants, το οποίο περιέχει θυμόλη, ευγενόλη, βανιλίνη, γκουαϊακόλη και λεμονένιο.

Σε καμία ερευνητική μελέτη δεν έχει παρατηρηθεί βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης και της ποιότητας του παραγόμενου σφάγιου κατόπιν προσθήκης αιθέριων ελαίων σε μόσχους. Επιπλέον, δεν έχει παρατηρηθεί αύξηση στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων. Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί μείωση (Fandino et al., 2008). Ωστόσο το προφίλ των λιπαρών οξέων φαίνεται ότι επηρεάζεται ευκολότερα από τα αιθέρια έλαια. Οι Ando et al. (2003) παρατήρησαν μείωση του προπιονικού οξέος, ενώ οι Cardozo et al. (2006) και οι Beauchemin et al. (2006) μείωση του οξικού και ταυτόχρονη αύξηση του προπιονικού οξέος. Επιπλέον, οι Fandino et al. (2008) παρατήρησαν μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος για μία ημερήσια δόση της τάξεως των 500 mg αιθέριου ελαίου γλυκανίσου/ημ/ζώο. Ωστόσο, στα γαλακτοπαραγωγά μηρυκαστικά, η μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος δεν είναι επιθυμητή αφού οδηγεί σε μείωση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος ενώ στα παχυνόμενα επιδιώκεται αύξηση της παραγωγής προπιονικού εις βάρος του οξικού οξέος. Τα μη ομοιόμορφα προαναφερθέντα αποτελέσματα ενδεχομένως οφείλονται στην διαφορετική μορφή χορήγησης των αιθέριων ελαίων (ξηρά δρόγη, αιθέρια έλαια) αλλά και στο διαφορετικό προφίλ των αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων και καθιστά επιτακτική την ανάγκη για περισσότερη έρευνα γύρω από την επίδραση των αιθέριων ελαίων στα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων.

Επίσης, οι Ando et al. (2003) και οι Cardozo et al. (2006) παρατήρησαν μείωση της συγκέντρωσης της αμμωνίας στη μεγάλη κοιλία χρησιμοποιώντας υψηλές ημερήσιες δόσεις της τάξεως των 200g/ημ/ζώο (ξηρά δρόγη) και 2 g/ημ/ζώο (κινναμαλδεύδη και ευγενόλη). Από την άλλη πλευρά, οι Tekippe et al. (2011) παρατήρησαν αύξηση στη συγκέντρωση της αμμωνίας κατόπιν προσθήκης ξηράς δρόγης ρίγανης στο σιτηρέσιο

(500g/ημ/ζώο). Αυτό δεν είναι επιθυμητό αφού ευνοεί την απώλεια αζώτου από τους προστομάχους αφού η ταχέως παραγόμενη αμμωνία δεν αξιοποιείται αποτελεσματικά από τους μικροοργανισμούς για σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης.

Σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες δεν έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες μεταβολές στην παραγωγή γάλακτος και στη χημική του σύσταση. Μόνο οι Tekippe et al. (2011) παρατήρησαν αύξηση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος.

Το παρασκεύασμα Crina Ruminants έχει χρησιμοποιηθεί και σε μικρά μηρυκαστικά (πρόβατα) αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και στις αποδόσεις (Castillejos et al., 2007, Newbold et al., 2004). Σύμφωνα με τους Simitzis et al. (2008), ο ψεκασμός ριγανελαίου σε σιτηρέσια αμνών βελτίωσε το ρυθμό ανάπτυξης και την ποιότητα του σφάγιου.

Οι Chaves et al. (2008), παρατήρησαν αύξηση της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων σε αμνούς κατόπιν προσθήκης καρβακρόλης ή κινναμαλδεύδης. Από την άλλη πλευρά, οι Villalba et al. (2006), παρατήρησαν μείωση της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων (μείωση οξικού και βουτυρικού οξέος) κατόπιν προσθήκης μείγματος τερπενίων (3,1 g/kg) στο σιτηρέσιο αμνών. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι μόνο οι Simitzis et al., (2008) και οι Villalba et al., (2006) χρησιμοποίησαν υψηλές δοσολογίες. Έτσι, οι χαμηλές δοσολογίες ενδέχεται να μην έχουν επίδραση στις αποδόσεις.

Σε γαλακτοπαραγωγά πρόβατα οι Giannenas et al. (2011), παρατήρησαν αύξηση της γαλακτοπαραγωγής σε χαμηλές δοσολογίες (50-150 mg Crina Ruminants/kg). Όσον αφορά την επίδραση των αιθέριων ελαίων στη χημική σύσταση του γάλακτος, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα. Οι Simitzis et al. (2007) παρατήρησαν αύξηση της πρωτεΐνοπεριεκτικότητας σε γαλακτοπαραγωγά πρόβατα τα οποία κατανάλωσαν σιτηρέσια με 1 ml ριγανελαίου/kg.

Συνοψίζοντας, έχει γίνει ελάχιστη έρευνα στα μικρά μηρυκαστικά αφού ο μεγαλύτερος αριθμός εργασιών αφορά γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και μόσχους. Έτσι, απαιτείται περισσότερη έρευνα στον τομέα αυτό και ιδιαίτερα στην επίδραση των αιθέριων ελαίων στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (πχ. κρέας, γάλα). Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί οι βέλτιστες δοσολογίες για κάθε αρωματικό φυτό ή αιθέριο έλαιο ή μεμονομένου συστατικού ανα είδος ζώου (Greathead, 2003). Τέλος, η παραλλακτικότητα των αποτελεσμάτων στις *in vivo*

εργασίες (πχ. για το ίδιο αιθέριο έλαιο) οφείλεται πιθανώς στις διαφορετικές δοσολογίες, στη χημική δομή των αιθέριων ελαίων, στη χημική σύσταση του σιτηρεσίου και στη φυσιολογία των ζώων, παράγοντες που συνήθως δεν περιγράφονται επαρκώς (Patra, 2011).

Κεφάλαιο 3. Η ΡΙΓΑΝΗ

3.1. Εισαγωγή

Η ρίγανη είναι γνωστή από την αρχαιότητα ως αρτυματικό φυτό. Το όνομά της προέρχεται από τις λέξεις **όρος** και **γάνος** και σημαίνει αυτός που λαμπρύνει το βουνό. Κατά την εποχή του Ομήρου επικράτησε και ο όρος του οριγανίων για όποιον κατανάλωνε ρίγανη (Σκουμπής, 1985). Σημειώνεται ότι ο Ιπποκράτης (5^{ος} αιώνας π.Χ) χρησιμοποιούσε τη ρίγανη για θεραπευτικούς σκοπούς σε πληθώρα ασθενειών του ανθρώπου. Οι πληροφορίες αυτές αναφέρονται εκτενώς από τον Θεόφραστο (372-287 π.Χ) στο βιβλίο ‘Περι φυτών ιστορία’ καθώς επίσης και από τον Διοσκουρίδη τον Αναζαρβέα (1^{ος} αιώνας μ.Χ) στο βιβλίο ‘Περι ύλης Ιατρικής’. Επιπλέον, οι αρχαίοι Έλληνες τοποθετούσαν στους τάφους ρίγανη, γιατί πίστευαν ότι βοηθούσε τους νεκρούς να κοιμούνται ήσυχα. Είναι, επίσης, χαρακτηριστικό το γεγονός ότι κατά τις γαμήλιες τελετές το αντρόγυνο φορούσε στεφάνια κατασκευασμένα από ματζουράνα (είδος ρίγανης) γιατί πίστευαν ότι προέρχεται από την Θεά Αφροδίτη.

Πιο πρόσφατα, ο ιδρυτής της ‘ερμητικής’ ιατρικής Παράκελσος (1493-1541) την χρησιμοποιούσε για τη θεραπεία πολλών ασθενειών του ανθρώπου. Έτσι, η χρήση της ρίγανης για φαρμακευτικούς σκοπούς ταξίδεψε από τα βάθη των αιώνων και έφτασε μέχρι τις ημέρες μας (Σκουμπής, 1985). Σήμερα εξακολουθεί να χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την θεραπεία πολλών ασθενειών όπως η ψωρίαση, η επιληψία, η τερηδόνα, οι κολικοί και η τριχόπτωση (Σκουμπής, 1985). Επίσης, χαρακτηρίζεται από τονωτική, ευστόμαχη, διεγερτική, διουρητική, καθαρτική εμμηναγωγό και ανθελμινθική δράση.

Σημειώνεται ότι η ρίγανη αυτοφύεται σε διάφορα μέρη του κόσμου όπως η Εύκρατη Ασία, η βόρεια Αφρική, η Αμερική και στις παραμεσόγειες χώρες τις Ευρώπης. Στην Ελλάδα, αυτοφυή φυτά ρίγανης υπάρχουν από το Βορά μέχρι το Νότο αλλά κυρίως σε

ορεινές και ημιορεινές περιοχές (Σκουμπής, 1985). Καλλιέργειες ρίγανης υπάρχουν κυρίως στους νομούς Καρδίτσας, Τρικάλων, Θεσσαλονίκης και Ροδόπης. Η ρίγανη συλλέγεται και αποξηραίνεται ενώ η ξηρά δρόγη εξάγεται κυρίως στις ΗΠΑ και την υπόλοιπη Ευρώπη (κυρίως Γερμανία) αφού η αξία της Ελληνικής ρίγανης έχει αναγνωριστεί ως η καλύτερη στον κόσμο. Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο η Ελλάδα και η Γερμανία έχουν τις περισσότερες καλλιεργήσιμες εκτάσεις ρίγανης που ανέρχονται σε 5500 και 5310 στρέμματα, αντίστοιχα (Τζουραμάνη και συν., 2012). Σημειώνεται ότι γίνεται εισαγωγή ρίγανης από την Τουρκία, τη Βουλγαρία και την Αλβανία (Τζουραμάνη και συν., 2012).

3.2. Ταξινόμηση και καλλιέργεια του φυτού

Η ρίγανη είναι πολυετής πόα η οποία κατατάσσεται στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiace) και στο γένος *Origanum* το οποίο περιλαμβάνει 7 είδη τα οποία απαντώνται στην Ελληνική χλωρίδα (Σκουμπής, 1985):

- *Origanum heracleoticum* ή *O. hirtum* ή *O. parviflorum*

Το είδος αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένο στην Ελλάδα και την Κύπρο. Ο βλαστός είναι όρθιος, τριχωτός και πολύκλαδος ενώ το ύψος του φυτού μπορεί να φτάσει τα 80 cm. Το συγκεκριμένο είδος ρίγανης αποτελεί και το κυριότερο εμπορικό είδος.

- *Origanum vulgare* (κοινώς αγριορίγανη)

Μορφολογικά, χαρακτηρίζεται από λεπτό, σκληρό, κοκκινωπό και συνάμα εύθραυστο βλαστό το ύψος του οποίου φτάνει μέχρι και 50 cm. Αυτοφύεται στην Ηπειρωτική Ελλάδα, στην Εύβοια, στην Κεφαλληνία, στην Κέρκυρα και στη Νάξο. Συλλέγεται σε μικρές ποσότητες και αναμιγνύεται με το φυτό *Origanum heracleoticum*.

- *Origanum maru* (κοινώς αγριορίγανη)

Μορφολογικά, χαρακτηρίζεται από βλαστό όρθιο, πολύκλαδο, λείο, χρώματος ανοικτού γαλάζιου. Αυτοφύεται στην Κρήτη σε ορεινές περιοχές όπου και συλλέγεται σε μικρές ποσότητες.

- *Origanum onites* (κοινώς τούρκικη ρίγανη).

Από μορφολογικής άποψης χαρακτηρίζεται από βλαστό απλό, όρθιο και τριχωτό ο οποίος μπορεί να φτάσει σε ύψος μέχρι και 30 cm. Αυτοφύεται στον νομό της Αττικής, της Αργολίδας, της Κορινθίας στην Κρήτη καθώς επίσης και στα νησιά του Αιγαίου πελάγους. Συλλέγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα νησιά και χαρακτηρίζεται ως νησιωτική ρίγανη.

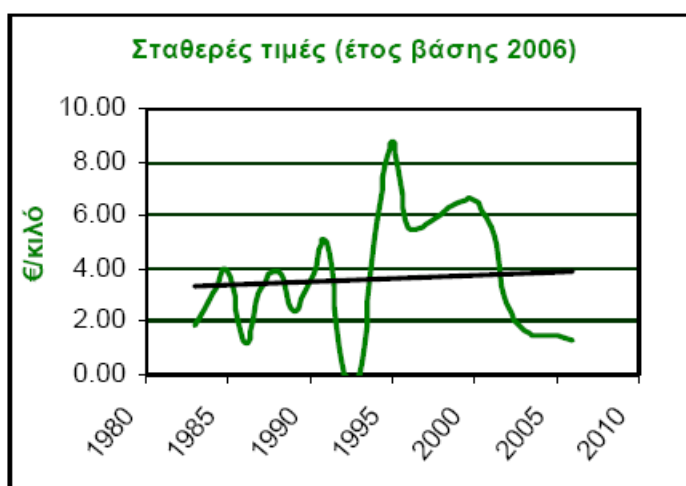
- *Origanum dubium* (κοινώς ρίγανη)
Χαρακτηρίζεται από χαμηλό βλαστό και αυτοφύεται σε ορεινές περιοχές της Νάξου.
- *Origanum majorana* (κοινώς ματζουράνα)
Χαρακτηρίζεται από πολύκλαδο, σκληρό, λεπτό, κοκκινωπό και τριχωτό με ύψος που μπορεί να φτάσει μέχρι και 40 cm.
- *Origanum dictamnus* (κοινώς δίκταμος)
Αυτοφύεται και καλλιεργείται μόνο στην Κρήτη.

Όλα τα προαναφερθέντα αυτοφυή είδη της ρίγανης αναπτύσσονται σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες και κυρίως χαρακτηρίζονται από αντοχή στο ψύχος. Επιπλέον, παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Για αυτούς τους λόγους η ρίγανη αυτοφύεται σε όλη την Ελλάδα, ηπειρωτική, νησιωτική και από τις παραθαλάσσιες μέχρι και τις ορεινές περιοχές. Ωστόσο, για την καλλιέργεια της ρίγανης θα πρέπει να προτιμώνται περιοχές ημιορεινές, ασβεστολιθικές και με δροσερά καλοκαίρια (Dordas, 2009). Σημειώνεται ότι τα φύλλα της ρίγανης περιέχουν πολύ υψηλά ποσά ασβεστίου τα οποία ανέρχονται μέχρι και 63 mg/g ξηράς ουσίας ενώ στα περισσότερα είδη του φυτικού βασιλείου η συγκέντρωση του ασβεστίου κυμαίνεται από 10-30 mg/g ξηράς ουσίας (Dordas, 2009).

Ο πολλαπλασιασμός της ρίγανης μπορεί να γίνει εγγενώς (με σπόρο) και αγενώς (μοσχεύματα ή παραφυάδες) (Σκουμπής, 1985). Όταν χρησιμοποιείται σπόρος, απαιτούνται 10-15 g/m². Τα μοσχεύματα είναι τμήματα βλαστών μήκους 8-10 cm που λαμβάνονται καθ' όλη την βλαστική περίοδο και κυρίως Απρίλιο-Μάιο. Οι παραφυάδες λαμβάνονται κατόπιν ξεριζώματος ενός μέρους του φυτού της ρίγανης το φθινόπωρο ή την άνοιξη ενώ ακολουθεί φύτευσή τους στο χωράφι. Ο πολλαπλασιασμός με παραφυάδες οφείλεται στο γεγονός ότι η ρίγανη χαρακτηρίζεται από πολλούς βλαστούς και πλούσιο ριζικό σύστημα. Όσον αφορά την εποχή φύτευσης αναφέρεται ότι

συνιστάται να γίνεται φθινόπωρο (Οκτώβριο-Νοέμβριο) ή άνοιξη (Φεβρουάριο-Μάρτιο). Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού είναι 18-22 °C με όριο ανάπτυξης 4-33 °C ενώ φυτά ηλικίας τουλάχιστον ενός έτους, αντέχουν σε θερμοκρασίες -25 έως και 42 °C. Η φύτευση είναι απλή και γίνεται σε γραμμές. Η διάρκεια της καλλιέργειας της ρίγανης διαρκεί περίπου 8-10 χρόνια. Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι θα πρέπει να αποφεύγεται το πότισμα της καλλιέργειας της ρίγανης διότι σε ξηρικές συνθήκες η ποιότητα του αιθέριου ελαίου είναι καλύτερη. Όταν γίνεται άρδευση, αυξάνεται η παραγωγή ποσοτικά διότι τα φυτά αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος αλλά υποβαθμίζεται η ποιότητα του αιθέριου ελαίου. Το ίδιο συμβαίνει όταν εφαρμόζεται αζωτούχος λίπανση σε μεγάλες ποσότητες. Η συλλογή της ρίγανης γίνεται στο μέσο της άνθησης (άνθηση του 50 % των οφθαλμών) δηλαδή μέσα στον Ιούλιο (Σκουμπρης, 1985).

Η μέση απόδοση της ξηρικής ρίγανης είναι 97 kg/στρ. με μέγιστη τα 180 kg/στρ. και ελάχιστη τα 50 kg/στρ (Τζουραμάνη και συν., 2012). Η τιμή της ρίγανης φαίνεται να σταθεροποιείται τα τελευταία χρόνια παρόλο που παρουσιάστηκε μείωση στην τιμή στα τέλη της προηγούμενης δεκαετίας (διάγραμμα 2.1). Σημειώνεται ότι το 2006 η τιμή της ρίγανης διαμορφώθηκε στα 1,4 €/kg ενώ η μέση ακαθάριστη πρόσοδος εκτιμήθηκε στα 158 €/στρ. (ελάχιστη: 49 €/στρ., μέγιστη: 316 €/στρ.). Το μέσο κέρδος εκτιμάται σε 60 €/στρ.



Διάγραμμα 2.1. Σταθερές τιμές ρίγανης 1983-2006 (Τζουραμάνη και συν., 2012).

Η καλλιέργεια της ρίγανης στην Ελλάδα χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα πλεονεκτήματα (Τζουραμάνη και συν., 2012). :

- Καλλιέργεια με συγκριτικό πλεονέκτημα λόγω ευνοϊκών εδαφοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν στην Ελλάδα
- Αύξηση της ζήτησης για προϊόντα που προέρχονται από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά λόγω των ιδιοτήτων τους
- Δυνατότητα πολλών εφαρμογών στη βιομηχανία παρασκευής ροφημάτων, στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών (για αρωματισμό και συντήρηση), στη ζαχαροπλαστική, στη μαγειρική, στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών και την αρωματοποιία.
- Μικρές απαιτήσεις σε καλλιεργητικές φροντίδες. Το φυτό μπορεί να καλλιεργηθεί ακόμα και σε υποβαθμισμένα εδάφη
- Ανάπτυξη ευκαιριών απασχόλησης σε επίπεδο οικογενειακής εκμετάλλευσης ή μικρών εταιρικών σχημάτων πρώτης μεταποίησης, τυποποίησης και εκχύλισης-απόσταξης αιθέριων ελαίων
- Δυνατότητα αξιοποίησης του εξοπλισμού του καπνού (φυτώριο)
- Προώθηση της καλλιέργειας από το Υπουργείο και την Ε.Ε. με δυνατότητες χρηματοδότησης.

Τα μειονεκτήματα της καλλιέργειας της ρίγανης είναι τα ακόλουθα (Τζουραμάνη και συν., 2012):

- Έλλειψη εγχώριων πιστοποιημένων σπόρων και πολλαπλασιαστικού υλικού
- Δυσκολία στην εξασφάλιση διάθεσης της παραγωγής λόγω της ελλιπούς σύνδεσης πρωτογενούς παραγωγής και βιομηχανιών τυποποίησης/συσκευασίας ή παραγωγής αιθέριων ελαίων
- Προβλήματα στην καταπολέμηση των ζιζανίων, ιδιαίτερα μετά τη θέσπιση περιορισμών στη χρήση αγροχημικών και την κατάργηση ορισμένων δραστικών ουσιών
- Μη επαρκής προώθηση της καλλιέργειας μέσω καινοτόμων συσκευασιών ή/και αξιοποίησής τους από τις βιομηχανίες/ βιοτεχνίες παραγωγής αιθέριων ελαίων
- Έλλειψη πληροφόρησης και ενημέρωσης των αγροτών για τις απαραίτητες πρακτικές και τις δυνατότητες εμπορίας της ρίγανης με αποτέλεσμα οι

περισσότερες προσπάθειες να αποτυγχάνουν λόγω έλλειψης κατάλληλης επενδυτικής στρατηγικής.

3.3. Συστατικά και ιδιότητες αιθέριου ελαίου της ρίγανης

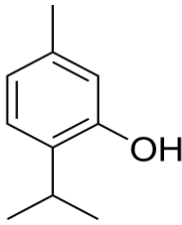
3.3.1. Τα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης μπορεί να περιέχει περισσότερα από 30 συστατικά. Από ποσοτικής άποψης κυριαρχούν η καρβακρόλη και η θυμόλη (φαινολικές ενώσεις), των άθροισμα των οποίων αποτελεί τουλάχιστον το 78 % του αιθερίου ελαίου (Adam et al., 1998). Άλλα συστατικά είναι το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο (τερπένια) τα οποία είναι οι πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση της καρβακρόλης και της θυμόλης (Ultee et al., 2002). Στην κατηγορία των τερπενίων υπάγονται και το α-πινένιο, το β-πινένιο, το θουγένιο, το α-τερπινένιο, το β-καρνοφυλλένιο, το β-μπισαμπολένιο, το φυλλανδρένιο και το σαμπινένιο. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει αιθέρια έλαια με αλκοολικές ομάδες όπως την κινεόλη, την λιναλοόλη, την βορνεόλη και την τερπινόλη (Daferera et al., 2000). Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό προφίλ ρίγανης της νοτίου Ελλάδας (νήσος Ικαρίας) σε ταξιανθίες και φύλλα ενώ στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η χημική δομή των κυριότερων συστατικών (θυμόλη, καρβακρόλη, π-κυμένιο, γ-τερπινένιο) του αιθέριου ελαίου.

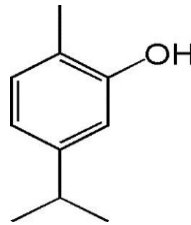
Πίνακας 3.1. Προφίλ αιθέριων ελαίων (%) ρίγανης: *Origanum vulgare ssp.hirtum* (φύλλα και ταξιανθίες).

Χημική ουσία	(%)
α-θουγένιο	0.21
α-πινένιο	0.26
β-πινένιο	0.05
β-μυρσένιο	0.55
α-φελλανδρένιο	ίχνη
δ-καρένιο	0.45
π-κυμένιο	2.25
γ-τερπινένιο	3.09
Cis-σαμπινένιο	
ένυδρο	0.14
Λιναλοόλη	ίχνη
Βορνεόλη	0.16
Τερπινεν-4-όλη	0.21
Καρβακρόλη	90.29
Καρνοφυλλένιο	1.81
α- καρνοφυλλένιο	0.13
β-μπισαμπολένιο	0.14

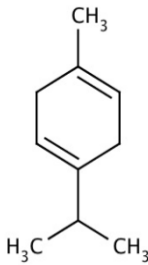
Πηγή: Economou et al. (2011)



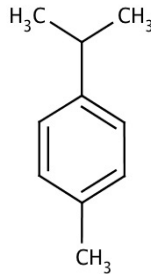
Θυμόλη



Καρβακρόλη



γ-τερπινένιο



π-κυμένιο

Εικόνα 3.1. Η χημική δομή των κυριότερων συστατικών του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα αυτό, η θυμόλη και η καρβακρόλη είναι δύο ισομερείς ενώσεις οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση της υδροξυλικής ομάδας. Τα οξυγονωμένα αιθέρια έλαια (παρουσία υδροξυλικής ομάδας στην καρβακρόλη και τη θυμόλη) τα οποία διαθέτουν φαινολικό δακτύλιο χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Dorman and Deans, 2000; Oh et al., 1967). Τα τερπένια όπως πχ. το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο χαρακτηρίζονται από πολύ ασθενή αντιμικροβιακή δράση (Dorman and Deans, 2000; Brenes and Roura, 2010) ενώ σε μερικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και ενίσχυση της μικροβιακής δραστηριότητας (Wallace, 2004).

3.3.2. Αντιμικροβιακή δράση

Η καρβακρόλη και η θυμόλη παρουσιάζουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση (κυρίως βακτηριοκτόνο) ιδιαίτερα κατά Gram+ βακτηρίων αν και υπάρχουν ερευνητικές εργασίες στις οποίες έχει παρατηρηθεί αντιβακτηριακή δράση κατά Gram- βακτηρίων (Marino et al., 2001). Ορισμένα παραδείγματα Gram+ βακτηρίων των οποίων η ανάπτυξη παρεμποδίζεται από το ριγανέλαιο είναι τα εξής (*In vitro*): *Micrococcus spp.*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Listeria innocua* (Marino et al., 2001) και *Bacillus subtilis* (Fan and Chen, 2001). Όσον αφορά τα Gram- βακτήρια (*In vitro*): *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* (Marino et al., 2001), *S. sonnei* (Fan and Chen, 2001) και *S. typhimurium* (Juven et al., 1994). Σημειώνεται ότι εκ των συστατικών της ρίγανης η καρβακρόλη και η θυμόλη χαρακτηρίζονται από ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση (Sivropoulou et al., 1996). Αντιβακτηριακή δράση έχει παρατηρηθεί και σε *in vivo* μελέτες. Η καρβακρόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου *Bacillus cereus* ενώ η θυμόλη έναντι των *Seimonas ruminantium* και *Streptococcus bovis* τα οποία υπάρχουν στη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών (Evans and Martins, 2000).

3.3.3. Αντιμυκητιακή δράση

Τα δύο κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (καρβακρόλη και θυμόλη), χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ενώ η καρβακρόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση σε σύγκριση με την θυμόλη (Daferera, 2000). Ορισμένα παραδείγματα μυκήτων των οποίων η ανάπτυξη παρεμποδίζεται από το ριγανέλαιο είναι τα εξής: *Penicillium digitatum*, *Trichosporon beigeli*, *Trichophyton rubrum*, *Malassezia furfur*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Aspergillus parasiticus* (Daferera et al., 2000; Ozcan, 1998).

3.3.4. Αντιπρωτοζωϊκή δράση

Στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων τα πρωτόζωα αποτελούν το 40-50 % της μικροβιακής μάζας εντός της μεγάλης κοιλίας ενώ η ικανότητά τους να αφομοιώνουν και να μετατρέπουν τις πρωτεΐνες τροφικής και μικροβιακής προέλευσης επηρεάζει σημαντικά το ισοζύγιο του αζώτου στο μηρυκαστικό ζώο (Hristov and Jouany, 2005). Η μείωση του αριθμού των πρωτόζωων συχνά οδηγεί και σε μείωση της παραγωγής μεθανίου γιατί υπάρχει συμβιωτική σχέση μεταξύ πρωτόζωων και μεθανοβακτηρίων. Υπολογίζεται ότι το 25 % των μεθανοβακτηρίων βρίσκονται σε συμβίωση με πρωτόζωα εντός της μεγάλης κοιλίας (Newbold et al., 1995). Έτσι, μείωση των πληθυσμών των πρωτόζωων (αλλά όχι εξάλειψη) μπορεί να βελτιώσει τις αποδόσεις των μηρυκαστικών ζώων. Θεωρείται ότι η παρουσία πρωτοζώων προκαλεί μείωση των πληθυσμών των βακτηρίων αλλά από την άλλη μεριά προσφέρουν πλεονεκτήματα στο μηρυκαστικό ζώο, όπως είναι η αύξηση της βιοσύνθεσης λυσίνης εντός της μεγάλης κοιλίας (Onodera, 1986).

Στην περίπτωση των μονογαστρικών ζώων, για την καταπολέμηση των κοκκιδίων (*Eimeria ssp.*) που προσβάλλουν τα πτηνά, προτείνεται ο συνδυασμός εμβολιασμού και χορήγησης αιθέριων ελαίων ρίγανης ως ένας εναλλακτικός τρόπος καταπολέμησης της ασθένειας σε βιολογικές εκτροφές (Waldstedt, 2003). Οι Giannenas et al. (2003) παρατήρησαν βελτίωση των αποδόσεων σε παχυνόμενα ορνίθια κατόπιν προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στο σιτηρέσιο τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί με κοκκίδια (*Eimeria tenella*). Επιπλέον, παρατήρησαν σημαντική μείωση στην παρουσία αίματος στα κόπρανα των πτηνών.

3.3.5. Αντιοξειδωτική δράση

Η ρίγανη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με του δενδρολίβανου (Milos and Makota, 2012), η οποία οφείλεται στο αιθέριο έλαιο καθώς επίσης και σε άλλα συστατικά όπως το καφεϊκό οξύ, το προκατεχοϊκό οξύ κ.α. (Kikuzaki et al., 1989) και το ροσμαρινικό οξύ (Exarchou et al., 2002). Σημειώνεται ότι εκ των αιθέριων ελαίων η θυμόλη παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την καρβακρόλη (Yanishlieva et al., 1999), ενώ μεταξύ θυμόλης και καρβακρόλης υπάρχει πιθανώς συνέργεια κάτι που ενδεχομένως ισχύει γενικότερα για τα οξυγονωμένα συστατικά της ρίγανης (Milos and Makota, 2012). Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης της καρβακρόλης και της θυμόλης η υδροξυλική ομάδα των

ενώσεων αυτών δρα ως δότης υδρογόνου στις υπεροξειδικές ρίζες οι οποίες παράγονται κατά το πρώτο στάδιο των οξειδώσεων (Brenes and Roura, 2010).

Οι Tsimidou et al. (1995) ανέφεραν ότι 1 % ρίγανης ισοδυναμεί με 200 ppm BHA (βουτυλοϋδροξυανισόλη) κατόπιν προσθήκης μέσα σε εδάδιμο έλαιο. Η βουτυλοϋδροξυανισόλη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό αντιοξειδωτικό το οποίο προστίθεται στα τρόφιμα.

3.3.6. Υποχοληστερολαιμική και ηπατοπροστατευτική δράση

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη μειώνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα σε παχυνόμενα ορνίθια ενώ ταυτόχρονα ασκούν ηπατοπροστατευτική δράση (Akkol et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, αμφότερες αναστέλλουν την δράση της 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλCoA-ρεδουκτάσης, η οποία είναι ένα ένζυμο το οποίο σχετίζεται με τη σύνθεση της χοληστερόλης στο ήπαρ. Με αυτό τον τρόπο διεγείρονται οι υποδοχείς των LDL με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή τους από το αίμα και κατ'επέκταση μειώνεται και η συγκέντρωση της χοληστερόλης. Επιπλέον, η θυμόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στην οξείδωση των LDL και επομένως μπορεί να επιβραδύνει την αθηρομάτωση (Naderi et al., 2004). Άλλα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με παρόμοια δράση είναι η καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο (Edris, 2007). Ακόμη, σημειώνεται ότι η κατανάλωση ρίγανης μειώνει τη συστολική πίεση του αίματος (Edris, 2007). Έτσι, κατανάλωση αιθέριου ελαίου ρίγανης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ηπατοστεατίτιδας και καρδιαγγειακών προβλημάτων και ιδιαίτερα όταν καταναλώνονται σιτηρέσια με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη.

3.4. Χρήση ρίγανης στην διατροφή των παραγωγικών ζώων

Λόγω των πολυάριθμων ιδιοτήτων του αιθέριου ελαίου της ρίγανης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διατροφή των παραγωγικών ζώων. Στους πίνακες 6-10 έχουν ήδη παρουσιαστεί οι επιδράσεις της διαιτητικής προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στις αποδόσεις των μονογαστρικών και μηρυκαστικών ζώων.

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός από την ενδεχόμενη βελτίωση των αποδόσεων υπάρχουν και πολλές άλλες εφαρμογές. Για παράδειγμα, η διαιτητική προσθήκη ρίγανης μπορεί να μειώσει τα περιστατικά διαρροιών σε μηρυκαστικά ζώα (Bampidis et al., 2006; Soltan, 2009) και την εκπομπή δυσάρεστων οσμών από τα κτηνοτροφικά απόβλητα μέσω μείωσης του μικροβιακού φορτίου (Varel et al., 2004).

Ενσωμάτωση ξηράς δρόγης ρίγανης σε σιτηρέσια συών, βελτιώνει τις αναπαραγωγικές αποδόσεις αφού παρατηρείται αύξηση της γονιμότητας, αύξηση του μεγέθους της τοκετομάδας καθώς επίσης και μείωση του αριθμού των χοιριδίων που γεννιούνται νεκρά (Allan and Bilkei, 2005). Ωστόσο, οι μηχανισμοί της επίδρασης των αιθέριων ελαίων της ρίγανης στο αναπαραγωγικό σύστημα δεν είναι επαρκώς μελετημένοι.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4. Πείραμα εκτίμησης της απώλειας αιθέριου ελαίου κατά την αποθήκευση των φυτών και την ανάμειξη αυτών στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών

4.1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλού κόστους καθαρές εμπορικές ενώσεις διαφόρων αρωματικών φυτών στη διατροφή των μηρυκαστικών (Patra, 2011; Christaki et al., 2012). Εάν ληφθεί υπόψη ότι το κόστος είναι μία σημαντική παράμετρος σε επίπεδο κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, η χρήση ολόκληρων αποξηραμένων αρωματικών φυτών (ξηρές δρόγες) στα σιτηρέσια μηρυκαστικών ζώων αποτελεί μια καλή εναλλακτική στρατηγική όχι μόνο διότι ελαχιστοποιείται το κόστος, αλλά αξιοποιούνται τα πλεονεκτήματα της συνεργικής δράσης πολλών συστατικών που υπάρχουν στο φυτό. Υπό αυτή την έννοια, ένας κτηνοτρόφος μπορεί να προσθέσει

το αποξηραμένο φυτό στην τροφή ως έχει και όχι ως το αιθέριο έλαιο που έχει απομονωθεί από το φυτό με κάποια τεχνική και κυκλοφορεί στην αγορά σε υψηλή τιμή.

Οι ερευνητές δίνουν κυρίως έμφαση στην πιθανή επίδραση απαραίτητη προσθήκη ελαίου στη διατροφή των ζώων για την ποσότητα και την ποιότητα των ζωικών προϊόντων, αλλά από την άλλη μεριά, ελάχιστη ή καμία προσοχή έχει δοθεί στο αν το αιθέριο έλαιο παραμένει στην αποθηκευμένη ξηρά δρόγη ή στην ζωοτροφή και για ποια χρονική διάρκεια.

Οι μέχρι τώρα ερευνητικές εργασίες έχουν δώσει έμφαση στην πιθανή επίδραση των αιθέριων ελαίων στην ποσότητα και στην ποιότητα των παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων, αλλά ελάχιστη προσοχή στο αν τα αιθέρια έλαια παραμένουν στην αποθηκευμένη ξηρά δρόγη ή στην τροφή όταν αλέθονται και αναμιγνύονται στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, σε ποιο ποσοστό και χρονικό διάστημα.

Αυτό είναι ένα σημαντικό θέμα επειδή τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται ως πτητικές ενώσεις (Maffei, 2010).

Οι Estell et al. (1998), σε σχετική μελέτη ψέκασαν 6 αιθέρια έλαια (α -πινένιο, λεμονένιο, καμφορά, βορνεόλη, *cis*-jasmone και β -καρυοφυλλένιο) σε μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών και ακολούθως εκτίμησαν τις απώλειες αυτών, 2-30 λεπτά μετά τον ψεκάσμό, αλλά όχι κατά τη διάρκεια παρατεταμένων χρονικών περιόδων αποθήκευσης. Η μέγιστη απώλεια εκτιμήθηκε σε 50,5 % για το α -πινένιο 20 λεπτά μετά από τον ψεκάσμό.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στόχος του παρόντος πειράματος ήταν να εκτιμηθεί εάν όντως υπάρχει σημαντική απώλεια του αιθέριου ελαίου της ρίγανης από την αποθηκευμένη ξηρά δρόγη μακροπρόθεσμα (για χρονική περίοδο έξι μηνών) καθώς επίσης και από το μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών μετά την άλεση και ανάμειξη (για χρονική περίοδο ενός μηνός). Η άλεση της ξηράς δρόγης (συμπεριλαμβανομένων μίσχων, φύλλων και ταξιανθιών) επιλέχθηκε για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους και καλύτερη ομογενοποίηση του φυτικού υλικού στο μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η ελληνική ρίγανη (*Origanum vulgare ssp . hirtum*), όχι μόνο επειδή αυτό το φυτό αποτελεί ένα κοινό στοιχείο των οικοσυστημάτων μεσογειακού τύπου (Vokou et al., 1993), αλλά και γιατί το αιθέριο έλαιό της είναι πλούσιο σε καρβακρόλη και/ή θυμόλη οι οποίες είναι φυσικές ενώσεις με πολλές βιολογικές ιδιότητες, κυρίως αντιμικροβιακές (Dorman et

al., 2000, Friedman et al., 2002), αντιμυκητιακές (Azzouz και Bullerman, 1982, Adam et al., 1998) και αντιοξειδωτικές (Cervato et al., 2000, Papageorgiou et al., 2003). Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είναι αποτελεσματικό τόσο σε gram-αρνητικά όσο και σε gram-θετικά βακτήρια (Tajkarimi et al., 2010).

Τέλος, σημειώνεται ότι η ελληνική ρίγανη χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 1.1-8.2 % V/W (Kokkini et al., 1996). Φυτά συγκομιζόμενα από τη νότια Ελλάδα (νησιά Αιγαίου) χαρακτηρίζονται από υψηλότερες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο (Kokkini et al., 1996), μέχρι και 10 % V/W (Economou et al., 2011).

4.2. Υλικά και μεθόδοι

4.2.1. Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό της ρίγανης συλλέχθηκε από τη νήσο της Ικαρίας (συμπεριλαμβανομένων μίσχων, φύλλων και ταξιανθιών) τον Ιούλιο του 2009 κατά το μέσο της άνθησης. Ακολούθησε φυσική ξήρανση υπό σκιά για ένα μήνα με μέση θερμοκρασία περιβάλλοντος 30 °C. Μετά από τη διαδικασία ξήρανσης, το φυτικό υλικό χωρίστηκε σε δύο μέρη για τους σκοπούς του πειράματος.

4.2.2 Προσδιορισμός απώλειας αιθέριου ελαίου κατά την ξήρανση και αποθήκευση

Το ένα μέρος του φυτικού υλικού της ρίγανης που συγκομίστηκε και αποθηκεύτηκε υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου για 6 μήνες. Στην αρχή και στη συνέχεια ανα τρίμηνο ελήφθησαν έξι επιμέρους δείγματα κάθε φορά από το συγκεκριμένο φυτικό υλικό προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της περιόδου αποθήκευσης στην περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο καθώς επίσης και στο προφίλ του αιθέριου ελαίου.

4.2.3. Προσδιορισμός απώλειας αιθέριου ελαίου κατά την άλεση και ανάμειξη αυτού σε μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών

Το άλλο μέρος του φυτικού υλικού αλέστηκε και στη συνέχεια αναμίχθηκε επιμελώς σε μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 4.1) σε μία αναλογία 85 g ξηράς δρόγης με 95 g μείγματος ΣΖ (47,2 % w/w) προκειμένου να ληφθεί μία επαρκής ποσότητα αιθέριου ελαίου κατά την απόσταξη για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του μείγματος ΣΖ σε αιθέριο έλαιο. Εν συνεχεία, το μείγμα φυτικού υλικού/ΣΖ αποθηκεύθηκε για 1 μήνα υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε 5 ημέρες λαμβάνονταν έξι επιμέρους δείγματα από αυτό το μείγμα για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας του σε αιθέριο έλαιο και την εκτίμηση της χημικής του σύνθεσης. Η δοκιμή της αξιολόγησης του περιεχομένου αιθέριου ελαίου στο μείγμα ΣΖ κατά την αποθήκευση του για ένα μήνα διεξήχθη, επίσης, σε αναλογία 3,1 g φυτικού υλικού και 96,9 g μείγματος ΣΖ (3,1 % w/w), δηλαδή σε αναλογία στην οποία προσεγγίζει την πραγματική αναλογία η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διατροφή των αιγών. Ωστόσο, σε αυτήν την περίπτωση, η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που περιέχεται στα 100 g μείγματος ξηράς δρόγης/ΣΖ ήταν πολύ χαμηλή για άμεση μέτρηση (0,1 ml). Έτσι, η αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε αιθέριο έλαιο για διάρκεια αποθήκευσης ενός μήνα πραγματοποιήθηκε με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό της καρβακρόλης, η οποία είναι και το κυρίαρχο συστατικό του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.

Πίνακας 4.1. Χημική σύσταση μείγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών

	% (w/w)
Υγρασία	12,00
Ολικές αζωτούχες ουσίες	17,20
Ολικές λιπαρές ουσίες	3,50
Ολικές ινώδεις ουσίες	4,80
Τέφρα	6,50
ΕΝΕΟ	56,00
Ασβέστιο	1,20

Φωσφόρος	0,90
NaCl	0,50
<u>Συστατικά</u>	
Καρπός αραβοσίτου	54,50
Σογιάλευρο	22,00
Πίτυρα σίτου	20,00
CaCO ₃	2,00
Φωσφορικό διασβέστιο	0,50
NaCl	0,50

4.3. Μετρήσεις

4.3.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης της ρίγανης σε αιθέριο έλαιο ένα αλεσμένο δείγμα 50 g υποβλήθηκε σε υδρο-απόσταξη σε τροποποιημένη συσκευή Clevenger για 3 ώρες (εικόνα 4.1). Τα εξαχθέντα αιθέρια έλαια αφυδατώθηκαν με άνυδρο θεικό μαγνήσιο και αποθηκεύθηκαν στους -18 °C μέχρι την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), προκειμένου να προσδιοριστεί το προφίλ του αιθέριου ελαίου. Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 6 φορές (n=6). Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε και στην ποσοτικοποίηση του αιθέριου ελαίου στη ζωοτροφή (αναλογία 47,2% w/w).



Εικόνα 4.1. Η συσκευή Clevenger (modified) που χρησιμοποιήθηκε στις υδρο-αποστάξεις.

4.3.2. Ποσοτικοποίηση του αιθέριου ελαίου στη ζωοτροφή (3,1 % ξηρά δρόγη w/w)

Η ποσοτικοποίηση του αιθέριου ελαίου στη ζωοτροφή κατά την αποθήκευση, προσδιορίστηκε με μία τροποποιημένη τεχνική υδρο-απόσταξης χρησιμοποιώντας συσκευή Clevenger. Η μεθοδολογία περιγράφεται λεπτομερώς διότι δεν υπάρχει στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Μία ποσότητα 100 g μείγματος ξηράς δρόγης/ μείγματος ΣΖ μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη και 2500 ml απιονισμένου ύδατος προστέθηκαν βαθμιαία. Ως εκ τούτου η αναλογία ζωοτροφή/νερό ήταν 1/25. Σε ένα προηγούμενο προκαταρκτικό πείραμα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) παρατηρήθηκε ότι όταν η αναλογία ζωοτροφή/νερό ήταν υψηλότερη από 1/25, ένα μέρος της ζωοτροφής παρέμεινε στον πυθμένα της φιάλης κατά τη διάρκεια της υδροαπόσταξης και έτσι μέρος του αιθέριου ελαίου στη ζωοτροφή ήταν αδύνατο να αποσταχθεί. Πριν την έναρξη της απόσταξης το νερό και η ζωοτροφή αναδεύονταν προσεκτικά. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 12, η συμπυκνωμένη ζωοτροφή είναι πλούσια σε μη δομικούς υδατάνθρακες (ENEO) και πρωτεΐνες, καθιστώντας την υδρο-απόσταξη πιο

δύσκολη να επιτευχθεί λόγω έντονου αφρισμού. Έτσι, προκειμένου να γίνει κανονικά η υδρο-απόσταξη προστέθηκε ηλιέλαιο μέσα στην σφαιρική φιάλη, ως αντι-αφριστικός παράγοντας.

Στο τέλος της απόσταξης, δηλαδή μετά από 3 ώρες, το αιθέριο έλαιο εκχυλίστηκε από την υδατική φάση με διαιθυλαιθέρα σε μία χοάνη διαχωρισμού. Η οργανική φάση συμπυκνώθηκε με χαμηλή ροή αέριου αζώτου και η υγρασία αφαιρέθηκε με άνυδρο θειικό μαγνήσιο. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -18°C μέχρι την ανάλυσή τους με GC-MS. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η απόδοση της απόσταξης σε σχέση με την απουσία ή την παρουσία αντιαφριστικού παράγοντα. Στην περίπτωση αυτή οι μετρήσεις διεξήχθησαν με τη χρήση μόνο ρίγανης σε τέτοια ποσότητα που αντιστοιχούσε σε 100 g τροφής. Οι αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο προσδιορίστηκαν και στις δύο περιπτώσεις και ένας συντελεστής διόρθωσης (Correction Factor) υπολογίστηκε με βάση την απώλεια που παρατηρήθηκε όταν η απόσταξη διεξήχθη παρουσία αντιαφριστικού παράγοντα (antifoaming agent). Υπολογίστηκε δηλαδή ο λόγος: $\text{Correction Factor} = \frac{\text{Area (απουσία antifoaming agent)}}{\text{Area (παρουσία antifoaming agent)}}$, ο οποίος βρέθηκε ότι είχε την τιμή 7,21. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το ηλιέλαιο παρεμποδίζει την απόσταξη του αιθέριου ελαίου.

4.3.3. Προφίλ του αιθέριου ελαίου στη ξηρά δρόγη και στη ζωοτροφή

Το αιθέριο έλαιο αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ένα χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 GC II σε συνδυασμό με ένα φασματογράφο μάζας Hewlett Packard 5972 MSD σε λειτουργία EI στα 70 eV. Χρησιμοποιήθηκε η μη-πολική Rtx-5MS τριχοειδής στήλη (30 m X 0,25 mm, πάχος 0,25 μm) σε μια προγραμματισμένη θερμοκρασία σταδιακής αύξησης από 60°C έως 250°C με ρυθμό $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα δείγματος και της γραμμής μεταφοράς του MS ορίστηκαν σε 220°C και 290°C , αντίστοιχα. Ένα μl δείγματος εγχύθηκε στο splitless mode. Η πίεση του Ήλιου (φέρον αέριο) ορίστηκε σε 2,5 psi. Η ταυτοποίηση των χημικών ενώσεων έγινε με βάση τη σύγκριση του σχετικού χρόνου κατακράτησης και του φάσματος μαζών με αυτά της βιβλιοθήκης δεδομένων NIST 98, 275 Wiley του GC / MS σύστημα και βάσης δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2007).

4.3.4. Ποσοτικοποίηση καρβακρόλης

Το αιθέριο έλαιο που απομονώθηκε από το μείγμα ξηράς δρόγης/ ζωοτροφής (3,1% w/w) αναλύθηκε σε ένα χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 II GC χρησιμοποιώντας ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) υπό τις ίδιες αναλυτικές συνθήκες με το GC-MS όπως προαναφέρθηκαν. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ορίστηκε στους 300 °C. Πρότυπα διαλύματα καρβακρόλης σε διαιθυλαιθέρα παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 0.1-0,6%, v/v. Τα αποκτηθέντα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία καμπύλης ($Y=aX+b$) για την ποσοτικοποίηση της καρβακρόλης η οποία βασίστηκε στο εμβαδόν της κορυφής της καρβακρόλης που αποκτήθηκε ηλεκτρονικά από το GC.

4.3.5 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Στα δεδομένα των παραπάνω δοκιμών εφαρμόστηκε επαναλαμβανόμενη ανάλυση διακύμανσης (Repeated measures-ANOVA) θεωρώντας τα δεδομένα ανά περίοδο αποθήκευσης, ως επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (0, 3 και 6 μήνες) και (0, 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες) αντιστοίχως. Πολλαπλές συγκρίσεις έγιναν χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Tukey. Όταν δεν εκπληρώνονταν οι υποθέσεις ομαλότητας και σφαιρικότητας για την εφαρμογή της RM-ANOVA τότε εφαρμόστηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Friedman ακολουθούμενη από τη δοκιμασία πολλαπλού εύρους Dunns προκειμένου να εντοπιστούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η κανονικότητα της κατανομής των δεδομένων ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Για όλες τις προαναφερθείσες δοκιμές, όταν η τιμή P_n ήταν μικρότερη από 0.05 τότε θεωρήθηκε ότι η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική. Επιπλέον, η ανάλυση PCA (Principal component analysis) χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεντρωτικά δεδομένα (pooled data) ώστε να μειωθεί η διάσταση των δεδομένων και να υποδείξει εκείνες τις χημικές ενώσεις που μπορούσαν να διακρίνουν τα δείγματα ανάλογα με το χρόνο της αποθήκευσης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στατιστικών πακέτων (GraphPad Prism version 4, USA and Statgraphics Plus version 5.2, Manugistics Inc., USA). Όλες οι τιμές που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες δίνονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα.

4.4. Αποτελέσματα και σχολιασμός

4.4.1 Περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο και προφίλ αυτού

Η περιεκτικότητα των αποξηραμένων τμημάτων των φυτών της ρίγανης σε αιθέριο έλαιο ήταν 5,0% (v/w). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μεταβολή (πίνακας 4.2) στην απόδοση της ξηράς δρόγης της ρίγανης σε αιθέριο έλαιο μακροπρόθεσμα (6 μήνες αποθήκευση) υπό σκιά παρόλο που η θερμοκρασία ήταν υψηλή (καλοκαιρινοί μήνες). Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι η συγκομιδή της ρίγανης μπορεί να γίνει μία φορά ετησίως αφού η αποθήκευση της ξηράς δρόγης δεν απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες και μάλιστα με ελάχιστο κόστος δίχως να μειώνεται η ποσότητα του αιθέριου ελαίου για τουλάχιστον 6 μήνες. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και για άλλα είδη φυτών. Οι Rosado et al. (2013) βρήκαν ότι η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο αποθηκευμένων φύλλων βασιλικού (*Ocimum basilicum*) μειώθηκε μόνο κατά 0,1 % ανά μήνα, για μια περίοδο αποθήκευσης 12 μηνών. Επιπλέον, οι Verma et al. (2011) υπολόγισαν την απώλεια σε αιθέριο έλαιο από αποθηκευμένα φύλλα δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*) και βρήκαν ότι ήταν λιγότερο από 20% μετά από ένα χρόνο αποθήκευσης υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 4.2. Απώλεια αιθέριου ελαίου και μεταβολή του προφίλ αυτού κατά την αποθήκευση της ξηράς δρόγης για 6 μήνες.

	Μήνες αποθήκευσης		
	0	3	6
<i>α</i> -θουγένιο	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,272±0,013 ^b
<i>α</i> -πινένιο	0,123±0,011 ^a	0,000±0,000 ^a	0,603±0,008 ^b
<i>β</i> -πινένιο	0,100±0,000 ^a	0,100±0,000 ^a	0,100±0,000 ^a
1-οκτεν-3-όλη	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,208±0,008 ^b
<i>α</i> -τερπινένιο	0,285±0,013 ^a	0,000±0,000 ^a	1,050±0,056 ^b
<i>π</i> -κυμένιο	2,033±0,049 ^a	1,520±0,077 ^a	6,395±0,151 ^b
<i>γ</i> -τερπινένιο	0,947±0,044 ^b	0,492±0,032 ^a	4,013±0,049 ^c
Cis-σαμπινένιο ένυδρο	0,103±0,006 ^a	0,000±0,000 ^a	0,302±0,009 ^b
Βορνεόλη	0,983±0,031 ^a	0,917±0,060 ^a	0,100±0,003 ^b
Τερπινεν-4-όλη	0,730±0,033 ^a	0,200±0,006 ^b	0,302±0,007 ^b
Θυμόλη	0,198±0,003 ^a	0,633±0,031 ^b	0,205±0,006 ^a
Καρβαρκόλη	91,213±0,464 ^a	93,283±0,151 ^a	81,283±0,162 ^b

<i>β</i> -καρυοφυλλένιο	0,937±0,042 ^a	1,183±0,060 ^b	2,033±0,061 ^c
Οξείδιο του καρυοφυλλένιου	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,217±0,010 ^b
<i>α</i> -φαρνεσένιο	0,392±0,005 ^a	0,537±0,033 ^a	0,203±0,004 ^b
Μονοτερπένια	3,488±0,082 ^a	2,112±0,062 ^a	12,433±0,189 ^b
Οξυγονομένα μονοτερπένια	93,228±0,445 ^a	95,033±0,126 ^a	82,192±0,163 ^b
Σεσκιτερπένια	1,328±0,043 ^a	1,720±0,057 ^b	2,237±0,062 ^c
Οξυγονομένα σεσκιτερπένια	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,217±0,010 ^b
Έλαιο (%) Απώλεια από την αποθηκευμένη ρίγανη	5,003±0,079 ^a	4,813±0,070 ^a	4,705±0,108 ^a

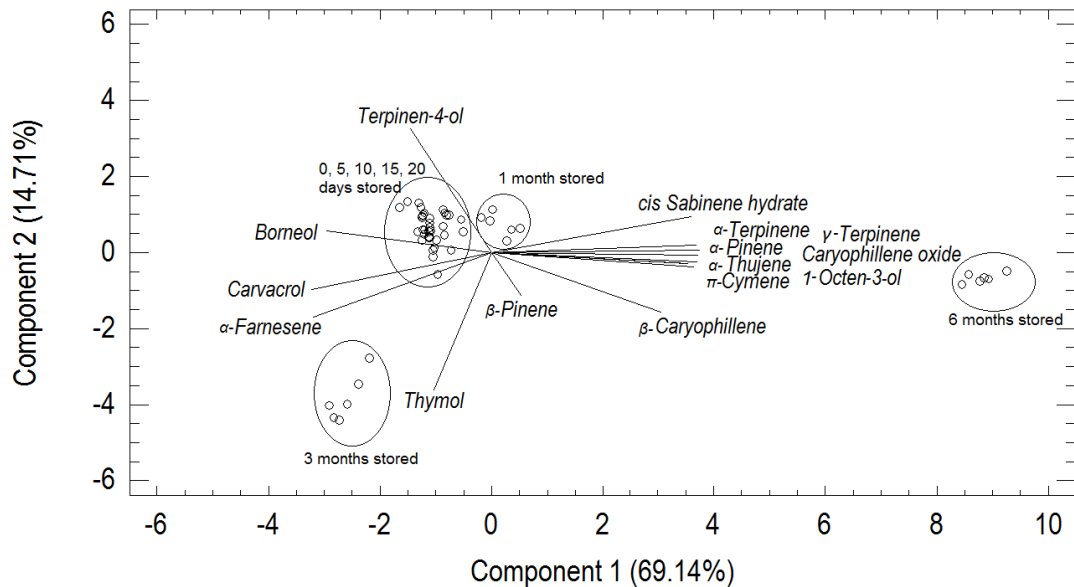
Αν και η παρακολούθηση της ποιότητας και η σε βάθος γνώση των χαρακτηριστικών του αιθέριου ελαίου κατά την αποθήκευση είναι αδιαμφισβήτητα απαραίτητη, ελάχιστες έρευνες έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα για τη μελέτη της σταθερότητας του αιθέριου ελαίου με την πάροδο του χρόνου, λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τις επιπτώσεις της μεταβολής των συνθηκών αποθήκευσης (Turek and Stintzing, 2013). Στην παρούσα μελέτη η εκατοστιαία αναλογία των μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων και οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων αυξήθηκαν ($P < 0,05$), ενώ η αντίστοιχη των οξυγονωμένων μονοτερπενίων μειώθηκε κατά την εξάμηνη αποθήκευση της ξηράς δρόγης (πίνακας 4.2). Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την εκατοστιαία αναλογία των οξυγονωμένων μονοτερπενίων και οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων στο μείγμα ξηράς δρόγης/συμπηκνωμένης ζωοτροφής.

Παρόμοια αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν από τους Verma et al. (2011), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση της συγκέντρωσης των μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων και οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων στο αιθέριο έλαιο αποθηκευμένων φύλλων δενδrolίβανου μετά από 90 ημέρες αποθήκευσης υπο σκιά σε θερμοκρασία δωματίου.

Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα φαινολικού τύπου αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Φαινόλες όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη διακόπτουν ή καθυστερούν τις οξειδωτικές διεργασίες (Treibs, 1960). Για παράδειγμα, στην περίπτωση του θυμαριού, του οποίου το αιθέριο έλαιο περιείχε τουλάχιστον 80 % φαινολικού τύπου αιθέρια έλαια, όπως και η ρίγανη στην παρούσα εργασία, διατήρησε την σύνθεση του αιθέριου ελαίου σχεδόν αναλλοίωτη κατά την αποθήκευση (Turek and Stintzing 2012; Turek et al. , 2012).

Σε ότι αφορά τα υπόλοιπα συστατικά παρατηρήθηκε αύξηση της εκατοστιαίας αναλογίας για τα περισσότερα από αυτά (α-θουγένιο, α-πινένιο, 1-οκτεν-3-όλη, α-τερπινένιο, π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, cis-ένυδρο σαμπινένιο, β-καρυοφυλλένιο, οξείδιο του καρυοφυλλένιου) μετά την πάροδο 6 μηνών. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι μειώθηκε η εκατοστιαία αναλογία της καρβακρόλης, του κυριότερου δηλαδή συστατικού από ποσοτικής άποψης.

Η ανάλυση PCA (Principal component analysis) εφαρμόστηκε στα συγκεντρωτικά δεδομένα (pooled data) με στόχο να μειωθεί η διάσταση των δεδομένων και να ανιχνευτούν οι πιο σημαντικές αιτίες παραλλακτικότητας, αφού παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ χημικών ενώσεων. Η ανάλυση PCA των 15 χημικών ενώσεων είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία τριών κυρίων συστατικών με τιμές eigen μεγαλύτερες από 1.0, δηλαδή ένα κοινό σημαντικό στατιστικό σημείο. Τα τρία επιλεγθέντα σημεία συνέβαλλαν κατά 90.55 % στην ολική παραλλακτικότητα. Στο διάγραμμα 4.1, οι χημικές ενώσεις εκπροσωπούνται ως μια λειτουργία των πρώτων και δεύτερων κύριων συστατικών. Στην πρώτη κύρια ομάδα αποδόθηκε το 69.14% της ολικής παραλλακτικότητας και περιελάμβανε κυρίως τα ακόλουθα μονοτερπένια: cis-σαμπινένιο, οξείδιο του καρυοφυλλένιου και καρβακρόλη. Το cis-σαμπινένιο και το οξείδιο του καρυοφυλλένιου τοποθετήθηκαν πλησίον στην θετική πλευρά του οριζόντιου άξονα υποδεικνύοντας ότι συσχετίζονται θετικά μεταξύ τους. Επιπλέον, είχαν μεγάλη απόσταση από την αρχή του άξονα υποδεικνύοντας ότι αντιπροσωπεύονται από την πρώτη κύρια ομάδα. Από την άλλη πλευρά, η καρβακρόλη τοποθετήθηκε στην αρνητική πλευρά της πρώτης κύριας ομάδας



Διάγραμμα 4.1. Ανάλυση PCA των 15 επιμέρους συστατικών του αιθέριου ελαίου.

γεγονός που σημαίνει ότι συσχετίζεται αρνητικά με το *cis*-σαμπινένιο και το οξείδιο του καρνοφυλλένιου. Όλα τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν για 6 μήνες, ομαδοποιήθηκαν πλησίον του *cis*-σαμπινένιου και του οξειδίου του καρνοφυλλένιου και τα οποία είχαν το υψηλότερο περιεχόμενο των συγκεκριμένων συστατικών. Σε αντίθεση, τα δείγματα αυτά είχαν το χαμηλότερο περιεχόμενο σε καρβακρόλη.

Το δεύτερο κύριο συστατικό αιτιολόγησε το 14,71% της ολικής παραλλακτικότητας και περιελάμβανε τη θυμόλη, την τερπινέν-4-όλη και τα μη οξυγονωμένα σεσκιτερπένια. Η τερπινέν-4-όλη εντοπίστηκε στη θετική πλευρά του δεύτερου κύριου συστατικού πλησίον όλων των δειγμάτων τα οποία αποθηκεύτηκαν για μερικές ημέρες ή ένα μήνα και επομένως τα δείγματα αυτά χαρακτηρίστηκαν από την μέγιστη περιεκτικότητα σε τερπινέν-4-όλη. Από την άλλη πλευρά, η θυμόλη και το α-φαρνεσένιο τοποθετήθηκαν στην αρνητική πλευρά του δεύτερου κύριου συστατικού, υποδυκνείοντας αρνητική συσχέτιση με την τερπινέν-4-όλη. Όλα τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν για 3 μήνες ομαδοποιήθηκαν πλησίον των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων και επομένως τα συγκεκριμένα δείγματα χαρακτηρίστηκαν από την μέγιστη περιεκτικότητα σε θυμόλη και α-φαρνεσένιο. Σε αντίθεση, το β-καρνοφυλλένιο είχε τις υψηλότερες τιμές μετά από 6 μήνες αποθήκευσης.

Το τρίτο κύριο συστατικό αιτιολόγησε το 6,69% της ολικής παραλλακτικότητας και περιελάμβανε το β-πινένιο και την βορνεόλη. Αναλυτικότερα, το β-πινένιο τοποθετήθηκε πλησίον της αρχής του άξονα, μακριά από όλα τα δείγματα,

υποδεικνύοντας ότι δεν μεταβλήθηκε κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η βορνεόλη τοποθετήθηκε σε μεγάλη απόσταση από τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν για 6 μήνες. Επομένως, αυτά τα δείγματα είχαν τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε βορνεόλη.

4.4.2 Περιεκτικότητα της ζωοτροφής σε αιθέριο έλαιο και προφίλ αυτού

Όπως φαίνεται στον πίνακα 14, όταν η ξηρά δρόγη αλέστηκε και αναμίχθηκε με το μείγμα ΣΖ σε αναλογία 47,2% w/w, τότε παρατηρήθηκε μεγαλύτερη απώλεια αιθέριου ελαίου (περίοδος αποθήκευσης 30 ημέρες). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η άλεση καταστρέφει μεγάλο μέρος των αδένων με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα αιθέρια έλαια και να ευνοούνται οι απώλειες μέσω της πτητικότητας που το χαρακτηρίζει. Οι Verma et al. (2011) παρατήρησαν απώλειες αιθέριου ελαίου (από 2,7 % σε 1,1 % στη ξηρά ουσία) σε αποθηκευμένα επί 9 μήνες αλεσμένα φύλλα δενδρολίβανου υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην παρούσα εργασία η καρβακρόλη (πίνακας 14) ήταν το κυριότερο συστατικό του αιθέριου ελαίου (90,0%). Η υψηλή περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου της ρίγανης σε καρβακρόλη είναι χαρακτηριστική για την ελληνική ρίγανη (Vokou et al., 1993; Novak et al., 2011; Karamanos and Sotiropoulou, 2013) ενώ ταυτόχρονα συσχετίζεται θετικά με την ποιότητα της (Kokkini et al., 1997; Economou et al., 2011). Σημειώνεται ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη βιοσυντίθενται από την αυτοξειδωση του γ-τερπινένιου σε π-κυμένιο κατόπιν υδροξυλίωσης του τελευταίου (Poulose and Croteau, 1978). Επιπλέον, το άθροισμα των ακόλουθων τεσσάρων συστατικών: π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, η θυμόλη και καρβακρόλη αντιπροσωπεύουν το 93,66% του συνόλου. Αυτό είναι σε συμφωνία με τους Vokou et al., (1993) οι οποίοι ανέφεραν ότι το άθροισμα αυτών των τεσσάρων φυσικών ενώσεων αποτελούν τουλάχιστον το 80% του αιθέριου ελαίου της ρίγανης από φυτά που συλλέχθηκαν από διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες της Ελλάδας.

Στην παρούσα μελέτη, το άθροισμα των συγκεντρώσεων του γ-τερπινένιου και του π-κυμένιου παρέμειναν αμετάβλητα, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση της καρβακρόλης η οποία μειώθηκε κατά την αποθήκευση (Πίνακας 4.3). Τα αποτελέσματα αυτά

Πίνακας 4.3. Απώλεια αιθέριου ελαίου και μεταβολή του προφίλ αυτού κατά την αποθήκευση της ζωοτροφής (47,2% w/w).

	Ημέρες μετά 0	ανάμειξη της 5	αλεσμένης δρόγης 10	με το 15	μείγμα 20	των ΣΖ 30
<i>α</i> -θουγένιο	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,092±0,001b
<i>α</i> -πινένιο	0,100±0,000 ^a	0,092±0,003 ^a	0,093±0,003 ^b	0,098±0,002 ^a	0,093±0,003 ^a	0,100±0,000a
<i>β</i> -πινένιο	0,093±0,004 ^a	0,097±0,002 ^a	0,095±0,002 ^a	0,100±0,000 ^a	0,092±0,003 ^a	0,097±0,002a
1-οκτεν-3-όλη	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,100±0,011b
<i>α</i> -τερπινένιο	0,195±0,003 ^a	0,190±0,003 ^a	0,202±0,005 ^a	0,203±0,004 ^a	0,198±0,005 ^a	0,188±0,007a
<i>π</i> -κυμένιο	2,083±0,054 ^a	2,083±0,079 ^a	1,950±0,056 ^a	2,050±0,062 ^a	2,033±0,056 ^a	1,933±0,080a
<i>γ</i> -τερπινένιο	0,883±0,031 ^a	1,000±0,052 ^a	0,967±0,049 ^a	0,950±0,022 ^a	0,917±0,031 ^a	0,967±0,021a
Cis-Sabinene hydrate	0,093±0,005 ^a	0,095±0,003 ^a	0,095±0,003 ^a	0,100±0,000 ^a	0,100±0,000 ^a	0,097±0,003a
Βορνεόλη	0,832±0,156 ^a	0,933±0,033 ^a	0,798±0,152 ^a	0,950±0,072 ^a	0,900±0,052 ^a	1,033±0,049a
Τερπινεν-4-όλη	0,683±0,070 ^a	0,783±0,048 ^a	0,933±0,021 ^b	0,967±0,021 ^b	0,817±0,031 ^a	0,867±0,061a
Θυμόλη	0,208±0,004 ^a	0,200±0,004 ^a	0,198±0,004 ^a	0,193±0,003 ^a	0,193±0,003 ^a	0,195±0,003a
Καρβακρόλη	90,583±0,265 ^a	90,517±0,276 ^a	90,567±0,379 ^a	89,383±0,247 ^{ab}	87,783±0,648 ^{ab}	85,750±1,025b
<i>β</i> -καρνοφυλλένιο	1,017±0,017 ^a	0,917±0,017 ^a	0,967±0,021 ^a	0,863±0,042 ^a	0,900±0,052 ^a	0,867±0,049a
Οξειδίο του καρνοφυλλένιου	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,100±0,000b
<i>α</i> -φαρνεσένιο	0,393±0,003 ^a	0,390±0,004 ^a	0,382±0,011 ^a	0,387±0,010 ^a	0,393±0,005 ^a	0,398±0,002a
Έλαιο (ml) Απώλεια από ζωοτροφή	1,475±0,008 ^a	1,152±0,009 ^b	1,096±0,002 ^c	1,025±0,006 ^d	0,965±0,011 ^e	0,829±0,008f
Έλαιο (%) Απώλεια από ζωοτροφή	100,017±0,017 ^a	78,113±0,617 ^b	74,305±0,133 ^c	69,469±0,423 ^d	65,412±0,717 ^e	56,215±0,527f
Μονοτερπένια	3,355±0,052 ^a	3,462±0,094 ^a	3,307±0,090 ^a	3,402±0,074 ^a	3,333±0,062 ^a	3,377±0,099a
Οξυγονομένα μονοτερπένια	92,400±0,348 ^a	92,528±0,281 ^a	92,592±0,321 ^a	91,593±0,283 ^{ab}	89,793±0,669 ^{ab}	87,942±1,074b
Σεσκιτερπένια	1,410±0,016 ^a	1,307±0,015 ^a	1,384±0,028 ^a	1,250±0,049 ^a	1,293±0,053 ^a	1,265±0,050a
Οξυγονομένα μονοτερπένια	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,100±0,000b

αντικατοπτρίζουν τη βιοσυνθετική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των προαναφερθέντων αυτών χημικών ενώσεων όπως έχει δειχθεί και από τους Toncer et al. (2009) αλλά και από τους Karamanos and Sotiropoulou (2013).

Σε ότι αφορά το οξείδιο του καρυοφυλλένιου, παρατηρήθηκε αύξηση στο αιθέριο έλαιο της αποθηκευμένης ξηράς δρόγης (αποθήκευση 6 μήνες) αλλά και στην αποθηκευμένη ζωοτροφή (αποθήκευση 30 ημέρες). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Misharina and Polshkon (2005) οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση ορισμένων οξειδωμένων αιθέριων ελαίων όπως το οξείδιο του καρυοφυλλένιου και το οξείδιο της λιναλοόλης σε αιθέριο έλαιο μαντζουράνας κατόπιν αποθήκευσης αυτού επί 1 μήνα.

Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η εκατοστιαία αναλογία των οξυγονωμένων αιθέριων ελαίων είναι πολύ υψηλότερη από αυτή των μη οξυγονωμένων, αφού κυριαρχούν ποσοτικά τα οξυγονωμένα μονοτερπένια στα οποία εμπεριέχεται η καρβακρόλη (90,0% του αιθέριου ελαίου) και η θυμόλη. Επιπλέον, η αναλογία των σεσκιετερπενίων ήταν πολύ χαμηλή. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί και από τους Economou et al. (2011) σε φυτά ελληνικής (*O. Hirtum*) και τούρκικης ρίγανης (*O. Onites*).

Η καρβακρόλη ήταν το κύριο συστατικό (90,0 % v/v) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και γι' αυτό το λόγο η ποσοτικοποίηση της καρβακρόλης εντός της ζωοτροφής αποτέλεσε ένα τρόπο εκτίμησης της απώλειας του αιθέριου ελαίου από το μείγμα ΣΖ (το οποίο περιείχε 3,1 % ξηρά δρόγη). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια ελαφρά μείωση στη συγκέντρωση της καρβακρόλης. Η αρχική συγκέντρωση εκτιμήθηκε σε 125,2 μL/kg συμπηκνωμένης ζωοτροφής (εβδομάδα 0) ενώ την τελευταία εβδομάδα (4^η), η συγκέντρωση της καρβακρόλης ήταν 119,0 μL/kg. Η διαφορά μεταξύ αρχικής και τελικής εβδομάδας ήταν πολύ χαμηλή και συγκεκριμένα 6,2 μL/kg (125,2 μL/kg - 119,0 μL/kg) ή 4,9 %. Αντίστοιχα, η απώλεια του αιθέριου ελαίου στην συμπηκνωμένη ζωοτροφή με 47,2 % ξηρά δρόγη w/w, υπολογίστηκε σε 56 % μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι στο συγκεκριμένο μείγμα ζωοτροφής/ξηράς δρόγης (μη πρακτική αναλογία) προσομοίασε την αντίστοιχη απώλεια αιθέριου ελαίου από αλεσμένο φυτό χωρίς την παρουσία ζωοτροφής. Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, η αναλογία μεταξύ ξηράς δρόγης και του μείγματος ΣΖ δείχνει πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παρατήρηση χαμηλών απωλειών αιθέριου ελαίου από το αλεσμένο υλικό.

Η ενσωμάτωση της ξηράς δρόγης στο μείγμα ΣΖ συνιστάται να λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την άλεση ή η άλεση αμέσως πριν την ανάμειξη της ρίγανης στο μείγμα ΣΖ. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της ενσωμάτωσης είναι ότι το ευαίσθητο και πτητικό αιθέριο έλαιο παραμένει προστατευμένο. Αυτό συνεπάγεται ότι δεν λαμβάνει χώρα απώλεια αιθέριου ελαίου λόγω πτητικότητας ή οξειδωσης από εξωτερικούς παράγοντες. Μπορεί να αποδοθεί στην δημιουργία ενός προστατευτικού στρώματος ζωοτροφής στην επιφάνεια του σακιδίου που περιέχει το μείγμα ξηράς δρόγης/μείγματος ΣΖ το οποίο δεν επιτρέπει τις απώλειες σε αιθέριο έλαιο. Μάλιστα, αυτή η προστασία είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της τροφής (μικρότερη αναλογία ξηράς δρόγης/ μείγματος ΣΖ).

Όμως, εκτός από τις απώλειες σε αιθέριο έλαιο που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση, τα επιμέρους συστατικά του αιθέριου ελαίου υποβάλλονται σε φυσικές διακυμάνσεις φωτός, θερμοκρασίας ή συνδυασμό αυτών των δύο με την παράλληλη παρουσία οξυγόνου (Hausen et al., 1999; Misharina et al., 2003; Hagvall et al., 2007).

4.5. Συμπεράσματα

- Διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε σημαντική απώλεια αιθέριου ελαίου από την ξηρά δρόγη σε περίοδο αποθήκευσης 6 μηνών. Επομένως, η αποθήκευση της ξηράς δρόγης ρίγανης υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο διατήρησης του αιθέριου ελαίου.
- Η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου της ξηράς δρόγης μεταβάλλεται συνεχώς κατά την αποθήκευση χωρίς όμως να υποβαθμίζεται η ποιότητά του, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα του σε καρβακρόλη.
- Διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε σημαντική απώλεια αιθέριου ελαίου από τη ζωοτροφή με περιεκτικότητα 3,1 % σε ξηρά δρόγη. Επομένως, η άλεση και η ανάμειξη της ξηράς δρόγης με συμπηκνωμένη ζωοτροφή κάθε 2 εβδομάδες, αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο χορήγησης αιθέριων ελαίων στα ζώα με ελάχιστες απώλειες και χαμηλό κόστος. Ταυτόχρονα, η ενσωμάτωση των αλεσμένων αποξηραμένων βοτάνων

στο μείγμα ΣΖ παρέχει καλύτερη ομογενοποίηση του φυτικού υλικού και της συμπυκνωμένης ζωοτροφής.

- Η απώλεια του αιθέριου ελαίου από την ζωοτροφή όταν η ξηρά δρόγη αλέθεται και αναμειγνύεται σε μείγμα ΣΖ εξαρτάται εκτός των άλλων, από την αναλογία μεταξύ ξηράς δρόγης και μείγματος ΣΖ.
- Οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν από τα συγκεκριμένα πειράματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πρακτικό επίπεδο από τους παραγωγούς και ακόμη περισσότερο, για πιθανές μελλοντικές εφαρμογές αιθέριων ελαίων στην διατροφή των παραγωγικών ζώων.

Κεφάλαιο 5. Πείραμα μελέτης ζυμωτικών φαινομένων

5.1.Εισαγωγή

Το πεπτικό σύστημα των μηρυκαστικών ζώων διαφέρει σημαντικά από εκείνο των μονογαστρικών ζώων, τόσο ανατομικά όσο και φυσιολογικά. Τα μηρυκαστικά διαθέτουν τρία επιπλέον τμήματα: τον κεκρύφαλο, τον εχίνο και τη μεγάλη κοιλία εντός των οποίων λαμβάνουν χώρα εκτεταμένα ζυμωτικά φαινόμενα (Hart et al., 2008). Τα φαινόμενα αυτά επιτρέπουν στα μηρυκαστικά ζώα να πέπτουν την φυτική ύλη και να λαμβάνουν ενέργεια και θρεπτικά συστατικά μέσω της δράσης των μικροοργανισμών. Απουσία μικροχλωρίδας τα μηρυκαστικά δεν θα μπορούσαν να πέψουν τις φυτικές ίνες διότι ο οργανισμός τους δεν διαθέτει τα απαραίτητα ενδογενή πεπτικά ένζυμα (Hart et al., 2008). Στην πέψη της φυτικής ύλης εντός των ζυμωτικών χώρων συμβάλλει σημαντικά και η μηχανική αποσάρθρωση της τροφής που λαμβάνει χώρα κατά τον μηρυκασμό. Οι μικροβιακές ζυμώσεις γίνονται από ένα πολύπλοκο οικοσύστημα το οποίο αποτελείται από βακτήρια, πρωτόζωα, μεθανοβακτήρια, βακτηριοφάγους αλλά και από έναν μικρότερου μεγέθους πληθυσμό μηκύτων αλλά όχι κατ'ανάγκη μεταβολικώς ασήμαντο (Hart et al., 2008). Η μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας αποτελείται κυρίως από βακτήρια (10^{10} - 10^{11} /mL), μήκυτες (10^3 - 10^6 /mL) και πρωτόζωα (10^4 - 10^6 /mL) (Koike and Kobayashi, 2009). Μελέτες βασιζόμενες στο 16S rDNA έχουν δείξει ότι εντός της μεγάλης κοιλίας υπάρχουν 300-400 είδη βακτηρίων (Edwards et al., 2004, Yu et al., 2006), όμως το μεγαλύτερο μέρος αυτών δεν έχει ταυτοποιηθεί (Koike

and Kobayashi, 2009). Στην αποδόμηση των ινωδών ουσιών συμβάλουν περισσότερο τα βακτήρια και τα πρωτόζωα και λιγότερο οι μύκητες από πλευράς αποδόμησης του NDF (Dijkstra and Tamminga, 1995). Μετά τη ζύμωση του φυτικού υποστρώματος από τους μικροοργανισμούς μέσω της δράσης πεπτικών ενζύμων (α-αμυλάση, πρωτεάση, λιπάση, κυτταρινάση, ξυλανάση) έπονται τα φαινόμενα της πέψης και της απορρόφησης από το πεπτικό σύστημα του ζώου. Έτσι, πολλά προϊόντα που παράγονται κατά τις μικροβιακές ζυμώσεις (πτητικά λιπαρά οξέα, μικροβιακή πρωτεΐνη) είναι ιδιαίτερα σημαντικά για το μηρυκαστικό ζώο. Σημειώνεται ότι πτητικά λιπαρά οξέα ικανοποιούν κατά προσέγγιση το 80 % των ενεργειακών αναγκών (France and Siddons, 1993) ενώ η μικροβιακή πρωτεΐνη το 60-85 %, των αναγκών, ίσως και το 100% (Orskov, 1982). Επομένως, επηρεάζονται αναμφίβολα και οι αποδόσεις του μηρυκαστικού ζώου γεγονός που αιτιολογεί την έρευνα που γίνεται γύρω από την προσπάθεια τροποποίησης των ζυμωτικών φαινομένων προκειμένου να μεγιστοποιηθούν οι αποδόσεις (Frankic et al., 2009). Στην περίπτωση των μηρυκαστικών η αξιοποίηση της ενέργειας του σιτηρεσίου είναι υψηλότερη όταν κατά την διενέργεια των ζυμώσεων μεγιστοποιείται η παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, μεταβάλλεται το προφίλ αυτών (αύξηση λόγου προπιονικό/οξικό οξύ) και μειώνεται η παραγωγή μεθανίου (Benchaar et al., 2009). Όσον αφορά τον μεταβολισμό του αζώτου, τα μηρυκαστικά ζώα δεν αξιοποιούν αποτελεσματικά το άζωτο του σιτηρεσίου (απώλειες κατά τις ζυμώσεις). Η αξιοποίηση του αζώτου της τροφής και η μεταφορά του στο γάλα είναι κατά μέσον όρο $24,7 \pm 0,14$ % (13,7-39,8 %). Επομένως, το αποβαλλόμενο άζωτο συμβάλει στη ρύπανση του εδάφους, του νερού και της ατμόσφαιρας (Benchaar et al., 2009). Η βελτίωση της αξιοποίησης του αζώτου βασίζεται σε δύο αρχές. Στην μεγιστοποίηση της σύνθεσης μικροβιακής πρωτεΐνης και στη μεγιστοποίηση της διαθεσιμότητας απαραίτητων αμινοξέων στο λεπτό έντερο για το ζώο ξενιστή (Benchaar et al., 2009).

Το μεθάνιο αποτελεί μία μορφή ενεργειακής απώλειας για το ζώο η οποία εκτιμάται σε 2-12% της συνόλης ενέργειας (Johnson and Johnson, 1995). Επιπλέον, το μεθάνιο επιβαρύνει σημαντικά το περιβάλλον διότι αποτελεί ένα από τα αέρια του θερμοκηπίου τα οποία είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Σημειώνεται ότι το μεθάνιο χαρακτηρίζεται από 23 φορές υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε σύγκριση με το διοξείδιο του άνθρακα. Η κτηνοτροφία συμβάλει κατά 37 % (παραγωγή 80-115 τόνων CH₄/έτος) στην παγκόσμια παραγωγή

μεθανίου προερχόμενου από την ανθρωπογενή δραστηριότητα (Steinfeld, 2006). Μείωση στην παραγωγή μεθανίου έχει βραχυπρόθεσμες οικονομικές (βελτίωση συντελεστική αξιοποίησης της τροφής) και μακροπρόθεσμες περιβαλλοντικές επιδράσεις (περιορισμός φαινόμενου της υπερθέρμανσης του πλανήτη) (McGinn et al., 2004).

Οι ερευνητές ψάχνουν για εναλλακτικούς τρόπους τροποποίησης των ζυμωτικών φαινομένων δεδομένου ότι η απαγόρευση των αντιβιοτικών ως αυξητικούς παράγοντες εκτιμάται ότι επιφέρει αύξηση του κόστους παραγωγής κατά 3,5-5,0 % στα μηρυκαστικά ζώα (Carro and Ranilla, 2002). Ο κύριοι στόχοι είναι η αύξηση της αποτελεσματικότητας της απορρόφησης και του μεταβολισμού των θρεπτικών συστατικών, η αύξηση του λόγου προπιονικό/οξικό οξύ δίχως να μειώνεται η ολική παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, η μείωση της πρωτεόλυσης, η πεπτιδόλυση, οι απαμινώσεις ή συνδυασμός αυτών, η αύξηση των αποδόσεων των ζώων και ο περιορισμός της ανεπιθύμητης παραγωγής διάφορων μεταβολικών προϊόντων όπως είναι το μεθάνιο (Calsamiglia et al., 2007). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν ευρέως από το 1950 για να εκπληρώσουν τους προαναφερθέντες στόχους. Όμως, η αδιάκριτη χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών βακτηρίων και επομένως διακινδυνεύεται η θεραπεία του ανθρώπου από βακτηριακές λοιμώξεις (McDermott et al., 2002). Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων συσχετίζεται με τη μεταφορά ανθεκτικών γονιδίων μέσω πλασμιδίων τα οποία είναι ευμεγεθή, μεταφερόμενα χρωμοσωμικά τμήματα DNA (McDermott et al., 2002). Έτσι, τα πλασμίδια ευνοούν την ταχεία μετάδοση ανθεκτικών γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων, οπότε η απαγόρευση της χρήσης τους ως αυξητικοί παράγοντες από την Ε.Ε., πυροδότησε την ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών τρόπων τροποποίησης των ζυμωτικών φαινομένων όπως είναι πχ., τα αιθέρια έλαια (Frankie et al., 2009).

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν μια εναλλακτική κατηγορία φυσικών ενώσεων τροποποίησης των ζυμώσεων και έχουν μελετηθεί και στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων *In vitro* αλλά και *In vivo*. Άλλες κατηγορίες φυσικών ενώσεων αποτελούν οι πολυφαινόλες, οι σαπωνίνες και οι οργανοθειϊκές ενώσεις ενώ όλες οι προαναφερθέντες κατατάσσονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών (Hart et al., 2008).

In vitro μελέτες με αιθέρια έλαια, έχουν δείξει μείωση της παραγωγής αμμωνίας (προερχόμενης από απαμινώσεις αμινοξέων) και μείωση της αποδόμησης του αμύλου μέσω αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων υπερπαραγωγής αμμωνίας (*hyperammonia producing bacteria*) και του *Ruminobacter amylophilus* (Wallace, 2004). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μείωση στην παραγωγή μεθανίου (Evans and Martins, 2000).

Ωστόσο, οι συνθήκες *in vitro* δεν μπορούν να προσομοιώσουν και να εξασφαλίσουν τις πραγματικές συνθήκες των προστομάχων όπως είναι η βιοποικιλότητα και η βιοσιμότητα των μικροβιακών πληθυσμών. Τα *in vitro* αποτελέσματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προκειμένου να προσανατολίσουν και να κατευθύνουν τους ερευνητές (πχ. ύψος δοσολογίας, είδος αιθέριου ελαίου κτλ.) ενώ η τελική δοκιμή και η μελέτη της μακροπρόθεσμης επίδρασης θα πρέπει να γίνεται πάντα *in vivo*. Επιπλέον, οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις των αιθέριων ελαίων στα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων θα πρέπει να μελετώνται *in vivo* (Benchaar et al., 2009).

Όμως, η επίδραση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δοσολογία. Έτσι, χαμηλές δόσεις δεν επηρεάζουν τις αποδόσεις, ενώ πολύ υψηλές δόσεις είναι τοξικές (Frankie et al., 2009). Ορισμένοι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας έχουν την ικανότητα να ανάγουν τα αιθέρια έλαια σε αδρανείς αλκοόλες, γεγονός που αιτιολογεί την ακαταλληλότητα των χαμηλών δόσεων στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων (Chizzola et al., 2004).

5.2. Υλικά και μέθοδοι

5.2.1. Ζωικό υλικό και πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σχετικά με τη φροντίδα και τη χρήση των παραγωγικών ζώων και κατ' επέκταση της κατάλληλης διαχείρισης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η άσκοπη καταπόνηση των ζώων. Για τους σκοπούς του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν οκτώ υγιείς αίγες της φυλής Alpine (εικόνα 5.1) οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, με αρχικό μέσο σωματικό βάρος $49,25 \pm 0,90$ kg (ομάδα μάρτυρα, n=4) και $51,63 \pm 0,90$ kg (ομάδα επέμβασης, n=4). Τα ζώα διατράφηκαν με σανό μηδικής και μείγμα ΣΖ

(βασικό μείγμα) σε αναλογία 1/1 (600 g μείγμα+600 g σανό). Οι δύο ομάδες κατανάλωσαν τα ίδια σιτηρέσια με μόνη διαφορά ότι στην ομάδα της επέμβασης προστέθηκαν 20 g αλεσμένης ξηράς δρόγης ρίγανης στο βασικό μείγμα, ώστε να επιτευχθεί μια δοσολογία 1 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης/ζώο/ημέρα. Αναλυτικότερα, γινόταν άλεση της ξηράς δρόγης και ανάμειξη με επίσης αλεσμένο μείγμα ΣΖ, επιμελώς κάθε 15 ημέρες. Όλα τα ζώα είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε καθαρό νερό καθ' όλη την πειραματική περίοδο. Η χημική σύσταση του μείγματος ΣΖ παρουσιάζεται στον πίνακα 5.1 και στον πίνακα 5.2 παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του σανού μηδικής και του μείγματος ΣΖ.



Φωτογραφία 5.1. Αίγα του πειράματος.

Πίνακας 5.1 Συστατικά και χημική σύσταση μείγματος ΣΖ.

	% (w/w)
<u>Συστατικό</u>	
Αραβόσιτος	52,0
Κριθάρι	13,5
Πίτυρα σίτου	20,0
Βαμβακοπλακούντας	10,0
CaCO ₃	2,0
Φωσφορικό διασβέστιο	1,5

NaCl	0,5
Ισοροπιστής*	0,5
Χημική σύσταση	
ΚΕΓ	7 MJ/kg
Υγρασία	12,0
Ολική πρωτεΐνη	11,5
Ολικές λιπαρές ουσίες	3,5
Ολικές ινώδεις	6,5
Τέφρα	6,5
Ασβέστιο	1,2
Φωσφόρος	0,9
NaCl	0,5
Ισοροπιστής*	0,5

*Περιέχει 10000 IU βιτ. Α., 2000 IU βιτ. D₃, 15 mg βιτ. Ε.

Πίνακας 5.2 Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του σανού μηδικής και του μείγματος ΣΖ.

Λιπαρό οξύ	Μείγμα ΣΖ	Σανός μηδικής
C16:0	16,5	30,91
C18:0	2,1	4,53
C18:1cis	26,05	11,27
C18:2trans	0,92	nd
C18:2cis	51,59	24,39
C18:3n6	0,35	1,65
C18:3n3	2,49	25,15

5.2.2. Μετρήσεις

5.2.2.1. Σωματικά βάρη, ποσοτικοποίηση αιθέριου ελαίου ξηράς δρόγης και προφίλ αυτού

Τα ζώα ζυγίζονταν κάθε 15 ημέρες προκειμένου να καταγραφούν τα ατομικά σωματικά βάρη.

Για να ποσοτικοποιηθεί η περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης σε αιθέριο έλαιο ένα αλεσμένο δείγμα 50 g υποβλήθηκε σε υδρο-απόσταξη σε συσκευή Clevenger για 3 ώρες. Το αιθέριο έλαιο αφυδατώθηκε με άνυδρο θειικό μαγνήσιο και αποθηκεύτηκε

στους -18 °C μέχρι την ανάλυσή του με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Οι συνθήκες του GC-MS ήταν οι ίδιες που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο πείραμα (σελ. 64).

5.2.2.2. pH και συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων και αμμωνίας στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Δείγματα υγρού μεγάλης κοιλίας λαμβάνονταν από τις αίγες κάθε 2 εβδομάδες καθ' όλη την πειραματική περίοδο με χρήση αντλίας κατόπιν ενδομυϊκής χορήγησης 0,3 ml Rompun (2 % ξυλαζίνη). Η τιμή του pH προσδιοριζόταν αμέσως μετά την δειγματοληψία σε πεχάμετρο (Hanna pH 210, microprocessor pH-meter). Στην συνέχεια, τα δείγματα καθαρίζονταν μέσω φιλτραρίσματος (4 στρώματα τουλοπάνι) και ακολούθησε φυγοκέντρωση (10000 g για 15 min). Κατόπιν, προσδιορίζονταν η συγκέντρωση της αμμωνίας σύμφωνα με την μέθοδο Weatherburn (1967).

Τα πτητικά λιπαρά οξέα προσδιορίζονταν στο υγρό της μεγάλης κοιλίας εις διπλούν, κατόπιν φυγοκέντρωσης σε 12000g για 10 min στους 4 °C. Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν σε αέριο χρωματογράφο Agilent εφοδιασμένο με στήλη 30mX0,25mm i.d. Nukol (Supelco, Sigma-Aldrich Co., USA) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Η θερμοκρασία της ανάλυσης διατηρούνταν σταθερή στους 185 °C. Ως αέριο φορέας χρησιμοποιήθηκε το ήλιο και η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος και του ανιχνευτή ήταν ρυθμισμένη στους 185 °C και 200 °C, αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των πτητικών λιπαρών οξέων έγινε με το εσωτερικό πρότυπο 2-αιθυλβουτυρικό οξύ.

5.2.2.3. Πεπτικά ένζυμα στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Τα δείγματα του υγρού της μεγάλης κοιλίας καθαρίζονταν μέσω φιλτραρίσματος (4 στρώματα τουλοπάνι) και στην συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρωση (10000 g για 3 min, στους 4 °C). Κατόπιν, προσδιορίσταν η ενζυμική δραστηριότητα των ακόλουθων πεπτικών ενζύμων: α-αμυλάση, πρωτεάση, κυτταρινάση, λιπάση και ξυλανάση.

Η α-αμυλάση προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bernfield (1955), η πρωτεάση σύμφωνα με τη μέθοδο Anson (1938), η κυτταρινάση σύμφωνα με τη μέθοδο Worthington (1988), η λιπάση σύμφωνα με τη μέθοδο Kanwar et al., (2005) και τέλος η ξυλανάση σύμφωνα με τη μέθοδο Chen et al., (1986). Η συνολική πρωτεΐνη του υγρού μεγάλης κοιλίας προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε U/ml υγρού μεγάλης κοιλίας και U/mg πρωτεΐνης.

5.2.2.4. Μικροβιακοί πληθυσμοί στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Προκειμένου να απομονωθεί το ολικό μικροβιακό DNA από το υγρό της μεγάλης κοιλίας χρησιμοποιήθηκε το DNeasy plant kit (Qiagen). Τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του ολικού DNA είναι τα παρακάτω (BioTechniques 2003, 34:92-97):

- Αρχικά ζυγίστηκαν 2g υγρού μεγάλης κοιλίας (αφιλτράριστο) και ακολούθησε λειοτρίβιση του παγωμένου υγρού σε υγρό άζωτο.
- Η πούδρα τοποθετήθηκε σε Falcon των 50 ml και προστέθηκαν 10 ml buffer CTAB (2% w/v CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % v/v, 2-μερκαπτοαιθανόλη, 100 µg/mL v/v πρωτεΐνάση K). Η 2-μερκαπτοαιθανόλη και η πρωτεΐνάση K προστέθηκαν στο buffer κατόπιν προθέρμανσής τους στους 65 ° C.
- Το διάλυμα ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 30 µl RNάσης A (10 mg/ml) και κατόπιν ακολούθησε επώαση στους 37 ° C για 30-40 λεπτά.
- Το διάλυμα εκχυλίστηκε με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24/1) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (10000g, για 10 min, στους 4 ° C). Συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση και η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές.
- Το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη 0,6 ml ισοαμυλικής αλκοόλης και φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 15 min στους 4 ° C. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε.
- Εντός του Falcon που περιείχε το ολικό DNA προστέθηκαν 800 µl AP1 buffer και RNάση A από το DNeasy plant kit. Ακολούθησε επώαση στους 55 ° C για 4 min.

- Προστέθηκαν 260 μl AP2 buffer και έγινε ψύξη σε πάγο. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύντομη φυγοκέντρωση (spindown) και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό.
- Σε 200 μl του υπερκείμενου υγρού προστέθηκαν 100 μl AP3 και 200 μl αιθανόλης. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη σε στήλη (DNeasy mini spin column) και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στα 6000g. Το υποκείμενο υγρό απορρίφθηκε και η στήλη πλύθηκε τρεις φορές με 500 μl AW buffer. Στην τελική φάση προστέθηκαν 50 μl προθερμασμένου (65°) δισαπεσταγμένου ύδατος (ddH_2O) και παραλήφθηκε το διάλυμα το οποίο περιείχε το DNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων στο τελικό υδατικό διάλυμα έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου nanodrop. Αναλύοντας 1 μl δείγματος, στο φασματόμετρο nanodrop ελήφθησαν τα ακόλουθα δεδομένα:

- η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (DNA)
- η καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης $\text{OD}_{260/280}$),
- η καθαρότητα του δείγματος ως προς άλλες ενώσεις όπως EDTA, υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης $\text{OD}_{260/230}$).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρθηκε 1 μl ddH_2O στην υποδοχή της συσκευής για το μηδενισμό του οργάνου (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρθηκε στην υποδοχή της συσκευής και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα του δείγματος σε τρία μήκη κύματος: 230, 260 και 280 nm. Στην συνέχεια, το φωτόμετρο εμφάνισε την συγκέντρωση του DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) και τους λόγους $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$. Όταν ο δείκτης $\text{OD}_{260/280}$ κυμαίνεται μεταξύ 1,8-2,0 και ο δείκτης $\text{OD}_{260/230}$ κυμαίνεται μεταξύ 2,0-2,2. Τότε το δείγμα θεωρείται ως υψηλής καθαρότητας.

Κατόπιν, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time quantitative polymerase chain reaction qPCR). Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική, μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA. Σε αντίθεση με την αντίδραση RT-PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της

αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επίπεδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλιωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση για την qPCR να είναι 100 ng/μl. Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς, επίσης, και οι αντίστοιχοι εκκινητές για κάθε έναν από αυτούς.

Πίνακας 5.3 Μικροοργανισμοί-στόχοι και οι αντίστοιχοι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίησή τους (αλληλουχία, μέγεθος αμπλικονίων).

Μικροοργανισμοί	Forward/reverse	Primer sequence	Μέγεθος αμπλικονίου (bp)
Ολικά βακτήρια	F	5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3'	130
	R	5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'	130
Μεθανοβακτήρια	F	5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC-3'	145
	R	5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC-3'	145
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	F	5'-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTT C-3'	1200
	R	5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC- 3'	1200
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F	5'- CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG- 3'	132
	R	5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC- 3'	132
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F	5'-GGT ATG GGA TGA GCT TGC-3'	121
	R	5'-GCC TGC CCC TGA ACT ATC-3'	121
Protozoa	F	5'-GCTTTCGWTGGTAGTGATT-3'	321
	R	5'-CTTGCCCTCYAATCGTWCT-3'	321
<i>Ruminococcus albus</i>	F	5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3'	175
	R	5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'	175
Ολικός αριθμός μυκήτων	F	5'- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC- 3'	120
	R	5'-CAAATTCACAAAAGGGTAGGATGATT-3'	120
<i>Clostridium sticklandii</i>	F	5'-TATCCTAAAATTACAATAGATATT-3'	1000

	R	5'-TTAAAGAAGTCTTTTTCAATATAT-3'	1000
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	F	5'-CGT CTW ATT TNA TGC TTG CA-3'	943
	R	5'-AGC CCC GAA GGG AAG GTG TG-3'	943
<i>Methanosphaera stadmanae</i>	F	5'-CTTAACTATAAGAATTGCTGGAG-3'	150
	R	5'-TTCGTTACTCACCGTCAAGATC-3'	150
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	F	5'-AATATTGCAGCAGCTTACAGTGAA-3'	336
	R	5'-TGAAAATCCTCCGCAGACC-3'	336

Αναλυτικότερα, η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Για μία αντίδραση qPCR τελικού όγκου 10 µl αναμίχθηκαν:

- 5 µl 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche)
- 1 µl δείγμα (συγκέντρωση 100 ng/µl)
- 4 µl μείγμα (Forward+Reverse) του αντίστοιχου ζεύγους primers για κάθε μικροοργανισμό (0,5 µM).

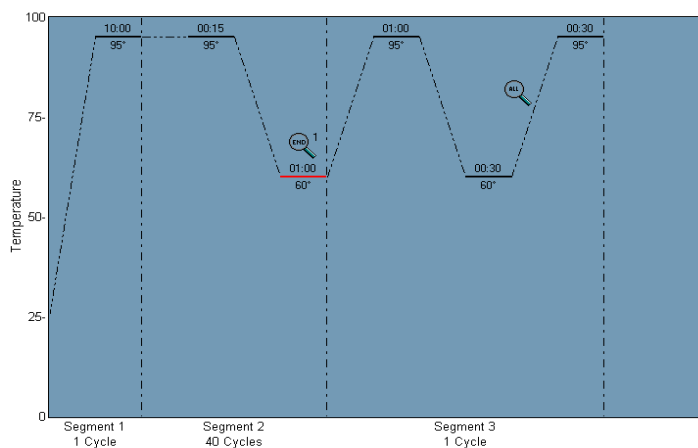
Κατά τη διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγεται είναι μηδαμινός. Κατά την φάση της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου υπάρχει διπλής έλικας DNA, η χρωστική SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (μέχρι και 1000 φορές). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης του PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Σημειώνεται ότι χρωστική SYBR Green παράγει φθορισμό

όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερείς εκκινητές ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR.

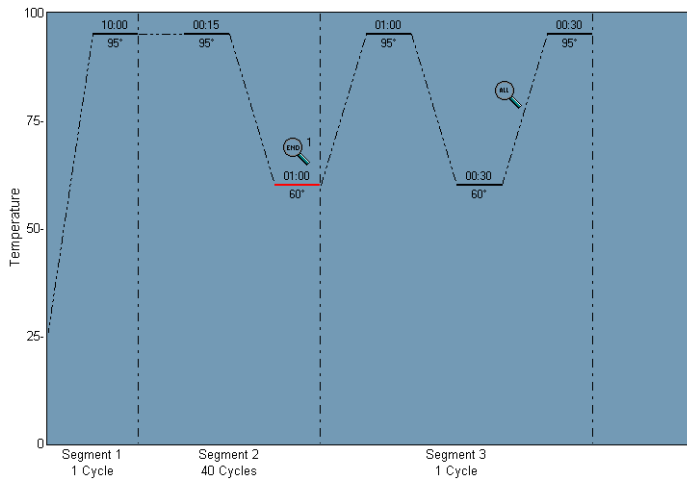
2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

- Βήμα 1: αρχική αποδιάταξη
- Βήμα 2: αποδιάταξη
- Βήμα 3: υβριδισμός εκκινητών
- Βήμα 4: επιμήκυνση
- Επανάληψη βημάτων 2-4 για ένα συγκεκριμένο αριθμό κύκλων
- Βήμα 5: τελική επιμήκυνση

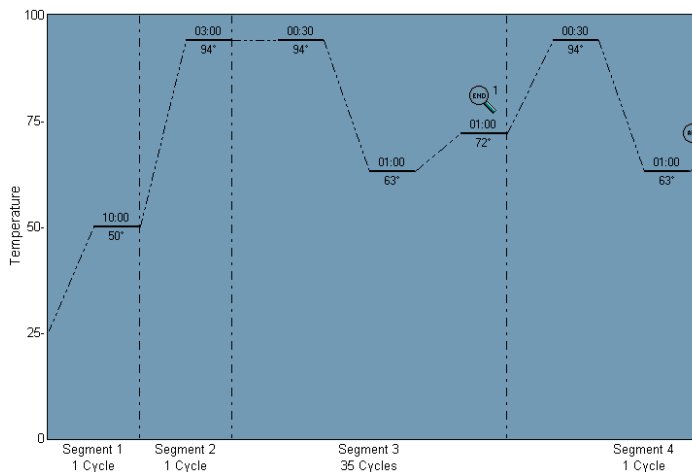
Η διάρκεια και η θερμοκρασία κάθε στάδιου όπως και ο αριθμός των κύκλων εξάρτηθηκε από το μέγεθος των αμπλικονίων. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται το θερμικό προφίλ που εφαρμόστηκε, αντίστοιχα με το μέγεθος των αμπλικονίων.



Διάγραμμα 5.1. Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μικρού μεγέθους (150 bp).



Διάγραμμα 5.2. Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μέσου μεγέθους (300 bp).



Διάγραμμα 5.3. Θερμικό προφίλ για αμπλικόνια μεγαλύτερου μεγέθους (≥ 1000 bp).

Για την εκτέλεση της qPCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τα προαναφερθέντα στάδια εκφράστηκαν ως Ct, δηλαδή ως ο κύκλος στον οποίο ανιχνεύτηκαν αντίστοιχα τα επιλεγθέντα γονίδια. Στην συνέχεια με τη χρήση των λογισμικών προγραμμάτων MxPro-3005P και LinRegPCR υπολογίστηκε η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών από τη γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης.

Η σχετική ποσοτικοποίηση κάθε μικροοργανισμού έγινε με τον ακόλουθο τύπο: $(PCR\ efficiency)^{-(Ct\ target - Ct\ total\ bacteria)}$. Με αυτό τον τρόπο υπολογίστηκε η επι της % αναλογία

του DNA κάθε μικροοργανισμού σε σχέση με το σημείο αναφοράς το οποίο ήταν το ολικό βακτηριακό DNA.

5.2.2.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποκτηθέντα δεδομένα για το σωματικό βάρος αναλύθηκαν ως αμφίδρομες επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA (two-way ANOVA) σύμφωνα με το γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 17.00 (έκδοση 8.0.0).

Όσον αφορά τα αποκτηθέντα δεδομένα για το pH, τις συγκεντρώσεις της NH₃ και των πτητικών λιπαρών οξέων, για την ενζυμική δραστηριότητα των μικροβιακών ενζύμων και των μικροβιακών πληθυσμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε επαναλαμβανόμενη ανάλυση διακύμανσης (Repeated measures-ANOVA) θεωρώντας τα δεδομένα ανά δειγματοληψία (0, 16, 35, 51, 69 ημέρες) και ανά χρονική στιγμή δειγματοληψίας (0 και 4 h) ως επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 17.00 (έκδοση 8.0.0).

5.3.Αποτελέσματα και σχολιασμός

5.3.1. Αιθέριο έλαιο, προφίλ αιθέριου ελαίου και σωματικά βάρη

Η περιεκτικότητα της ξηράς δρόγης (η οποία χορηγήθηκε στα ζώα) σε αιθέριο έλαιο ήταν 5,0%. Το προφίλ του αιθέριου ελαίου παρουσιάζεται στον πίνακα 5.4 όπου φαίνεται η υψηλή περιεκτικότητα του σε καρβακρόλη (89,0 %)

Πίνακας 5.4. Προφίλ του αιθέριου ελαίου της ρίγανης που κατανάλωσαν οι αίγες κατά την πειραματική περίοδο.

Συστατικό	(%)
1. α-θουγένιο	0,19
2. α-πινένιο	0,28
3. 1-οκτεν-3-όλη	0,09
4. β-πινένιο	0,53
5. α-τερπινένιο	0,59

6. π-κυμένιο	2,84
7. γ-τερπινένιο	2,74
8. cis-σαμπινένιο ένυδρο	ίχνη*
9. Βορνεόλη	0,16
10. Τερπινεν-4-όλη	0,32
11. Θυμόλη	0,13
12. Καρβακρόλη	89,0
13. β-καρυοφυλλένιο	1,70
14. α-χουμουλένιο	0,16
15. α-φαρνεσένιο	0,15
Σύνολο	98,88

ίχνη* < 0,08

Η κατανάλωση αιθέριων ελαίων επιβαρύνει τον οργανισμό του ζώου διότι τα αιθέρια έλαια ως τοξικές ουσίες πρέπει να αποβληθούν και ως εκ τούτου δαπανάται ενέργεια για το σκοπό αυτό (Dziba and Provenza, 2008). Πιο συγκεκριμένα, αυτό αποδίδεται στην ανάγκη μετατροπής των αιθέριων ελαίων από λιπόφιλες σε υδρόφιλες χημικές ενώσεις προκειμένου να εκκριθούν από τον οργανισμό του ζώου, μια διαδικασία κατά την οποία καταναλώνονται γλυκόζη και αμινοξέα (Villalba et al., 2006). Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στο σωματικό βάρος από την κατανάλωση αιθέριων ελαίων (Πίνακας 5.5). Αυτό συνεπάγεται ότι η κατανάλωση τροφής δεν επηρεάστηκε από τα αιθέρια έλαια ενώ τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα. Σύμφωνα με τους Dziba and Provenza (2008) στην περίπτωση των προβάτων μπορούν να καταναλώσουν μέχρι και 27-28 g τερπενίων/ημέρα χωρίς να μειωθεί η κατανάλωση της τροφής. Έτσι η ημερήσια δοσολογία της τάξεως του 1ml/αίγα θεωρείται ως σχετικά χαμηλή ή όχι τόσο υψηλή ώστε να επηρεάζει την κατανάλωση τροφής.

Πίνακας 5.5. Μετρήσεις του σωματικού βάρους καθ'όλη την πειραματική περίοδο.

	Σιτηρέσιο (Σ)		SE	Χρόνος δειγματοληψίας σε ημ. (Δ)					SEM	Επιδράσεις		
	Μάρτυρας	Επέμβαση		0	16	35	51	69		Σ	Δ	ΣΧΔ
ΣΒ	49,52	52,21	1,34	50,75	51,19	51,00	50,75	51,06	0,9685	NS	NS	NS

Οι Kung et al. (2008) δεν παρατήρησαν μεταβολή του σωματικού βάρους σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατόπιν προσθήκης αιθέριου ελαίου (*Crina ruminants*) στο σιτηρέσιο (1,2 g/ζώο/ημέρα).

5.3.2. pH και συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων και αμμωνίας στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζεται η επίδραση της ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας των αιγών του πειράματος.

Αρχικά, επισημαίνεται ότι η τιμή του pH εντός της μεγάλης κοιλίας θεωρείται μία πολύ σημαντική παράμετρος η οποία σχετίζεται με τη σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης ενώ επηρεάζει και τη δράση ορισμένων αιθέριων ελαίων. Έτσι, η σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης εντός της μεγάλης κοιλίας μεγιστοποιείται όταν μεγιστοποιούνται οι ζυμώσεις των ινωδών ουσιών αλλά και των μη δομικών πολυσακχαριτών (άμυλο, σάκχαρα) ενώ τιμή του pH διατηρείται πάνω από το 6,2. Όταν η τιμή του pH μειώνεται κάτω από 6,0 τότε μειώνεται και η προσκόλληση των κυτταρινολυτικών βακτηρίων στα τεμαχίδια της τροφής, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της αποδόμησης των ινωδών ουσιών (Sung et al., 2007).

Όσον αφορά την επίδραση του pH στην δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων, για παράδειγμα στην περίπτωση της καψαϊσίνης (κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του πιπεριού) χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη δράση σε χαμηλό pH (αύξηση λόγου ΣΖ/ΧΖ) ενώ σε υψηλό pH (σιτηρέσια πλούσια σε ινώδεις ουσίες) η δράση της είναι πολύ περιορισμένη. Όσον αφορά τα φαινολικού τύπου αιθέρια έλαια (καρβακρόλη, θυμόλη) η αντιμικροβιακή τους δράση ενισχύεται όσο μειώνεται το pH, λόγω του ότι το χημικό μόριο γίνεται πιο υδρόφοβο (Calsamiglia et al., 2007). Έτσι, διευκολύνεται η είσοδος του στα μικροβιακά κύτταρα. Στην παρούσα εργασία, το pH είχε τιμές ελαφρώς υψηλότερες του 7,0 ($7,56 \pm 0,09$ και $7,10 \pm 0,09$ στην ομάδα του μάρτυρα και της επέμβασης αντίστοιχα) γεγονός που ενδεχομένως δεν ευνόησε τη δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.

Πίνακας 5.6. Επίδραση της ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα

	Σιτηρέσιο (Σ)			Ωρα δειγματοληψίας (Ω)			SEM	Χρόνος δειγματοληψίας (X)					Επιδράσεις			Σ*X	Σ*Ω	Ω*X	Σ*Ω*X
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	0	4			0	16	35	51	69	SEM	Σ	Ω				
pH	7,56	7,10	0,092	7,48	7,21	0,093	7,25	7,22	7,29	7,3	7,64	0,1204	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NH ₃	12,50 ^a	19,33 ^b	1,627	18,23	13,60	1,671	15,44	18,13	16,00	15,87	14,13	1,987	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C2 (%)	60,70	62,84	1,345	61,01	62,54	1,365	61,60	61,90	61,92	62,27	61,17	1,354	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C3 (%)	16,14	16,91	0,319	16,41	16,64	0,324	17,05	18,37	15,95	15,13	16,12	0,681	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C4 (%)	19,76	16,66	1,509	18,00	18,41	1,531	18,02	16,25	18,10	19,02	19,64	1,460	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C5 (%)	1,08	1,06	0,037	1,18 ^a	0,96 ^b	0,038	1,03	1,12	1,20	1,00	0,99	0,057	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
iC5 (%)	1,79	1,94	0,082	2,82	0,92 ^a	0,083 ^b	1,63	1,84	2,02	2,01	1,83	0,134	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
														*					
C6 (%)	0,348	0,368	0,05	0,345	0,372	0,053	0,485	0,381	0,452	0,359	0,114	0,055	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
iC6 (%)	0,171	0,199	0,038	0,235	0,135	0,038	0,144	0,149	0,304	0,189	0,140	0,046	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C2/C3	3,84	3,79	0,074	3,79	3,83	0,076	3,74	3,39	3,91	4,14	3,87	0,168	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS

Όσον αφορά το προφίλ των πτητικών λιπαρών οξέων δεν επηρεάστηκε από τη ρίγανη. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αριθμητική τάση μείωσης ($P>0,05$) της εκατοστιαίας αναλογίας του βουτυρικού οξέος και αριθμητική τάση αύξησης ($P>0,05$) της εκατοστιαίας αναλογίας του οξικού οξέος.

Σε *in vitro* μελέτες, προσθήκη καρβακρόλης (Busquet et al., 2006) ή θυμόλης (Castillejos et al., 2006) σε συγκέντρωση 2,2 mg/l και 5 mg/l δεν επηρέασε την παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων του προπιονικού οξέος και την συγκέντρωση της αμμωνίας. Αντιθέτως, η παραγωγή 1-γαλακτικού οξέος μειώθηκε με προσθήκη θυμόλης (180 μg/l) η οποία αναστέλει πλήρως την ανάπτυξη των *Streptococcus bovis* (κύρια πηγή αμυλάσης στην μεγάλη κοιλία και κύριος παραγωγός γαλακτικού οξέος) και *Seimonas ruminantium* (κύρια κατανάλωση γαλακτικού οξέος) τα οποία χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως υπόστρωμα ανάπτυξης (Evans and Martin, 2000). Στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του pH και μείωση της παραγωγής προπιονικού οξέος. Ωστόσο, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις η θυμόλη οδηγεί σε μείωση της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων και γενικά των μικροβιακών ζυμώσεων, ενώ σε μέτριες δόσεις (100-400 mg/l) οδηγεί σε αύξηση του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ. Υψηλές συγκεντρώσεις θυμόλης (500 mg/l) οδηγούν σε μείωση της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων και αμμωνίας σύμφωνα με τους Castillejos et al., (2006). Οι Cardozo et al. (2005b) παρατήρησαν ότι συγκέντρωση 300 mg αιθέριου ελαίου ρίγανης/l, μειώνει την παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων και της αμμωνίας. Αυτό επιβεβαιώθηκε *in vitro* και από τους Busquet et al., (2006) για το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, όπου πολύ υψηλές δόσεις (300-3000 mg/l) αναμφίβολα παρεμποδίζουν τις μικροβιακές ζυμώσεις στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Στην περίπτωση της θυμόλης, όταν το pH έχει τιμή 6,4 αυξάνεται ο λόγος οξικό/προπιονικό οξύ ενώ σε χαμηλότερο pH (5,5) ο λόγος μειώνεται (Castillejos et al., 2006, Cardozo et al., 2005a).

Όσον αφορά σχετικές *in vivo* μελέτες οι οποίες είναι πολύ περιορισμένες σε αριθμό, ο Chaves et al. (2008a) παρατήρησαν τάση μείωσης του pH ($P=0,06$), σημαντική αύξηση στην παραγωγή των ολικών πτητικών λιπαρών οξέων, αλλά καμία μεταβολή στις αναλογίες των παραγόμενων πτητικών λιπαρών οξέων (οξικό, προπιονικό) κατόπιν προσθήκης 0,2 g καρβακρόλης ή κινναμαλδεϋδης σε σιτηρέσια παχυνόμενων αμνών. Οι Villalba et al. (2006), κατόπιν προσθήκης 3,1 g τερπενίων (εμπορικό παρασκεύασμα που περιείχε καμφορά, 1,8-κινεόλη, μεθακρολεΐνη και π-κυμένιο) /αμνό/ημέρα,

παρατήρησαν αύξηση της πεπτικότητας της ξηράς ουσίας, του NDF και του ADF, αύξηση του pH, μείωση στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, μείωση του οξικού και του βουτυρικού οξέος χωρίς να επηρεαστεί η παραγωγή βουτυρικού οξέος. Η αύξηση της πεπτικότητας των προαναφερθέντων κλασμάτων αποδόθηκε στον αυξημένο χρόνο παραμονής της τροφής εντός του πεπτικού συστήματος. Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν από τους ίδιους ερευνητές σε παλαιότερη εργασία (Villalba et al., 2002), όπου παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και του βουτυρικού οξέος, τόσο σε πρόβατα όσο και σε αίγες. Οι Castilejos et al. (2007), παρατήρησαν αύξηση του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ και μείωση των διακλαδισμένων πτητικών λιπαρών οξέων σε πρόβατα, κατόπιν προσθήκης 110 mg (Crina ruminants)/ζώο/ημέρα. Στην συγκεκριμένη εργασία δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην ολική παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων. Οι Tekirpe et al. (2011), κατόπιν χορήγησης 500 g ξηράς δρόγης ρίγανης (*Origanum vulgare L.*)/αγελάδα/ημέρα δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην τιμή του pH και την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων. Όσον αφορά το προφίλ των πτητικών λιπαρών οξέων, παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ. Οι Fandino et al. (2008) παρατήρησαν ότι προσθήκη 500 mg αιθέριου ελαίου πιπεριάς/παχυνόμενο μόσχο δεν επηρέασε την ολική παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων αλλά μόνο τις μεταξύ τους αναλογίες. Έτσι, αυξήθηκε η αναλογία του βουτυρικού οξέος (από 13 σε 14,1 mol/100 mol) εις βάρος της αναλογίας του οξικού οξέος (από 55,3 σε 53,5 mol /100 mol). Στην ίδια εργασία μελέτησαν και την επίδραση του γλυκάνισου στα ζυμωτικά φαινόμενα. Κατόπιν προσθήκης 500 mg αιθέριου ελαίου γλυκάνισου/παχυνόμενο μόσχο παρατήρησαν μείωση στην ολική παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων (από 112,6 σε 110,8 mM), μείωση στην αναλογία του οξικού (από 55,3 σε 53,5 mol /100 mol) και μείωση του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ (από 2,03 σε 1,90).

Από την άλλη πλευρά, οι Ando et al., (2003), δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στο προφίλ των πτητικών λιπαρών οξέων κατόπιν προσθήκης 200 g ξηράς δρόγης του φυτού peppermint (κύρια ένωση ήταν η μενθόλη) σε σιτηρέσια μόσχων. Επίσης, οι Newbold et al. (2004), δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην τιμή του pH, στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και στο προφίλ αυτών, κατόπιν χορήγησης 110 mg αιθέριου ελαίου (Crina ruminants)/πρόβατο/ημέρα. Ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν και από τους Meyer et al. (2009) σε παχυνόμενους μόσχους για το ίδιο εμπορικό σκεύασμα σε δοσολογία 1 g/ημέρα. Επιπλέον, οι Benchaar et al. (2007), αν

και παρατήρησαν αύξηση της τιμής του pH, δεν παρατήρησαν επίδραση στην ολική παραγωγή λιπαρών οξέων και στο προφίλ εντός του υγρού μεγάλης κοιλίας γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, κατόπιν προσθήκης 750 mg Crina ruminants/ζώο/ημέρα.

Όσον αφορά διάφορα άλλα αιθέρια έλαια, οι Chaves et al. (2008b), δεν παρατήρησαν επίδραση στην τιμή του pH, στην συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων και στο προφίλ τους κατόπιν προσθήκης κινναμαλδεΐδης, αιθέριο έλαιο σκόρδου (1,5 % αλλισίνη) και αιθέριο έλαιο μούρων γουνίπερου (35% α -πινένιο) με ύψος δοσολογίας 200 mg/ημέρα/αμνό. Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από τους Yang et al. (2007) για δύο από τα προαναφερθέντα αιθέρια έλαια (5 g αιθέριου ελαίου σκόρδου και 2 g αιθέριου ελαίου μούρων γουνίπερου) σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Επιπλέον, οι Benchaar et al. (2008b) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην τιμή του pH, στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και στο προφίλ αυτών, σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατόπιν προσθήκης 1 g κινναμαλδεΐδης/ημέρα/ζώο.

Σημειώνεται ότι η μείωση του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ συνδέεται με τη μείωση της παραγωγής μεθανίου (Patra, 2011). Στην παρούσα εργασία, ο λόγος οξικό/προπιονικό οξύ παρουσίασε τάση μείωσης στην ομάδα της επέμβασης (μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές) γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι μειώθηκε και η παραγωγή μεθανίου.

Στην παρούσα εργασία, παρόλο που η δοσολογία ήταν σχετικά υψηλή (1 ml ριγανέλαιο/ημέρα/ζώο) δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων. Αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί στην υψηλή τιμή του pH (>7,0) και στην απορρόφηση του αιθέριου ελαίου από τον πεπτικό σωλήνα. Πειραματικά έχει αποδειχθεί σε χοίρους ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη απορροφώνται από τον βλεννογόνο του στομάχου και του λεπτού εντέρου κατά 50 και 66 % αντίστοιχα (Michiels et al., 2011). Αν και η παρατήρηση έχει γίνει σε μονογαστρικά ζώα (δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για μηρυκαστικά), σημαίνει ότι μειώνεται η συγκέντρωση των αιθέριων εντός του πεπτικού συστήματος όπου λαμβάνουν χώρα τα ζυμωτικά φαινόμενα και επομένως και η αποτελεσματικότητά τους.

Σε ότι αφορά την παραγωγή αμμωνίας εντός της μεγάλης κοιλίας επισημαίνεται καταρχήν ότι η αμμωνία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο του μεταβολισμού των μηρυκαστικών ζώων (Huntington and Archibeque, 1999). Τα κυτταρινολυτικά

βακτήρια προτιμούν ή χρειάζονται άζωτο με τη μορφή αμμωνίας προκειμένου να αναπτυχθούν (Russell et al., 1992) και επομένως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μετατροπής των πηγών αζώτου σε αμμωνία και της ζυμωτικότητας των ινωδών ουσιών. Η συγκέντρωση της αμμωνίας εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας ποικίλει και κυμαίνεται μεταξύ 2,4-22,5 mg/100 ml (Slyter et al., 1979) ή 3-45 mM (Gustafsson and Palmquist, 1993). Η συγκέντρωση της αμμωνίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (απαμινώσεις αμινοξέων τροφής, λύση μικροβιακών κυττάρων, απορρόφηση, μικροβιακή πρόσληψη) και για αυτό τον λόγο αποτελεί μια ιδιαίτερα ευμετάβλητη παράμετρο (Hristov et al., 2005).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας ($P > 0,05$). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της καρβακρόλης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, το οποίο ήταν ιδιαίτερα υψηλό (89,0 %). Αυτή είναι αναμφίβολα μια μη επιθυμητή επίδραση στα ζυμωτικά φαινόμενα διότι ευνοεί την απώλεια αζώτου με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης μικροβιακής πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τους Slyter et al. (1979) όταν η συγκέντρωση της αμμωνίας κυμαίνεται από 2-5 mg/100 ml τότε παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη των βακτηρίων και επομένως η σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης μεγιστοποιείται.

Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντιπαράθεση με τις *in vitro* μελέτες. Στην περίπτωση της θυμόλης, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την δράση των απαμινασών (Van Never and Demeyer, 1988). Τα συγκεκριμένα ένζυμα σχετίζονται με την πρωτεόλυση και την απαμίνωση και επομένως με την παραγωγή αμμωνίας εντός της μεγάλης κοιλίας. Σημειώνεται ότι ο Borchers (1965) ήταν ο πρώτος που παρατήρησε ότι η θυμόλη μειώνει την συγκέντρωση της αμμωνίας σε υγρό μεγάλης κοιλίας *in vitro*.

Σε *in vivo* μελέτες υπάρχουν ελάχιστα πειραματικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση των αιθέριων ελαίων στην παραγωγή αμμωνίας.

Οι Tekippe et al. (2011), παρατήρησαν αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας εντός της μεγάλης κοιλίας κατόπιν χορήγησης 500 g ξηράς δρόγης ρίγανης (*Origanum vulgare L.*)/αγελάδα/ημέρα. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές αυτή η αύξηση αποδίδεται στην παρουσία της καρβακρόλης, γεγονός που επιβεβαιώθηκε *in vitro* και από τους Busquet et al. (2005). Σε αυτή τη μελέτη παρατήρησαν επιπλέον μείωση της συγκέντρωσης των μεγάλων πεπτιδίων σε υγρό μεγάλης κοιλίας κατόπιν προσθήκης καρβακρόλης.

Από την άλλη πλευρά, οι Ando et al. (2003) παρατήρησαν μείωση της παραγωγής αμμωνίας κατόπιν προσθήκης 200 g του φυτού peppermint (*MenthaXPiperita*) σε σιτηρέσια μόσχων. Μείωση στη συγκέντρωση της αμμωνίας παρατήρησαν και οι Castilejos et al. (2007) κατόπιν προσθήκης 110 mg (*Crina ruminants*)/ζώο/ημέρα σε πρόβατα. Από την άλλη μεριά, οι Chaves et al. (2008) δεν παρατήρησαν επίδραση στην συγκέντρωση της αμμωνίας όταν σε αμνούς χορηγήθηκαν 0,2 g καρβακρόλης ή κινναμαλδεϋδης. Οι Fandino et al. (2008) παρατήρησαν ότι προσθήκη 500 mg αιθέριου ελαίου γλυκάνισου/παχυνόμενο μόσχο οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της αμμωνίας (από 15,3 σε 13,6 mg/100 mL), ενώ προσθήκη αιθέριου έλαιου πιπεριάς στην ίδια δοσολογία δεν είχε καμία επίδραση.

Ο Newbold et al. (2004) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στη συγκέντρωση της αμμωνίας κατόπιν χορήγησης 110 mg αιθέριου ελαίου (*Crina ruminants*)/πρόβατο/ημέρα. Ακόμη, οι Benchaar et al. (2008b) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στη συγκέντρωση της αμμωνίας σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατόπιν προσθήκης 1 g κινναμαλδεϋδης/ημέρα/ζώο κάτι που επιβεβαιώθηκε και για το εμπορικό παρασκεύασμα *Crina ruminants* σε ποσότητα 750 mg/ημέρα (Benchaar et al., 2007). Επιπλέον, οι Chaves et al. (2008b) δεν παρατήρησαν επίδραση στην συγκέντρωση της αμμωνίας κατόπιν προσθήκης κινναμαλδεϋδης, αιθέριου ελαίου σκόρδου (1,5 % αλλισίνη) και αιθέριο έλαίο μούρων γουνίπερου (35% α -πινένιο) σε μια ημερήσια δοσολογία της τάξεως των 200 mg/ημέρα/αμνό. Τα ίδιο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από τους Yang et al. (2007), για δύο από τα προαναφερθέντα αιθέρια έλαια (5 g αιθέριου ελαίου σκόρδου και 2 g αιθέριου ελαίου προερχόμενο από καρπούς γιουνίπερου) σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες.

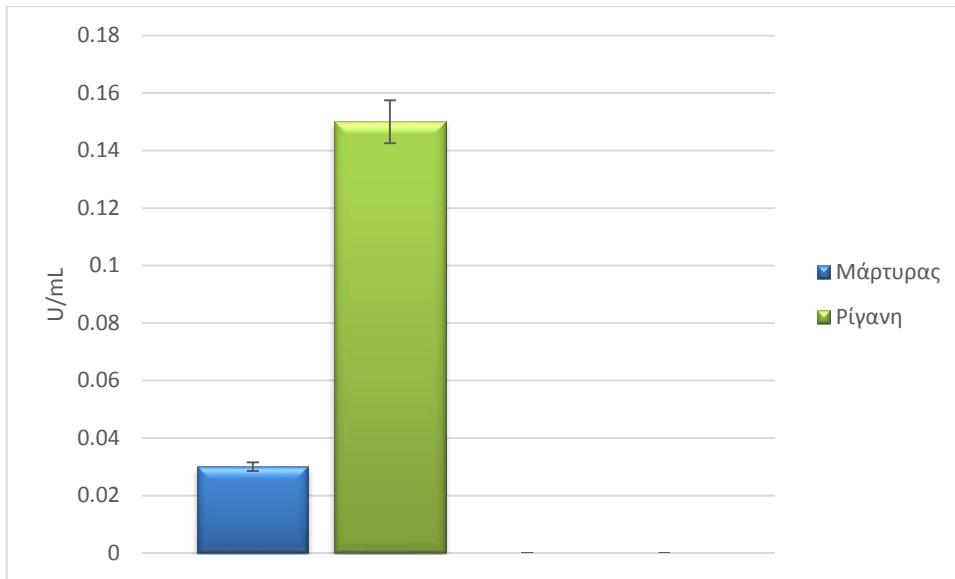
5.3.3. Μικροβιακά ένζυμα στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Στον πίνακα 5.7 παρουσιάζεται η επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα των κυριότερων πεπτικών ενζύμων του υγρού της μεγάλης κοιλίας και συγκεκριμένα στην α -αμυλάση, στην πρωτεάση, στην λιπάση, στην κυτταρινάση και την ξυλανάση. Σημειώνεται ότι τα ένζυμα αυτά είναι μικροβιακής προέλευσης. Στον πίνακα αυτό παρατηρούμε ότι η προσθήκη ρίγανης στο σιτηρέσιο

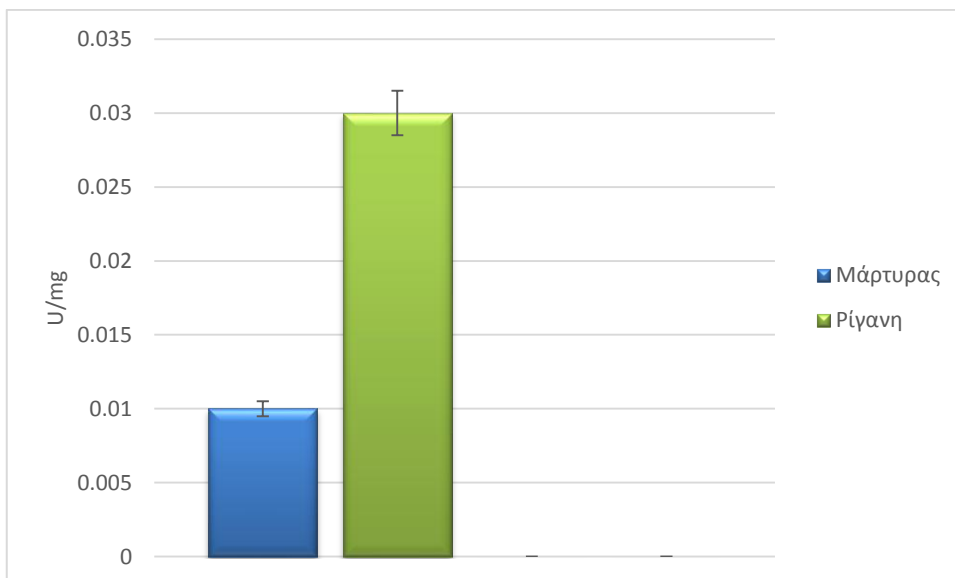
επηρέασε μόνο την δράση της πρωτεάσης ώπου και παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της (διαγράμματα 5.4 και 5.5). Επομένως, η παρατηρούμενη αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας εντός της μεγάλης κοιλίας μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεάσης. Αυτό αποδίδεται στην αύξηση της διάσπασης των πρωτεϊνών αποτέλεσμα την αφθονότερη απελευθέρωση αμινοξέων εντός της μεγάλης κοιλίας και τα οποία στην συνέχεια απαμινώνται. Η χρονική στιγμή της δειγματοληψίας (0 και 4 h ώρες από τη λήψη της τροφής) δεν είχε καμία επίδραση στα πεπτικά ένζυμα.

Πίνακας 5.7 Επίδραση της ρίγανης στο ενζυμικό προφίλ της μεγάλης κοιλίας.

	Σιτηρέσιο (D)			Ωρα (h)			Δειγματοληψία σε ημ.(d)						Επιδράσεις						
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	0	4	SEM	0	16	35	51	69	SEM	D	h	d	Αλληλεπιδράσεις			
α-αμυλάση (U/mL)	13,63	16,70	1,801	13,01	18,31	1,827	19,56	16,96	11,68	14,82	15,30	2,588	NS	NS	NS	D*d	D*h	h*d	D*h*d
α-αμυλάση (U/mg)	2,44	2,86	0,373	2,17	3,13	0,379	2,61	2,88	2,09	2,80	2,86	0,5034	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Πρωτεάση (U/mL)	0,03 ^a	0,15 ^b	0,006	0,09	0,09	0,006	0,08	0,10	0,08	0,08	0,12	0,0764	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Πρωτεάση (U/mg)	0,01 ^a	0,03 ^b	0,001	0,02	0,02	0,001	0,11	0,16	0,14	0,14	0,23	0,0022	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Λιπάση (U/mL)	33,93	29,56	5,67	41,37	22,12	5,753	25,92	43,42	23,74	28,54	37,10	7,1314	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Λιπάση (U/mg)	5,66	4,97	0,9985	6,94	3,69	1,013	3,58	6,64	4,29	5,16	6,89	1,160	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Κυτταρινάση (U/mL)	8,78	9,40	1,258	10,12	8,05	1,277	7,81	11,90	9,77	9,04	6,89	1,524	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Κυτταρινάση (U/mg)	1,59	1,65	0,215	1,65	1,60	0,218	1,09	1,97	1,65	1,64	1,76	0,250	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ξυλανάση (U/mL)	5,83	7,29	0,420	7,02	6,10	0,422	8,52	5,38	6,47	6,72	5,70	0,879	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ξυλανάση (U/mg)	1,00	1,23	0,069	1,17	1,05	0,069	1,17	0,89	1,15	1,23	1,12	0,158	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS



Διάγραμμα 5.4. Επίδραση της ρίγανης στην πρωτεάση εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας (U/mL).



Διάγραμμα 5.5. Επίδραση της ρίγανης στην πρωτεάση εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας (U/mg).

Η ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεάσης στην παρούσα εργασία ήταν 0,03 και 0,15 U/ml στην ομάδα του μάρτυρα και στην ομάδα της επέμβασης αντίστοιχα, γεγονός που αιτιολογεί την αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας στην ομάδα της διατροφικής επέμβασης. Οι τιμές αυτές είναι συγκρίσιμες με την ενζυμική δραστηριότητα της τάξεως των 0,042 U/ml υγρού μεγάλης κοιλίας, όπως προσδιορίστηκε από τους Luchini et al. (1996). Ωστόσο, υψηλότερες ενζυμικές δραστηριότητες έχουν αναφερθεί από τους Santra et al. (2007) σε πρόβατα (4,42-4,29 U/ml υγρού μεγάλης κοιλίας) και από τους Liu et al. (2014) σε παχυνόμενους μόσχους της φυλής Simmental (2,65 U/ml υγρού μεγάλης κοιλίας). Θεωρώντας ως δεδομένο ότι η πρωτεάση στο συγκεκριμένο τμήμα του πεπτικού συστήματος είναι μικροβιακής και όχι ενδογενούς προέλευσης, η επίδραση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε μεταβολές των μικροβιακών πληθυσμών οι οποίες προκλήθηκαν από το αιθέριο έλαιο της ρίγανης.

Στην παγκόσμια βιβλιογραφία δεν υπάρχει ομοφωνία όσον αφορά την επίδραση και το μηχανισμό δράσης των αιθέριων ελαίων στα μικροβιακά ένζυμα της μεγάλης κοιλίας. Σύμφωνα με τους Patra and Saxena (2010), το αιθέριο έλαιο του γαρύφαλλου και του μάραθου μειώνει τη δραστηριότητα της κυτταρινάσης και της ξυλανάσης στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.

Ο Soltan (2009) παρατήρησε αύξηση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών σε δοσολογίες της τάξεως των 94-281 mg (μείγμα αιθέριου ελαίου ευκαλύπτου, μέντας και μενθόλης)/λίτρο πόσιμου νερού σε παχυνόμενους μόσχους. Σύμφωνα με τον ίδιο ερευνητή αυτό αποδίδεται στην αύξηση της έκκρισης πεπτικών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα παρατήρησε μείωση των περιστατικών διάρροιας κατά 4 %.

Ο Newbold et al. (2004) όμως δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην πρωτεϊνολυτική και πεπτιδολυτική δραστηριότητα του υγρού μεγάλης κοιλίας προβάτων κατόπιν προσθήκης 110 mg του εμπορικού παρασκευάσματος Crina ruminants/ημέρα/ζώο. Οι Molero et al. (2004) παρατήρησαν τάση μείωσης της πρωτεϊνολυτικής δραστηριότητας εντός της μεγάλης κοιλίας σε μοσχίδες κατόπιν προσθήκης 700 mg Crina ruminants/ζώο/ημέρα.

5.3.4. Μικροβιακοί πληθυσμοί στο υγρό της μεγάλης κοιλίας και παραγωγή μεθανίου

Στον πίνακα 5.8 παρουσιάζεται η επίδραση της ρίγανης στους κυριότερους μικροβιακούς πληθυσμούς της μεγάλης κοιλίας συμπεριλαμβανομένων των πρωτοζώων, των μυκήτων και των μεθανοβακτηρίων. Από τον πίνακα αυτό παρατηρούμε ότι η ρίγανη επηρέασε τα ολικά μεθανοβακτήρια και συγκεκριμένα οδήγησε σε μείωση ($P < 0,05$). Ωστόσο, εκ των δύο μελετηθέντων μεθανοβακτηρίων (*Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosphaera stadtmanae*) μόνο το *Methanosphaera stadtmanae* επηρεάστηκε αρνητικά ($P < 0,05$) από τον διατροφικό χειρισμό. Επιπλέον, το *Clostridium sticklandii* ανιχνεύτηκε μόνο στην ομάδα του μάρτυρα (μέση τιμή 0,0049) και επομένως μπορεί να ειπωθεί ότι η ρίγανη οδήγησε στην εξάλειψη του συγκεκριμένου βακτηριακού είδους. Τα μεθανοβακτήρια αποτελούν μια ειδική κατηγορία βακτηρίων (Archaea) τα οποία παράγουν μεθάνιο υπο αναερόβιες συνθήκες, ενώ ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες (Ohene-Adjei, 2008): στην τάξη των *Methanosarcinales* η οποία περιλαμβάνει τα μεθανοβακτήρια τα οποία περιέχουν κυτοχρώματα και μπορούν να παράγουν μεθάνιο χρησιμοποιώντας μεθανόλη, οξικό οξύ, CO_2 , H_2 . Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα μεθανοβακτήρια που στερούνται κυτοχρωμάτων, περιλαμβάνει τις τάξεις *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* και αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ και/ή μυρμηγκικό οξύ.

Πίνακας 5.8. Μικροβιακοί πληθυσμοί, 4 ώρες μετά την λήψη τροφής.

	Στηρήσιο (Σ)			Χρονική στιγμή δειγματοληψίας σε ημ. (X)					Επιδράσεις			Σ*X
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	0	16	35	51	69	SEM	Σ	X	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,010	0,012	0,004	0,005	0,010	0,016	0,014	0,011	0,0038	NS	NS	NS
<i>Bythirivibrio fibrisolvens</i> (X10 ⁻⁵)	0,034	0,037	0,014	0,086	0,015	0,038	0,026	0,012	0,014	NS	NS	NS
<i>Ruminococcus albus</i> (X10 ⁻³)	0,014	0,013	0,003	0,022	0,007	0,024	0,007	0,008	0,0042	NS	NS	NS
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (X10 ⁻³)	0,055	0,071	0,017	0,049	0,093	0,063	0,058	0,052	0,0196	NS	NS	NS
<i>Protozoa</i>	0,019	0,023	0,004	0,038 ^a	0,002 ^b	0,037 ^{ab}	0,011 ^{ab}	0,018 ^{ab}	0,0066	NS	*	NS
<i>Fungi</i> (X10 ⁻²)	0,030	0,034	0,005	0,034	0,029	0,028	0,031	0,039	0,0076	NS	NS	NS
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (X10 ⁻⁴)	0,054	0,019	0,012	0,088	0,003	0,035	0,041	0,018	0,0112	NS	NS	NS
<i>Methanogen</i>	0,050 ^a	0,023 ^b	0,005	0,057	0,020	0,038	0,026	0,042	0,007	*	NS	NS
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> (X10 ⁻³)	0,004	0,003	0,001	0,007	0,005	0,002	0,003	0,002	0,0026	NS	NS	NS
<i>Methanospaera stadtmanae</i>	0,198 ^a	0,072 ^b	0,029	0,175	0,023	0,120	0,231	0,128	0,032	*	NS	NS

Το μεθανοβακτήριο *Methanosphaera stadtmanae* είναι το μόνο μέλος της τάξης των *Methanobacteriales* το οποίο παράγει μεθάνιο μέσω αναγωγής της μεθανολής με H_2 (Ohene-Adjei, 2008). Επομένως, εξαρτάται από το οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα και χαρακτηρίζεται, από μεταβολικής άποψης, ως το πιο ενεργειακά περιορισμένο εξ όλων των μεθανοβακτηρίων (Fricke et al., 2006). Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη πολλά είδη άγνωστων μεθανοβακτηρίων (Boadi et al., 2004). Σημειώνεται ότι το μεθάνιο δεν έχει καμία διαιτητική αξία για το μηρυκαστικό ζώο ενώ μέσω του μεθανίου αποβάλλεται το 2-12 % της συνόλης ενέργειας του σιτηρεσίου (Johnson and Johnson, 1995). Ωστόσο, η παραγωγή μεθανίου είναι απαραίτητη προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι αποδόσεις των μηρυκαστικών ζώων γιατί απομακρύνεται το H_2 , το οποίο αν παρέμενε θα παρεμποδίζε τις αντιδράσεις των αφυδρογονώσεων ($NADH$, $NADPH$, $FADH$ σε NAD^+ , $NADP^+$, FAD^+) δεδομένου ότι οι ζυμώσεις αποτελούν οξειδωτικές βιοχημικές διαδικασίες (Martin et al., 2009). Ο ρόλος των μεθανοβακτηρίων στη μεγάλη κοιλία είναι πολύ σημαντικός και αυτό γιατί διατηρούν χαμηλή την μερική πίεση του H_2 γεγονός που ευνοεί την μεγιστοποίηση της ροής άνθρακα προς την παραγωγή οξειδωμένων πτητικών λιπαρών οξέων (Wolin and Miller, 1988). Σύμφωνα με τους Demeyer and Fievez (2000), η παραγωγή μεθανίου συσχετίζεται θετικά με την παραγωγή οξικού και βουτυρικού οξέος και αρνητικά με την παραγωγή προπιονικού οξέος. Επίσης, σημειώνεται ότι όταν μειώνεται η παραγωγή μεθανίου τότε αυξάνεται η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος (Demeyer and Van Never, 1975) ενώ γενικά υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ ολικών πτητικών λιπαρών οξέων και μεθανίου (Wang et al., 2009).

Ωστόσο τα μεθανοβακτήρια ανταγωνίζονται τα βακτήρια παραγωγής οξικού οξέος (χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας H_2 για αναγωγή CO_2 σε οξικό οξύ) εντός της μεγάλης κοιλίας. Έτσι, μείωση της μεθανογένεσης οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής οξικού οξέος με αποτέλεσμα να βελτιώνονται οι αποδόσεις του ζώου (Buddle et al., 2010).

Η παρουσία πρωτοζώων αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα απώλειας πρωτεΐνης εντός της μεγάλης κοιλίας (Greathead, 2003). Αυτό οφείλεται στο ότι τα πρωτόζωα διατρέφονται εκτεταμένα από τα βακτήρια (φαινόμενο εγκόλπωσης), ανακυκλώνοντας με αυτό τον τρόπο τη μικροβιακή πρωτεΐνη εντός της μεγάλης κοιλίας (Firkins, 1996). Από την άλλη μεριά, θεωρείται σημαντική η συνεισφορά τους στην αποδόμηση των ινωδών ουσιών και στη διατήρηση σταθερού pH εντός της

μεγάλης κοιλίας (Greathead, 2003), ιδιαίτερα σε σιτηρέσια πλούσια σε άμυλο τα οποία προκαλούν απότομη πτώση του pH (Nagajara et al., 1992). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα πρωτόζωα αν και μεταβολίζουν βραδέως το άμυλο (σε σύγκριση με τα βακτήρια), ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ. Μελέτες στις οποίες έγινε πλήρης εξάλειψη της συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση των αποδόσεων ακριβώς λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν στο μηρυκαστικό ζώο (Jouany, 1996). Επιπλέον, τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των πρωτοζώων είναι κυρίως οξικό και βουτυρικό οξύ (Russell and Hespell, 1981) ενώ συμβάλλουν στην αύξηση της συγκέντρωσης αμμωνίας όταν το μηρυκαστικό ζώο διατρέφεται με ελλειμματικά σε άζωτο σιτηρέσια (Hegarty et al., 1994). Έτσι, συνιστάται να μην γίνεται πλήρη εξάλειψη των πρωτοζώων εντός των ζυμωτικών χώρων έτσι ώστε να βελτιωθεί η αξιοποίηση του αζώτου και μέσω αυτής οι αποδόσεις. Μεταξύ μεθανοβακτηρίων και πρωτοζώων υπάρχει συσχέτιση (φαινόμενο συμβίωσης) η οποία επιτρέπει τη γρήγορη διάχυση H₂ και την ταχεία παραγωγή οξικού οξέος από τα πρωτόζωα (Stum and Zwart, 1986). Έτσι, απαντώνται μεθανοβακτήρια προσκολλημένα στα πρωτόζωα ή βρίσκονται στο εσωτερικό τους ενώ εκτιμάται ότι συνεισφέρουν κατά 9% και 37% στην παραγωγή μεθανίου εντός της μεγάλης κοιλίας (Finlay et al., 1994, Newbold et al., 1995). Επομένως, όταν μειώνεται ο αριθμός των πρωτοζώων τότε μειώνεται και ο αριθμός των μεθανοβακτηρίων. Έτσι, έμμεσα μπορεί να εκτιμηθεί εάν επηρεάζεται η παραγωγή μεθανίου. Αν και στην παρούσα μελέτη τα πρωτόζωα δεν επηρεάστηκαν από την ρίγανη, ωστόσο μπορεί να διατυπωθεί ότι μειώθηκε η παραγωγή μεθανίου μέσω μείωσης των πληθυσμών των ολικών μεθανοβακτηρίων. Στην παγκόσμια βιβλιογραφία, δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την επίδραση των αιθερίων ελαίων στην παραγωγή μεθανίου και στους πληθυσμούς των πρωτοζώων.

In vitro, οι Evans and Martin (2000) παρατήρησαν μείωση στην παραγωγή μεθανίου κατόπιν προσθήκης θυμόλης.

In vivo, οι Ando et al. (2003) παρατήρησαν μείωση του αριθμού των πρωτοζώων κατόπιν προσθήκης 200 g του φυτού peppermint (*MenthaXPiperita*) σε σιτηρέσια μόσχων. Επίσης, οι Fandino et al. (2008), παρατήρησαν ότι προσθήκη 500 mg αιθέριου ελαίου γλυκάνισου/παχυνόμενο μόσχο μειώνει τον ολικό αριθμό πρωτοζώων εντός της μεγάλης κοιλίας. Ωστόσο το αιθέριο έλαιο της πιπεριάς στην ίδια δοσολογία δεν είχε καμία επίδραση.

Οι Tekirpe et al. (2011) παρατήρησαν μείωση στην παραγωγή μεθανίου (-40%) αλλά όχι και του αριθμού των πρωτοζώων κατόπιν χορήγησης 500 g ξηράς δρόγης ρίγανης (*Origanum vulgare L.*)/ημέρα σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Από την άλλη πλευρά οι Newbold et al. (2004) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στον ολικό αριθμό πρωτοζώων κατόπιν χορήγησης 110 mg αιθέριου ελαίου (*Crina ruminants*)/πρόβατο/ημέρα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατόπιν προσθήκης 1 g κινναμαλδεύδης/ημέρα/ζώο γεγονός που αποδόθηκε στην χαμηλή δοσολογία (Benchaar et al., 2008b). Επίσης, οι Wang et al. (2009), πρόσθεσαν 250 mg ξηράς δρόγης ρίγανης/ημέρα και 2 εμβδομάδες στα σιτηρέσια προβάτων και παρατήρησαν μείωση στην παραγωγή μεθανίου κατά 17,4%.

Οι Tekirpe et al. (2011) κατόπιν χορήγησης 500 g ξηράς δρόγης ρίγανης (*Origanum vulgare L.*)/αγελάδα/ημέρα δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στον ολικό αριθμό πρωτοζώων εντός της μεγάλης κοιλίας. Επίσης, δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στον ολικό αριθμό μυκήτων (όπου τα είδη του γένους *Neocallimastix ssp.* ήταν κυρίαρχα), στον ολικό αριθμό βακτηρίων και στα είδη *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, στους πληθυσμούς των μεθανοβακτηρίων (συπεριλαμβανομένων των *Methanobrevibacter spp.*, και *Methanobacteriaceae*) ενώ παρατήρησαν αύξηση των κλωστρίδιων. Επίσης, οι Beauchemin and McGinn (2006) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην παραγωγή μεθανίου όταν προστέθηκε 1 g *Crina ruminants*/ημέρα και για 21 ημέρες σε σιτηρέσια μοσχιδών.

Οι Ohene-Adjei et al. (2008) παρατήρησαν ότι η προσθήκη 0,02 g κινναμαλδεύδης/kg μείγματος ΣΖ για 90 ημέρες δεν επηρέασε τον ολικό αριθμό πρωτοζώων σε πρόβατα. Όμως παρατήρησαν μείωση της ανάπτυξης του *Methanobrevibacter ruminantium* και αύξηση των *Methanosphaera stadtmanae* και *M.smithii*. Μάλιστα, πρότειναν ότι οι προαναφερθείσες αλλαγές αποδίδονται σε αλλαγές που προκάλεσε το αιθέριο έλαιο στους πληθυσμούς των πρωτοζώων. Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν και για το αιθέριο έλαιο γιουνίπερου στην ίδια δοσολογία, το οποίο προκάλεσε μείωση της ανάπτυξης του *Methanobrevibacter ruminantium* μόνο.

Η ασυμφωνία της βιβλιογραφίας στην επίδραση των αιθέριων ελαίων θα μπορούσε να οφείλεται στις διαφορετικές δοσολογίες που εφαρμόστηκαν καθώς επίσης και στα

διαφορετικά αιθέρια έλαια. Έτσι, το είδος του αιθέριου ελαίου φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή μεθανίου (Patra and Saxena, 2010).

Όσον αφορά τα βακτήρια που παράγουν αμμωνία εντός της μεγάλης κοιλίας, σύμφωνα με τον Wallace (1996), χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε εκείνα που απαντώνται σε μεγάλους αριθμούς ($>10^9$ /ml υγρού μ.κοιλίας) αλλά χαμηλής δραστηριότητας (10-20 mmol NH_3 /min/mg πρωτεΐνης) και περιλαμβάνει τα είδη *B.fibrisolvens*, *M. Elsdinii*, *P.ruminicola*, *S.ruminantium*, *S.bovis* και σε εκείνα που απαντώνται σε μικρούς αριθμούς (10^7 /ml υγρού μ.κοιλίας) αλλά χαρακτηρίζονται από υψηλή δραστηριότητα (300 mmol NH_3 /min/ mg πρωτεΐνης) και περιλαμβάνει τα είδη *Clostridium aminophilum*, *Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius*. Έτσι, τα βακτήρια υπερπαραγωγής αμμωνίας αποτελούνται από έναν περιορισμένο αριθμό βακτηριακών ειδών εντός της μεγάλης κοιλίας τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή αμμωνίας (Hart et al., 2008; Russell et al., 1991). Υπολογίζεται ότι το 50 % των απαμινώσεων οφείλεται στη συγκεκριμένη κατηγορία βακτηρίων (Russell et al., 1991). Στην παρούσα εργασία το βακτήριο *Peptostreptococcus anaerobius* δεν επηρεάστηκε από το διατροφικό χειρισμό, αλλά το *Clostridium sticklandii* εξαλείφθηκε στα ζώα που κατανάλωσαν ρίγανη. Η θυμόλη και η καρβακρόλη χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δράση τόσο σε gram+ όσο και gram- βακτήρια, γεγονός που μειώνει την δυνατότητα επιλεκτικότητας συγκεκριμένων μικροοργανισμών και την τροποποίηση των ζυμωτικών φαινομένων εντός της μεγάλης κοιλίας (Calsamiglia et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Για παράδειγμα, ο *Streptococcus bovis* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός, ενώ τα *Prevotella ruminicola*, *Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius* είναι πολύ ευαίσθητα σε αιθέριο έλαιο που περιέχει θυμόλη, ευγενόλη, βανιλίνη και λεμονένιο (McIntosh et al., 2003). Ωστόσο στην παρούσα μελέτη το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου της ρίγανης ήταν η καρβακρόλη (89,0 %) ενώ η θυμόλη βρέθηκε σε πολύ χαμηλότερη αναλογία (0,13%).

Στα κυτταρινολυτικά βακτήρια υπάγονται τα είδη: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Eubacterium ruminantium* (Stewart et al., 1997). Από ποσοτικής πλευράς, κυριαρχούν τρία είδη: το *F.succinogens*, το *R.flavefaciens* και το *R.albus*, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 33,0%, 2,6% και 46,0% των ολικών κυτταρινολυτικών βακτηρίων αντίστοιχα (Varel and Dehority,

1989). Το *Butyrivibrio fibrisolvens* είναι ένα gram- βακτήριο που παράγει σημαντικές ποσότητες βουτυρικού οξέος εντός της μεγάλης κοιλίας (Bryant and Small, 1956). Επίσης, σχετίζεται με την παραγωγή CLA και βασσενικού οξέος (Durmic et al., 2008). Το *Fibrobacter succinogenes* είναι επίσης ένα κυτταρινολυτικό βακτήριο της μεγάλης κοιλίας (Fandino et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη δεν επηρεάστηκε κανένα εκ των κυτταρινολυτικών βακτηρίων, παρατήρηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με τους Benchaar et al. (2007). Αυτό συνεπάγεται ότι δεν επηρεάστηκε η αποδόμηση των ινωδών ουσιών. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στον ολικό αριθμό βακτηρίων και πρωτοζώων καθώς επίσης και στον αριθμό των κυτταρινολυτικών βακτηρίων εντός του υγρού της μεγάλης κοιλίας γαλακτοπαραγωγών αγελάδων κατόπιν προσθήκης 750 mg Crina ruminants/ζώο/ημέρα.

5.5. Συμπεράσματα

- Η προσθήκη ρίγανης στο σιτηρέσιο αιγών δεν είχε καμία επίδραση στο σωματικό βάρος και στο προφίλ των παραγόμενων πτητικών λιπαρών οξέων εντός της μεγάλης κοιλίας. Η μόνη επίδραση ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας, γεγονός που μειώνει τη χρησιμοποίηση του αζώτου από τους μικροοργανισμούς και κατ' επέκταση τη σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης.
- Εκ των μικροβιακών ενζύμων επηρεάστηκε μόνο η πρωτεάση και μάλιστα θετικά.
- Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των ολικών μεθανοβακτηρίων και επομένως η παραγωγή μεθανίου. Όσον αφορά τα επιμέρους μεθανοβακτήρια, επηρεάστηκε αρνητικά μόνο το *Methanosphaera stadtmanae*. Επιπλέον, η ρίγανη οδήγησε στην εξάλειψη του βακτηρίου *Clostridium sticklandii*.

Κεφάλαιο 6. Πείραμα γαλακτοπαραγωγής

6.1.Εισαγωγή

Στην σημερινή εποχή παρατηρείται ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για εξεύρεση εναλλακτικών φυσικών προϊόντων για τη βελτίωση των αποδόσεων και της ποιότητας των ζωικών προϊόντων (Yanishlieva et al., 2006). Τα αρωματικά φυτά αποτελούν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση αφού τα αιθέρια έλαια θεωρούνται ως γενικά ασφαλείς φυσικές ενώσεις. Επιπλέον, η χρήση αρωματικών φυτών και κυρίως, η ρίγανη μπορούν να ενισχύσουν τα ζωικά προϊόντα και να τα μετατρέψουν σε λειτουργικά τρόφιμα (Kintzios, 2002). Αυτό αποδίδεται στις πολυάριθμες ιδιότητες των αιθέριων ελαίων πχ. αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές κ.α. οι οποίες μεταφέρονται στα ζωικά προϊόντα κατόπιν απορρόφησης τους από το πεπτικό σύστημα του ζώου (Bakkali et al., 2008).

Κατά την τελευταία δεκαετία παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση των ερευνητικών εργασιών που μελετούν την επίδραση της προσθήκης αιθέριων ελαίων στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων στις αποδόσεις και την ποιότητα των κτηνοτροφικών προϊόντων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός ερευνητικών εργασιών που αφορούν την επίδραση των αιθέριων ελαίων στο ύψος γαλακτοπαραγωγής και την ποιότητα του γάλακτος (Ando et al., 2003; Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004; Offen 2005, Benchaar et al., 2006, Kung et al., 2008, Benchaar et al., 2007; Yang et al., 2007; Spangero et al 2009; Tassoul and Shaver 2009; Santos et al., 2010; Tekippe et al., 2011). Επιπλέον, υπάρχει ένας ακόμη μικρότερος αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν τα μικρά μηρυκαστικά (Simitzis et al., 2007; Giannenas et al., 2011), ενώ σε ελάχιστες εργασίες έχει χρησιμοποιηθεί ξηρά δρόγη. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση των αιγών υπάρχει μόνο μία δημοσίευση (Malecky et al., 2009).

Στον παρόν πείραμα, επιλέχθηκε η ελληνική ρίγανη για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Επιπλέον, επιλέχθηκε ως δοσολογία η ημερήσια δόση του 1 ml

αιθέριου ελαίου/αίγα με τη μορφή ξηράς δρόγης. Η δοσολογία αυτή θα μπορούσε να θεωρηθεί σχετικά υψηλή, αφού σε in vivo μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων, από 50 mg/kg (Giannenas et al., 2011) έως και 1 ml/kg μείγματος ΣΖ σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες (Simitzis et al., 2007). Επίσης, οι Malecky et al. (2009) εφάρμοσαν συγκεντρώσεις της τάξεως των 43 mg και 430 mg/kg προσληφθείσας ξηράς ουσίας σε αίγες γαλακτοπαραγωγής. Παρόμοιες καθώς και υψηλότερες δόσεις έχουν εφαρμοστεί σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και οι οποίες κυμαίνονται από 320 mg/ζώο/ημέρα (Spanghero et al., 2009) μέχρι και 5 g/ζώο/ημέρα (Yang et al., 2007). Η ημερήσια δόση του 1 ml/αίγα επιλέχθηκε επειδή σε ορισμένες in vivo μελέτες έχει παρατηρηθεί μια θετική επίδραση στην ποιότητα του γάλακτος μικρών μηρυκαστικών. Οι Simitzis et al. (2007) ανέφεραν μια αύξηση στην πρωτεΐνη του γάλακτος προβατινών όταν εφαρμόστηκε ημερήσια δόση 1 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης/kg μείγματος ΣΖ. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί από τους Offen et al., (2005) σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες.

Ο στόχος του παρόντος πειράματος ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της προσθήκης στο σιτηρέσιο του αιθέριου ελαίου ρίγανης στο ύψος γαλακτοπαραγωγής και την ποιότητα του γάλακτος (συμπεριλαμβανομένων του προφίλ των λιπαρών οξέων, των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας), όταν προστίθενται με τη μορφή αποξηραμένου φυτού στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών αιγών.

6.2.Υλικά και μέθοδοι

6.2.1. Προετοιμασία της ξηράς δρόγης και η ενσωμάτωσή της στο μείγμα ΣΖ

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα φυτά ρίγανης τα οποία μετά από άλεση αναμείχθηκαν στο μείγμα ΣΖ ανά 15 ημέρες.

6.2.2. Αίγες, σταβλισμός και διατροφικές επεμβάσεις

Το πείραμα διεξήχθη σε συμφωνία με τις κατευθυντήριες γραμμές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σχετικά με τη φροντίδα και τη χρήση των παραγωγικών ζώων και κατ' επέκταση της κατάλληλης διαχείρισης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η άσκοπη καταπόνηση των ζώων. Δώδεκα υγιείς αίγες φυλής Alpine χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πείραμα γαλακτοπαραγωγής και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, με αρχικό μέσο σωματικό βάρος 50.25 ± 3.20 kg (ομάδα μάρτυρα, n=6) και 48.83 ± 2.95 kg (ομάδα επέμβασης, n=6).



Φωτογραφία 4. Αίγα του 2^{ου} πειράματος.

Τα ζώα διατράφηκαν με σανό μηδικής (600 g) και μείγματος ΣΖ (βασικό μείγμα και μείγμα γαλακτοπαραγωγής). Όλα τα ζώα κατανάλωναν 600 g μείγματος γαλακτοπαραγωγής/ημ ενώ το βασικό μείγμα χορηγήθηκε σε διαφορετικές ποσότητες (400-950 g/ ημ) με σκοπό την ισορροπη κάλυψη των αναγκών κάθε αίγας ατομικά (σωματικό βάρος, ύψος γαλακτοπαραγωγής). Οι δύο ομάδες κατανάλωσαν τα ίδια σιτηρέσια με μόνη διαφορά ότι στην ομάδα της επέμβασης προστέθηκαν 20 g αλεσμένης ξηράς δρόγης ρίγανης στο μείγμα

γαλακτοπαραγωγής, το οποίο χορηγήθηκε σε σταθερή ποσότητα για όλες τις αίγες όπως προαναφέρθηκε, ώστε να επιτευχθεί μια δοσολογία 1 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης/αίγα/ημέρα. Όλα τα ζώα είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε καθαρό νερό καθ' όλη την πειραματική περίοδο. Η χημική σύσταση του βασικού μείγματος και του μείγματος γαλακτοπαραγωγής παρουσιάζονται στους πίνακες 6.1 και 6.2 αντίστοιχα. Στον πίνακα 6.3 παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του σανού μηδικής, του βασικού μείγματος καθώς επίσης και του μείγματος γαλακτοπαραγωγής.

Πίνακας 6.1. Συστατικά και χημική σύσταση βασικού μείγματος.

	% (w/w)
<u>Συστατικό</u>	
Αραβόσιτος	52,0
Κριθή	13,5
Πίτυρα σίτου	20,0
Βαμβακοπλακούντας	10,0
CaCO ₃	2,0
Φωσφορικό διασβέστιο	1,5
NaCl	0,5
Ισορροπιστής*	0,5
<u>Χημική σύσταση</u>	
ΚΕΓ	7 MJ/kg
Υγρασία	12,0
Ολικές αζωτούχες ουσίες	11,5
Ολικές λιπαρές ουσίες	3,5
Ολικές ινώδεις ουσίες	6,5
Τέφρα	6,5
Ασβέστιο	1,2
Φωσφόρος	0,9
NaCl	0,5
Ισοροπιστής*	0,5

*Περιέχει 10000 IU βιτ.Α., 2000 IU βιτ. D₃, 15 mg βιτ. E.

Πίνακας 6.2. Συστατικά και χημική σύσταση μείγματος γαλακτοπαραγωγής.

	% (w/w)
<u>Συστατικό</u>	
Αραβόσιτος	54,5
Σογάλευρο	22,0
Πίτυρα σίτου	20,0

CaCO ₃	2,0
Φωσφορικό διασβέστιο	0,5
NaCl	0,5
Ισορροπιστής*	0,5

Χημική σύσταση

ΚΕΓ	7 MJ/kg
Υγρασία	12,0
Ολικές αζωτούχες ουσίες	17,2
Ολικές λιπαρές ουσίες	3,5
Ολικές ινώδεις ουσίες	4,8
Τέφρα	6,5
ΕΝΕΟ	56,0
Ασβέστιο	1,2
Φωσφόρος	0,9
NaCl	0,5

*Περιέχει 10000 IU βιτ. Α., 2000 IU βιτ. D₃, 15 mg βιτ. Ε.

Πίνακας 6.3. Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων w/w) του σανού μηδικής, του βασικού μείγματος και του μείγματος γαλακτοπαραγωγής.

Λιπαρό οξύ	Μείγμα γαλακτοπαραγωγής	Βασικό μείγμα	Σανός μηδικής
C16:0	15,01	16,35	30,18
C18:0	1,99	2,13	4,42
C18:1cis	25,07	26,56	8,74
C18:2trans	0,73	0,5	nd
C18:2cis	54,29	53,95	24,34
C18:3n6	2,92	nd	2,27
C18:3n3	nd	0,51	30,05

6.2.3. Μετρήσεις

6.2.3.1. Σωματικό βάρος

Το σωματικό βάρος κάθε αίγας καταγράφηκε πριν την έναρξη της πειραματικής περιόδου ενώ στην συνέχεια η καταγραφή γινόταν σε εβδομαδιαία βάση.

6.2.3.2. Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος

Το ύψος γαλακτοπαραγωγής κάθε αίγας ατομικά καταγράφηκε σε εβδομαδιαία βάση (4 συνολικά δειγματοληψίες). Η άμελξη των αιγών γινόταν δύο φορές την ημέρα, στις 7:00 και 17:00 καθ' όλη την πειραματική περίοδο. Τα δείγματα γάλακτος στην συνέχεια αναλύθηκαν σε συσκευή Milkoscan (133/Foss Electric, Hillerod, Denmark) με εγγύς υπέρυθρη φασματομετρία για πρωτεΐνη, λίπος και λακτόζη.

Προκειμένου να εκτιμηθεί το προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα, αρχικά έγινε απομόνωση του λίπους του γάλακτος σύμφωνα με την μεθοδολογία όπως περιγράφεται από τους Kelly et al. (1998). Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν σε αέριο χρωματογράφο Agilent εφοδιασμένο με την τριχοειδή στήλη 60mX0,25mm i.d. HP-88 (Agilent Co., USA) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Ως αέριο φορέας χρησιμοποιήθηκε το ήλιο και η ποσοτικοποίηση των πτητικών λιπαρών οξέων έγινε με το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) C17:0.

6.2.3.3. Αντιοξειδωτικά ένζυμα και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος

Ατομικά δείγματα γάλακτος ελήφθησαν κατά την τρίτη και τέταρτη εβδομάδα της πειραματικής περιόδου και αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Το γάλα δεν υποβλήθηκε σε παστερίωση. Στα δείγματα εκτιμήθηκε η δραστηριότητα πέντε ενζύμων (συγκεκριμένα: δεσμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και λακτουπεροξειδάση) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος. Πριν από την ανάλυση στο εργαστήριο, τα δείγματα γάλακτος φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 30 λεπτά στους 4°C προκειμένου να απομακρυνθεί το λίπος του γάλακτος. Η ενζυμική δραστηριότητα της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους McCord και Fridovich (1969), της καταλάσης με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Beers και Sizer (1952), της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Wendel (1980), της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Mavis και Stellwagen (1968) και της λακτουπεροξειδάσης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Keeseey (1987). Η συνολική πρωτεΐνη του γάλακτος

προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως U/ml και U/mg πρωτεΐνης. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP όπως περιγράφεται από τους Smet et al. (2008) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές FRAP (Fe^{+2} $\mu\text{mol/ml}$ γάλακτος). Πριν από τη μέτρηση της απορρόφησης εφαρμόστηκε μια σύντομη φυγοκέντρηση (5minX1300g) η οποία είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαυγούς διαλύματος.

6.2.3.4. Μετρήσεις παραμέτρων αίματος

Δείγματα αίματος ελήφθησαν κατά τις δύο τελευταίες εβδομάδες της πειραματικής περιόδου από την σφαγίτιδα φλέβα με φλεβοκέντηση. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν (2000 g για 20 λεπτά) και το ανώτερο στρώμα (ορός αίματος) αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Η ενζυμική δραστηριότητα της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου, της καταλάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν. Η ενυμική δραστηριότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Habig et al. (1974). Η συνολική πρωτεΐνη του ορού αίματος εκτιμήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Τα λιπαρά οξέα στο αίμα προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο όπως περιγράφεται από τους Bondia-Pons et al. (2004). Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν με την ίδια μεθοδολογία όπως και στην περίπτωση του προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων στο γάλα. Η μόνη διαφορά ήταν ότι χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο το C13:0.

6.2.3.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποκτηθέντα δεδομένα για το σωματικό βάρος, το ύψος γαλακτοπαραγωγής, τη χημική σύνθεση του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη, λιπαρά οξέα) και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (στο αίμα και στο γάλα) καθώς, επίσης, και για τα λιπαρά οξέα του αίματος εφαρμόστηκε επαναλαμβανόμενη ανάλυση διακύμανσης (Repeated

measures-ANOVA) θεωρώντας τα δεδομένα για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας (εβδομάδα δειγματοληψίας) ως επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 17.00 (έκδοση 8.0.0).

6.3. Αποτελέσματα και σχολιασμός

6.3.1. Σωματικά βάρη

Τα σωματικά βάρη (πίνακας 6.4) δεν επηρεάστηκαν από τον διατροφικό χειρισμό ($P_{N>0,05}$). Το αιθέριο έλαιο δεν είχε καμία επίδραση στην πρόσληψη τροφής (θετική ή αρνητική) και ως εκ τούτου ούτε και στο σωματικό βάρος των ζώων.

Πίνακας 6.4. Σωματικό βάρος, ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος καθ' όλη την πειραματική περίοδο.

	Σιτηρέσιο (Σ)		SEM	Χρονική στιγμή δειγματοληψίας σε εβδ. (X)				Επιδράσεις		
	Επέμβασ η	NS		1 ⁿ	2 ⁿ	3 ⁿ	4 ⁿ	SE M	Σ	X
Μάρτυρας Σωματικό βάρος	50,7	50,2	2,89	49,5	49,1	50,0	52,9	2,12	NS	NS
Ύψος γαλακτ.	2107	2125	189	2039 ^a	2375 ^b	2237 ^{ab}	1812 ^c	138	NS	***
Λίπος γάλακτος	3,01	3,17	0,159	3,39 ^a	3,16 ^{ac}	2,86 ^b	2,97 ^{bc}	0,122	NS	***
Πρωτεΐνη γάλακτος	3,02	2,80	0,113	2,87	2,95	2,94	2,88	0,093	NS	NS
Λακτόζη	4,43	4,56	0,046	4,43	4,51	4,49	4,50	0,035	NS	NS

Όσον αφορά την επίδραση των αιθέριων ελαίων στην πρόσληψη τροφής δεν υπάρχει ομοφωνία στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Οι Estell et al. (1998) ανέφεραν ότι ορισμένα αιθέρια έλαια (συγκεκριμένα, η καμφορά, το α-πινένιο, το λεμονένιο και η βορνεόλη) επιδρούν αρνητικά στην κατανάλωση της τροφής σε πρόβατα. Οι Yang et al., (2010), ανέφεραν ότι χαμηλές δόσεις κινναμαλδεΐδης (0,4 g/ημέρα/ζώο) διεγείρουν την πρόσληψη της τροφής σε βοοειδή, ενώ υψηλότερες δόσεις (1,6 g/ημέρα/ζώο) δεν είχαν καμία επίδραση. Αντίθετα, οι Malecky et al. (2009) ανέφεραν

ότι τόσο χαμηλές (0,043 g / kg ξηράς ύλης πρόσληψη) όσο και υψηλότερες δόσεις (0,43 g/kg προσληφθείσας ξηράς ουσίας) δεν επηρέασαν την πρόσληψη τροφής σε γαλακτοπαραγωγές αίγες. Τέλος, οι Simitzis et al., (2007) ανέφεραν ότι δεν υπήρξε καμία επίδραση στην πρόσληψη τροφής εκτός από τις πρώτες 2-3 ημέρες μετά την εισαγωγή της ρίγανης αιθέριων ελαίων (1 ml/kg μείγματος ΣΖ) όπου η πρόσληψη τροφής μειώθηκε ως αποτέλεσμα του φαινομένου της νεοφοβίας σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες.

Ωστόσο, σύμφωνα με τους Dziba and Provenza (2008) τα πρόβατα μπορούν να καταναλώσουν μέχρι και 27-28 g τερπενίων/ημέρα χωρίς να μειωθεί η κατανάλωση τροφής. Μετά το όριο αυτό η κατανάλωση της τροφής περιορίζεται έτσι ώστε να αποφευχθούν τοξικές συγκεντρώσεις για τον οργανισμό του ζώου. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές όταν προστεθούν αιθέρια έλαια στο σιτηρέσιο των προβάτων, αρχικά παρατηρείται μείωση της κατανάλωσης τροφής, μετά αύξηση και τέλος σταθεροποίηση, ενώ ο απαιτούμενος χρόνος προσαρμογής είναι 2 εβδομάδες.

Στην παρούσα εργασία δόθηκε στα ζώα ο απαιτούμενος χρόνος προσαρμογής και επιπλέον η ημερήσια δόση του αιθέριου ελαίου ήταν πολύ χαμηλή σε σχέση με το ανώτατο ανεκτό όριο των 28 g/ημέρα και επομένως η κατανάλωση τροφής δεν επηρεάστηκε.

6.3.2. Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση γάλακτος

Το ύψος γαλακτοπαραγωγής ήταν ελαφρώς υψηλότερο (0,89 %) αλλά όχι στατιστικά σημαντικό στην ομάδα της επέμβασης, εκτός από την πρώτη εβδομάδα όπου βρέθηκε να είναι χαμηλότερο από ότι στην ομάδα του μάρτυρα. Η αύξηση αυτή πιθανώς οφείλεται στη βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής στην ομάδα της επέμβασης. Βρίσκεται δε σε συμφωνία με τους Giannenas et al. (2011) οι οποίοι ανέφεραν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου (Crina Ruminants¹) οδήγησε σε υψηλότερη γαλακτοπαραγωγή (P=0.034) κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (50 έως 150 mg/kg μείγματος ΣΖ), σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες. Επίσης, οι Simitzis et al. (2007), ανέφεραν ελαφριά αύξηση (P>0,05) της παραγωγής γάλακτος όταν στο σιτηρέσιο προστέθηκε 1 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης/kg μείγματος ΣΖ σε

¹ Εμπορικό μείγμα που περιέχει θυμόλη, ευγενόλη, βανιλίνη, γκουαϊακόλη και λεμονένιο

γαλακτοπαραγωγές

προβατίνες.

Η προσθήκη αποξηραμένων φυτών ρίγανης στο μείγμα ΣΖ δεν είχε καμία επίδραση στη χημική σύσταση του γάλακτος (πίνακας 6.4). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούσαν τις πρωτεΐνες, το λίπος και τη λακτόζη του γάλακτος δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης ($P>0,05$). Ωστόσο, η πρωτεΐνη του γάλακτος ήταν αριθμητικά χαμηλότερη στην ομάδα της επέμβασης και αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνίας στη μεγάλη κοιλία (πίνακας 20). Οι Tekippe et al. (2011) ανέφεραν υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνίας στη μεγάλη κοιλία ($P<0,001$) σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες οι οποίες κατανάλωναν καθημερινά 500 g ξηρά δρόγη ρίγανης (*Origanum vulgare*), σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι Busquet et al. (2005) έδειξαν *in vitro* ότι η καρβακρόλη οδηγεί σε μείωση των συγκεντρώσεων μεγάλων πεπτιδίων και σε αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας 2 ώρες μετά τη χορήγηση της τροφής σε συνεχείς μικροβιακές καλλιέργειες. Έτσι, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης μπορεί να είχε αρνητική επίδραση στη χρησιμοποίηση του αζώτου από τους μικροοργανισμούς των προστομάχων λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε καρβακρόλη που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αντίθετα, οι Simitzis et al. (2007) ανέφεραν υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο γάλα προβατινών που κατανάλωναν 1 ml αιθέριου ελαίου/kg μείγματος. Επίσης, οι Giannenas et al. (2011), ανέφεραν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου στο μείγμα ΣΖ είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη συγκέντρωση αμμωνίας εντός της μεγάλης κοιλίας ($P=0,07$) σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες, αλλά μόνο στις υψηλότερες δόσεις (100 και 150 mg/kg). Από την άλλη μεριά, οι Malecky et al. (2009), δεν παρατήρησαν επίδραση του αιθέριου ελαίου στη συγκέντρωση της αμμωνίας σε γαλακτοπαραγωγές αίγες. Όμως, παρατηρήθηκε μια αριθμητική αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, παρατήρησαν αύξηση της πρωτεΐνοπεριεκτικότητας του γάλακτος για την υψηλότερη δόση μόνο (1154 mg/ζώο).

Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος ήταν ελαφρώς υψηλότερη ($P>0,05$) στην ομάδα της επέμβασης, εκτός από την τέταρτη εβδομάδα όπου ήταν χαμηλότερη. Οι Simitzis et al. (2007) παρατήρησαν μια μικρή αλλά όχι στατιστικώς σημαντική αύξηση του λίπους του γάλακτος σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες όταν στο σιτηρέσιο προστέθηκε 1 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης. Οι Giannenas et al. (2011), δεν

παρατήρησαν καμία επίδραση στην λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος ανεξάρτητα από το επίπεδο προσθήκης αιθέριου ελαίου (50-150 mg/kg) στις γαλακτοπαραγωγές προβατίνες. Επίσης, οι Malecky et al. (2009) δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στο λίπος του γάλακτος για δύο διαφορετικά επίπεδα προσθήκης (0,043 και 0,43 g/kg ξηράς ουσίας) σε γαλακτοπαραγωγές αίγες. Οι Santos et al. (2010) παρατήρησαν αύξηση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος αγελάδων στα σιτηρέσια των οποίων προστέθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα Agolin Ruminant (περιείχε ευγενόλη, αιθέριο έλαιο κοριανδρου και οξικό εστέρα της γερανιόλης). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές η αύξηση αυτή αποδίδεται στην αύξηση της παραγωγής οξικού οξέος ή/και στην αύξηση του λόγου οξικό/προπιονικό οξύ χωρίς όμως να έχουν πραγματοποιήσει σχετικές μετρήσεις.

Η λακτόζη του γάλακτος παρέμεινε αμετάβλητη μεταξύ των δύο ομάδων καθ 'όλη την πειραματική περίοδο. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί από τους Simitzis et al. (2009) και τους Giannenas et al. (2011) σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες. Στο γάλα των μηρυκαστικών ζώων η λακτόζη είναι χαμηλότερη μόνο στην αρχή και στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, ενώ στο μεταξύ παραμένει σχετικά σταθερή (Park et al., 2007).

Συμπερασματικά, δεν υπήρξε καμία επίδραση από την προσθήκη ξηράς δρόγης ρίγανης στο ύψος γαλακτοπαραγωγής και στην χημική σύσταση του γάλακτος

Οι Basset et al. (2000) πρότειναν ότι τα αιθέρια έλαια είναι αποτελεσματικότερα σε πιο δυσμενείς συνθήκες εκτροφής. Επιπλέον, οι Malecky et al. (2009) ανέφεραν, ότι *in vivo*, διάφορες πιθανές οδοί διαφυγής των αιθέριων ελαίων. Έτσι, μπορούν να λάβουν χώρα απώλειες κατά τον μηρυκασμό και μέσω των ερυγών λόγω της πτητικότητας των αιθέριων ελαίων, απώλειες που οφείλονται στην απορρόφηση των αιθέριων ελαίων μέσω του τοιχώματος της μεγάλης κοιλίας στο αίμα και την εκτεταμένη αποδόμηση των τερπενίων από τη μικροχλωρίδα των προστομάχων. Ωστόσο, σύμφωνα με την Malecky et al. (2009), η αποδόμηση των τερπενίων εντός της μεγάλης κοιλίας ήταν το πιο σημαντικό φαινόμενο που ευθυνόταν για την απώλεια αιθέριων ελαίων ποσοτικά σε γαλακτοπαραγωγές αίγες. Επιπλέον, οι Michiels et al. (2008) απέδειξαν ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη απορροφώνται σχεδόν πλήρως (και ταχέως) στο στομάχι και στο λεπτό έντερο χοιριδίων. Έτσι, η μείωση της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου εντός του πεπτικού συστήματος

μπορεί να συμβάλει στη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα *in vivo*. Ένα άλλο φαινόμενο που θα πρέπει να αναφερθεί είναι η ανάπτυξη αντίστασης της μικροχλωρίδας των προστομάχων σε διάφορα αιθέρια έλαια. Ο Nelson (2000) ανέφερε ότι ο μικροοργανισμός *Staphylococcus aureus* έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει αντίσταση σε αιθέριο έλαιο τσαγιόδεντρου (tea tree), *in vitro*. Έτσι, υπάρχει η πιθανότητα της προσαρμογής των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας *in vivo* στο αιθέριο έλαιο με άμεσο αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της επίδρασης στις μικροβιακές ζυμώσεις και κατ' επέκταση στην σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης και πτητικών λιπαρών οξέων. Ωστόσο, οι Bakkali et al. (2008) υποστηρίζουν ότι δεν είναι εφικτή γενικά η προσαρμογή των μικροοργανισμών και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αιθέρια έλαια δεδομένου ότι οι μηχανισμοί δράσης των αιθέριων ελαίων περιλαμβάνουν πολλούς κυτταρικούς στόχους ταυτόχρονα. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη βακτηριακή προσαρμογή σε αρωματικά βότανα με αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς υπάρχει περιορισμένη έρευνα σε αυτό το αμφιλεγόμενο θέμα (Benchaar et al., 2009).

6.3.3. Αντιοξειδωτικά ένζυμα στο γάλα και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα γάλακτος

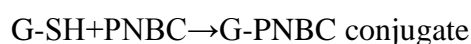
Το κανονικό (όχι πρωτόγαλα ή μαστίτιδας) νωπό γάλα περιέχει 70 αυτόχθονα ένζυμα (Fox and Kelly, 2006) σε ένα μη ομογενές διάλυμα, ενώ κάθε ένζυμο κατανέμεται σε μία ή περισσότερες διακριτές φάσεις: στον ορό του γάλακτος, στα λιποσφαιρίδια, στα μικύλλια της καζεΐνης, στα κυστίδια των μεμβρανών και στα σωματικά κύτταρα του γάλακτος (Silanikove et al., 2006). Η σημασία των ενζύμων γάλακτος τονίζεται από το γεγονός ότι το πρωτόγαλα περιέχει πάντοτε υψηλότερα επίπεδα ενζύμων από ότι το κανονικό ακατέργαστο γάλα (Silanikove et al., 2006). Ορισμένα ένζυμα στο γάλα προσφέρουν προστατευτική λειτουργία κατά του οξειδωτικού στρες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικοί δείκτες. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται όταν μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών λαμβάνει χώρα μια ανισορροπία είτε σε κυτταρικό είτε σε ατομικό επίπεδο (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (στις οποίες συμπεριλαμβάνονται υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες) ή με μια σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού

(Schaffer και Buettner, 2001). Η προσθήκη των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο γάλα παρέχει την δυνατότητα να βελτιωθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα, όμως το κόστος τέτοιων εφαρμογών είναι πολύ υψηλό (Aurand et al., 1977).

Σημειώνεται ότι το 1-3% του O₂ που καταναλώνεται από τον οργανισμό μετατρέπεται σε υπεροξειδικές αλλά και άλλες ρίζες κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Halliwell, 1996). Οι ελεύθερες ρίζες κατέχουν πολύ σημαντικό και πολυδιάστατο ρόλο αφού σχετίζονται με τη θανάτωση βακτηριακών κυττάρων από το ανοσοβιολογικό σύστημα, την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και τη μεταγραφή γονιδίων (Droge 2002). Όμως εκτός από τις προαναφερθείσες επιθυμητές λειτουργίες οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA σε πρωτεΐνες και λιπίδια (Grabman 2005). Έτσι μπορεί να προκληθούν διάφορες ασθένειες όπως πχ. Ο καρκίνος. Προκειμένου να αντιμετωπίσει τις ζημιογόνες επιδράσεις των ελεύθερων ριζών ο οργανισμός διαθέτει ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα το οποίο αποτελείται κυρίως από αντιοξειδωτικά ένζυμα (πχ. δεσμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση) και αντιοξειδωτικά (πχ. ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες, ουρικό οξύ). Ωστόσο οξειδωτικό στρες παρατηρείται μόνο όταν υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων.

Ακολουθεί συνοπτική περιγραφή και παραδείγματα βιοχημικών αντιδράσεων των κυριότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων-δεικτών:

Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης σε διάφορα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Hayes et al., 2005). Έτσι, τα οξειδωτικά υποστρώματα μπορούν να απομακρυνθούν αποτελεσματικά και οι ιστοί προστατεύονται από την οξείδωση:



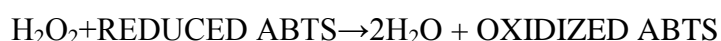
Ωπου:

G-SH= ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης

PNBC=χλωρίδιο του π-νιτροβενζολίου

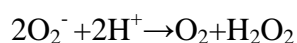
G-PNBC conjugate=γλουταθειόνη του χλωριδίου του π-νιτροβενζολίου

Η λακτοϋπεροξειδάση (Lac) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που παράλληλα εμφανίζει αντιμικροβιακές ιδιότητες ενώ συντίθεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αδενοκυψελίδων και τα ουδετερόφιλα (Isobe et al., 2011). Η αντιμικροβιακή λειτουργία αποδίδεται στην παραγωγή υποθειοκυανικού ανιόντος (OSCN-) μέσω της οξείδωσης του θειοκυανικού άλατος από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Seifu et al., 2004). Η λακτοϋπεροξειδάση καταλύει την οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Kohler and Jenzer, 1989).

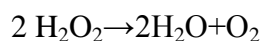


Ωπου: ABTS=2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid

Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αναγωγής των ριζών του υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Lindmark-Mansson and Akesson, 2000) και επομένως απαλλάσσει τον οργανισμό από τις επιβλαβείς ρίζες (Fox and Kelly, 2006). Ο κύριος ρόλος της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου είναι προστατευτικός έναντι της οξείδωσης (ιστοί, λιπίδια κτλ.). Στο γάλα, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου προστατεύει τα λιπίδια από την οξείδωση από ρίζες υπεροξειδίου. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:

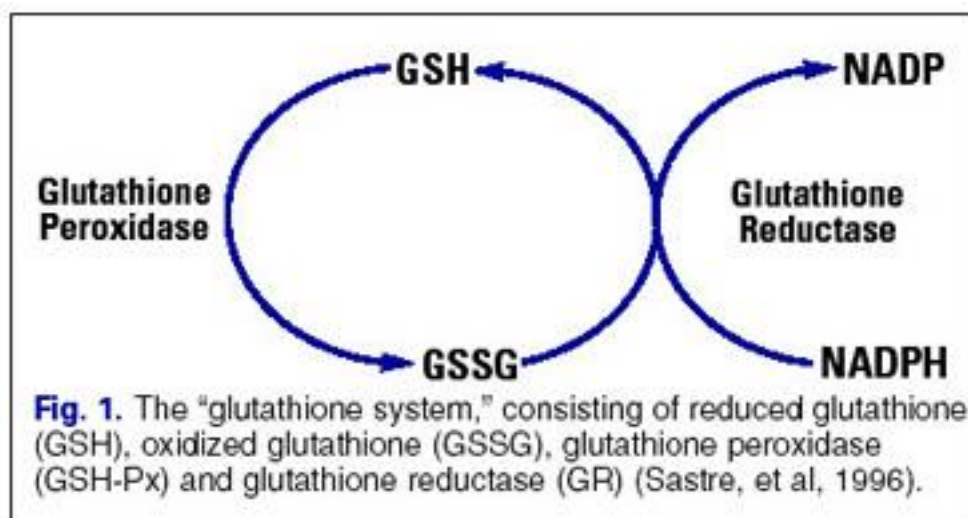


Η καταλάση (CAT) καταλύει την αντίδραση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Lindmark-Mansson and Akesson, 2000) και χαρακτηρίζεται από υψηλότερες τιμές σε νωπό γάλα προερχόμενο από ζώα με μαστίτιδα (Kitchen et al., 1970):



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) καταλύει την αντίδραση της οξείδωσης της γλουταθειόνης από υδρουπεροξειδία (Rezapour and Taghinejad-Roudbaneh, 2011). Παρουσία της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (RED) και NADPH, η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης μειώνεται ταχέως, με μια χημική αντίδραση η οποία περιλαμβάνει την οξείδωση του NADPH σε NADP⁺. Επίσης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αφαιρεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου, καθώς και άλλα

υπεροξειδία (Lindmark-Mansson και Akesson, 2000). Το ενζυμικό σύστημα υπεροξειδάση/ρεδουκτάση της γλουταθειόνης παρουσιάζεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5. Το ενζυμικό σύστημα υπεροξειδάση/ρεδουκτάση της γλουταθειόνης

Επιπλέον, η κατανάλωση ξηράς δρόγης από τα ζώα έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των αιθέριων ελαίων στο γάλα (Ando et al., 2001) με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντιοξειδωτική ικανότητά του (Uegaki et al., 2001).

Στην παρούσα μελέτη η λακτοϋπεροξειδάση, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση δεν επηρεάστηκαν από το αιθέριο έλαιο της ρίγανης ($P > 0,05$), ενώ υπήρξε σημαντική αύξηση της ρεδουκτάσης και της υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στο νωπό γάλα (πίνακας 6.5). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως Units/ml γάλακτος και Units/ mg ολικής πρωτεΐνης γάλακτος.

Πίνακας 6.5. Επίδραση της ρίγανης στα αντιοξειδωτικά ένζυμα και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος.

	Στητήρσιο (Σ)			Χρόνος δειγματοληψίας σε εβδ.(X)			Επιδράσεις		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	3 ⁿ	4 ⁿ	SEM	Σ	X	Αλληλεπίδραση Σ*X
SOD (U/mL)	29,73	30,03	3,99	29,58	30,18	3,99	NS	NS	NS
SOD (U/mg)	2,50	2,79	0,355	2,61	2,67	0,355	NS	NS	NS
Lac (U/mL)	0,58	0,61	0,046	0,59	0,60	0,046	NS	NS	NS
Lac (U/mg)	0,049	0,058	0,005	0,053	0,053	0,005	NS	NS	NS
GPX (U/mL)	1,00 ^a	1,47 ^b	0,055	1,184	1,289	0,055	***	NS	NS

GPX (U/mg)	0,083 ^a	0,140 ^b	0,007	0,107	0,116	0,007	***	NS	NS
RED (U/mL)	0,68 ^a	1,82 ^b	0,145	1,33	1,17	0,145	***	NS	NS
RED (U/mg)	0,06 ^a	0,17 ^b	0,015	0,125	0,105	0,015	***	NS	NS
CAT (U/mL)	25,47	23,42	2,392	22,22	26,67	2,392	NS	NS	NS
CAT (U/mg)	2,15	2,21	0,234	2,01	2,36	0,234	NS	NS	NS
FRAP value	180,25 ^a	240,83 ^b	3,374	211,25	209,83	3,374	***	NS	NS

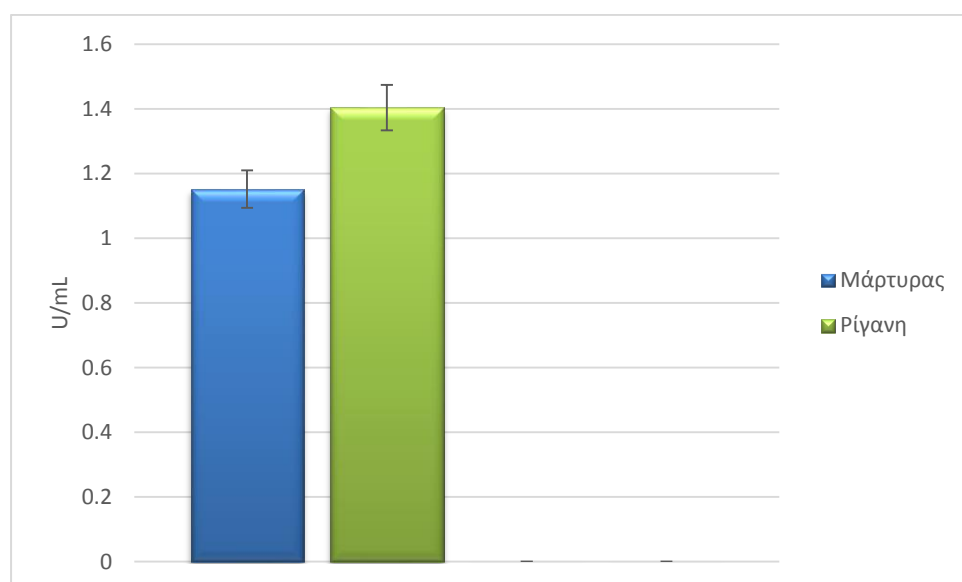
Οι μέσες τιμές για τη ενζυμική δραστηριότητα της λακτοϋπεροξειδάσης ήταν $0,55 \pm 0,046$ vs $0,61 \pm 0,046$ U/ml (ομάδα μάρτυρα vs ομάδα επέμβασης). Αυτές οι τιμές είναι συγκρίσιμες με τις τιμές που αναφέρθηκαν από τους Seifu et al. (2004), οι οποίοι ανέφεραν τιμές $0,26 \pm 0,10$ και $0,79 \pm 0,18$ U/ml γάλακτος για αυτόχθονες αφρικάνικες αίγες και αίγες της φυλής Saanen, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι Trujillo et al. (2007) ανέφεραν υψηλότερες τιμές της τάξεως των 1,73 U/ml γάλακτος σε φυλή Alpine- Saanen.

Οι μέσες τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου στο γάλα ήταν $29,73 \pm 3,99$ vs $30,03 \pm 3,99$ U/ml (ομάδα μάρτυρα vs ομάδα επέμβασης). Αυτές οι τιμές είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που αναφέρθηκαν από τους Granelli et al. (1995) όπου βρήκαν ένα εύρος μεταξύ 0-4,8 U /ml στο αγελαδινό γάλα. Ωστόσο, οι τιμές της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τις τιμές της ερευνητικής εργασίας των Korycka-Dahl et al. (1979) όπου ανέφεραν εξίσου υψηλές τιμές ενζυμικής δραστηριότητας ($19,5$ U / mL) σε αγελαδινό γάλα.

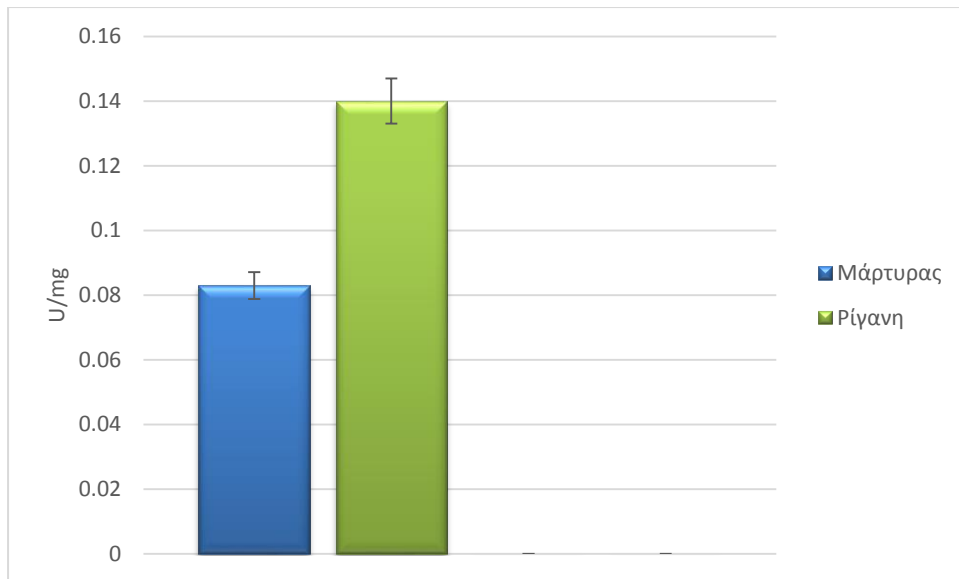
Οι μέσες τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας της καταλάσης στο νωπό γάλα βρέθηκαν να είναι $25,47 \pm 2,392$ vs $23,42 \pm 2,392$ U/ml (ομάδα μάρτυρα vs ομάδα επέμβασης). Αυτές οι τιμές είναι υψηλότερες από τις τιμές που αναφέρθηκαν από τους Hirvi και Griffiths (1997) σε νωπό γάλα αγελάδας που ελήφθη τον Νοέμβριο ($0,42$ U/ml) και τον Απρίλιο ($1,02$ U/ml). Ωστόσο, οι Hirvi and Griffiths (1997), προσδιόρισαν την ενζυμική δραστηριότητα της καταλάσης με μια διαφορετική μέθοδο και συγκεκριμένα την δοκιμασία επίπλευσης δίσκου (disc flotation assay). Επίσης, η ενζυμική δραστηριότητα της καταλάσης στην παρούσα μελέτη βρίσκεται εντός του εύρους των 7,5-36 U/ml που αναφέρεται από τον McEnzie (1971) στο αγελαδινό γάλα.

Η ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης ήταν υψηλότερη ($P < 0,05$) στην ομάδα της επέμβασης σε

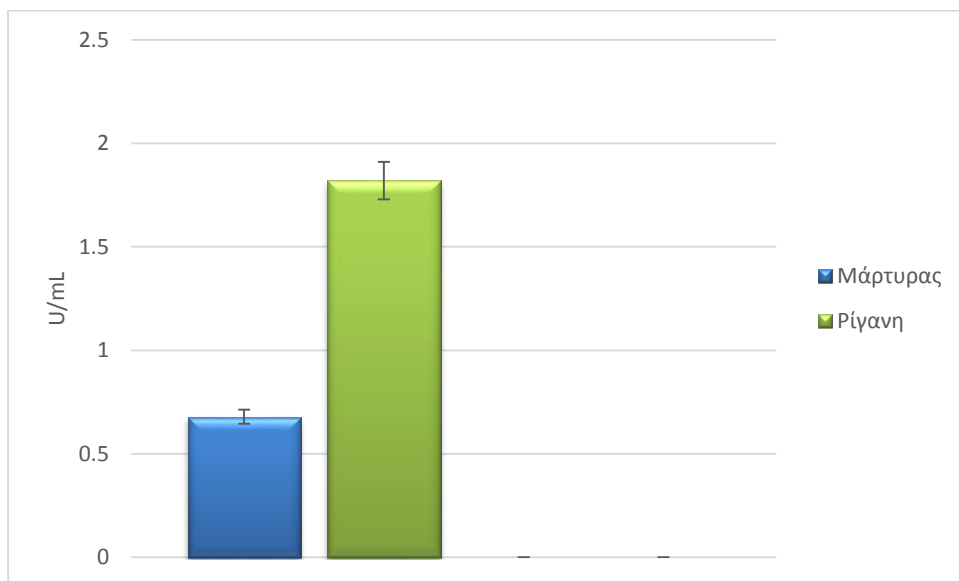
σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (πίνακας 6.5 διαγράμματα 6.1,6.2,6.3 και 6.4). Επομένως και τα δύο συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα επηρεάστηκαν θετικά από την διατροφική επέμβαση. Οι μέσες τιμές ήταν $1,00 \pm 0,055$ (Μάρτυρας) vs $1,47 \pm 0,055$ (Ομάδα επέμβασης) U/ml. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $0,083 \pm 0,007$ (Μάρτυρας) vs $0,140 \pm 0,007$ (Ομάδα επέμβασης) U/mg πρωτεΐνης. Αυτές οι τιμές είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα όπου η ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης κυμαίνεται μεταξύ 12-32 U/ml (Lindmark-Mansson et al., 2001). Η ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοουκτάσης της γλουταθειόνης προσδιορίστηκε ως $0,68 \pm 0,145$ (Μάρτυρας) vs $1,82 \pm 0,145$ (ομάδα επέμβασης) U/mL και αντίστοιχα $0,06 \pm 0,015$ vs $0,17 \pm 0,015$ U/mg πρωτεΐνης.



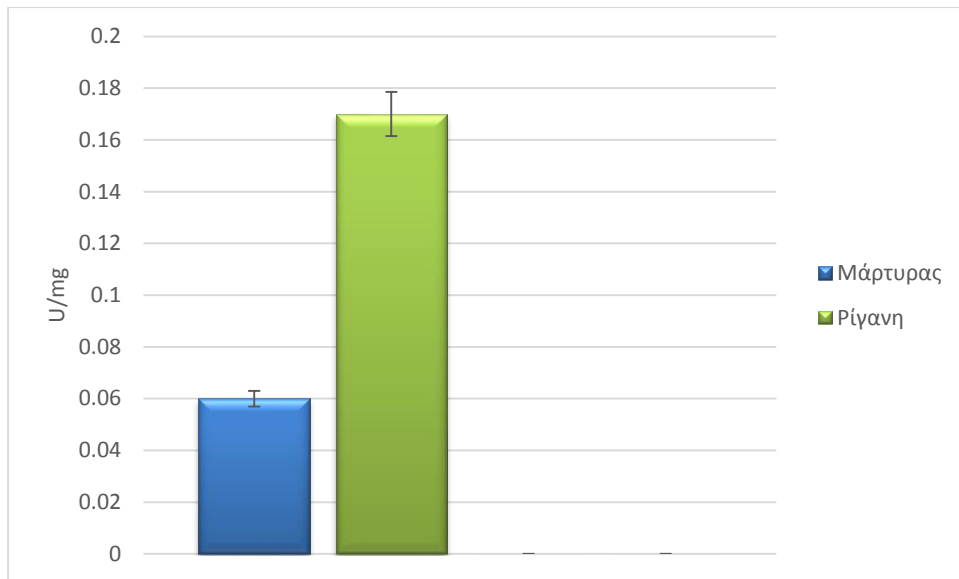
Διάγραμμα 6.1. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο γάλα.



Διάγραμμα 6.2. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο γάλα.



Διάγραμμα 6.3. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο γάλα.



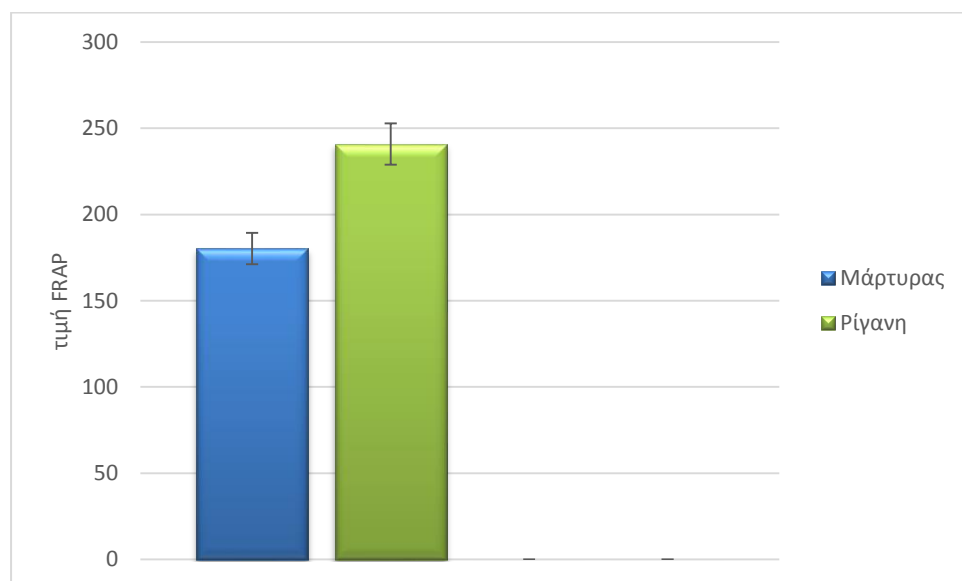
Διάγραμμα 6.4. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδουκτάσης (U/mg) της γλουταθειόνης στο γάλα.

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων συσχετίζεται θετικά με το επίπεδο των υποστρωμάτων τους (Casado et al., 1995). Απροσδόκητα, η ρίγανη οδήγησε σε αύξηση της υπεροξειδάσης και της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης στο γάλα, ενώ αναμενόταν το αντίθετο. Αυτό αποδίδεται στο ότι οι συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου φαίνεται ότι ήταν παραδόξως υψηλότερες στην ομάδα της διατροφικής επέμβασης ενώ το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (όπως και διάφορα άλλα συστατικά της ρίγανης) χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου δεν επηρεάστηκε από τη διατροφική επέμβαση, ενώ το ένζυμο αυτό αντιπροσωπεύει την πρώτη αντιοξειδωτική άμυνα (Michiels et al., 1994). Ως εκ τούτου, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου δεν ήταν υψηλότερη στην ομάδα της διατροφικής επέμβασης. Επομένως η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης συνεπάγεται και αυξημένη αντιοξειδωτική προστασία από τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Η παράλληλη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης συμβάλλει επίσης στην αυξημένη προστασία των συστατικών του γάλακτος (λιπίδια, βιταμίνες, πρωτεΐνες) από τις δραστικές μορφές οξυγόνου και συμβάλλει στην διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του γάλακτος.

Η ευαισθησία των διαφόρων συστατικών του γάλακτος στην οξείδωση όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και οι βιταμίνες, είναι ουσιώδους σημασίας κυρίως για τους

εκτροφείς γαλακτοπαραγωγών ζώων και για τους μεταποιητές γάλακτος (Smet et al., 2008). Αυτό αποδίδεται στη δημιουργία των οξειδωμένων (μη επιθυμητών) γεύσεων στο γάλα που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του γάλακτος και κατά συνέπεια των προϊόντων που λαμβάνουν οι καταναλωτές. Η ευαισθησία του γάλακτος στην οξείδωση μπορεί να εκτιμηθεί με προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Smet et al., 2008), δεδομένου ότι οξείδωση συμβαίνει μόνον όταν υπάρχει μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών παραγόντων και αντιοξειδωτικών αμυνών (Halliwell, 1996).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφραζόμενη ως τιμή FRAP (Fe^{+2} $\mu\text{mol/ml}$ γάλακτος) επηρεάστηκε θετικά από την διατροφική επέμβαση ($P < 0,05$) τόσο στην τρίτη όσο και στην τέταρτη εβδομάδα της πειραματικής περιόδου. Οι μέσες τιμές ήταν $180,25 \pm 3,374$ vs $240,83 \pm 3,374$ $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{ml}$ (Μάρτυρας vs ομάδα επέμβασης) (διάγραμμα 6.5).



Διάγραμμα 6.5. Επίδραση της ρίγανης στην τιμή FRAP του γάλακτος.

Αυτές οι τιμές FRAP είναι συγκρίσιμες με τις τιμές που έχουν παρατηρηθεί στο αγελαδινό γάλα. Οι Chen et al. (2003) ανέφεραν ότι μια μέση τιμή FRAP είναι της τάξεως των $219 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{ml}$ για παστεριωμένο αγελαδινό γάλα από το οποίο είχε

προηγουμένως αφαιρεθεί το λίπος. Επίσης, οι Amamcharia and Metzger (2013) ανέφεραν ένα εύρος από 150 έως 460 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{ml}$ με μια μέση τιμή 270 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{ml}$. Επίσης, μεταξύ της τρίτης και της τέταρτης εβδομάδας οι τιμές FRAP μειώθηκαν ελαφρώς ($P>0,05$). Σύμφωνα με τους Smet et al. (2008) οι τιμές FRAP μειώνονται κατά την αποθήκευση του γάλακτος. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση και είναι συγκρίσιμη με εκείνη του αιθέριου έλαιου του δενδρολίβανου (Tsimidou et al., 1995). Η αντιοξειδωτική δράση αποδίδεται κυρίως στην καρβακρόλη και τη θυμόλη (θυμόλη>καρβακρόλη), φυσικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο με πιθανή συνεργική αντιοξειδωτική δράση (Milos and Makota, 2012). Τα αιθέρια έλαια μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο αίμα (και κατά συνέπεια στο γάλα) μέσω απορρόφησης από το πεπτικό σύστημα (Desage et al., 1996). Αν και οι ποσότητες των αιθέριων ελαίων που ανιχνεύονται στο αίμα και το γάλα είναι γενικά πολύ χαμηλές, το αποτέλεσμά τους φαίνεται να είναι σημαντικό, όπως φαίνεται από τις υψηλότερες τιμές FRAP στο γάλα της ομάδας της διατροφικής επέμβασης (Πίνακας 27).

Οι Chen et al. (2003) ανέφεραν ότι η μέθοδος FRAP είναι ακατάλληλη για το πλήρες γάλα λόγω του χαμηλού pH της μεθόδου στο οποίο η καζεΐνη δεν είναι διαλυτή (Chen et al., 2003). Επίσης, η μέθοδος FRAP δεν μπορεί να εντοπίσει την αντιοξειδωτική ικανότητα της λακτοφερίνης (Smet et al., 2008). Ωστόσο η μέθοδος FRAP στην παρούσα μελέτη έδειξε σαφή βελτίωση ($P>0,05$) της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος που παράχθηκε από τις αίγες οι οποίες κατανάλωσαν ξηρά δρόγη ρίγανης.

Ως εκ τούτου, ορισμένοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας ενισχύθηκαν στο νοπό γάλα που παράχθηκε από την ομάδα της διατροφικής επέμβασης. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει καμία αναφορά στη βιβλιογραφία σχετικά με την πιθανή επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης *in vivo*. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι τα αιθέρια έλαια ρυθμίζουν τη σύνθεση ενζύμων *in situ*, αφού κατέχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες (κυτταρική, πυρηνική, μιτοχονδριακές μεμβράνες και υπεροξυσωματίων) (Bakkali et al., 2008). Ωστόσο, ο λόγος γιατί μερικά αντιοξειδωτικά ένζυμα (λακτοϋπεροξειδάση, δεσμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση) δεν επηρεάστηκαν από την παρούσα διατροφική επέμβαση, παραμένει άγνωστος. Τέλος, μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η θεωρία της ‘προετοιμασίας για το

οξειδωτικό στρες’’ (Buzadzic et al , 1990; Hermes-Lima and Zenteno - Savin, 2002). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όταν η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species) μειώνεται, αποτελεί μια εξελικτική προσαρμογή και έναν προπαρασκευαστικό μηχανισμό προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη από το οξειδωτικό στρες, όταν η κατανάλωση οξυγόνου αυξηθεί και πάλι. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να προκαλέσουν μείωση του μεταβολισμού και κατά συνέπεια μείωση στην κατανάλωση οξυγόνου και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Saccoi et al., 2013). Επίσης, τα αιθέρια έλαια όταν απορροφώνται μέσω του πεπτικού συστήματος (Estell et al., 2010) παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες ακόμη και σε μικρές ποσότητες στο γάλα και το τυρί (Pizzoferrato et al., 2007) και ως εκ τούτου μπορούν να αφαιρούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου.

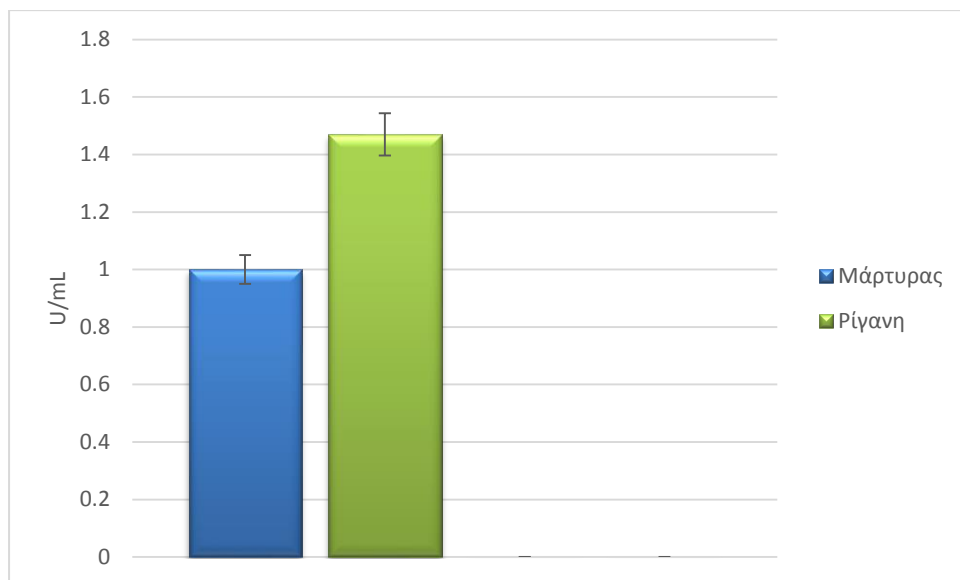
6.3.4. Αντιοξειδωτικά ένζυμα στο πλάσμα του αίματος

Η λακτοϋπεροξειδάση, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση δεν επηρεάστηκαν από την διατροφική επέμβαση (Πίνακας 6.6), ενώ η υπεροξειδάση και η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά ($P<0,05$) στην ομάδα της διατροφικής επέμβασης (διαγράμματα 6.6,6.7,6.8 και 6.9).

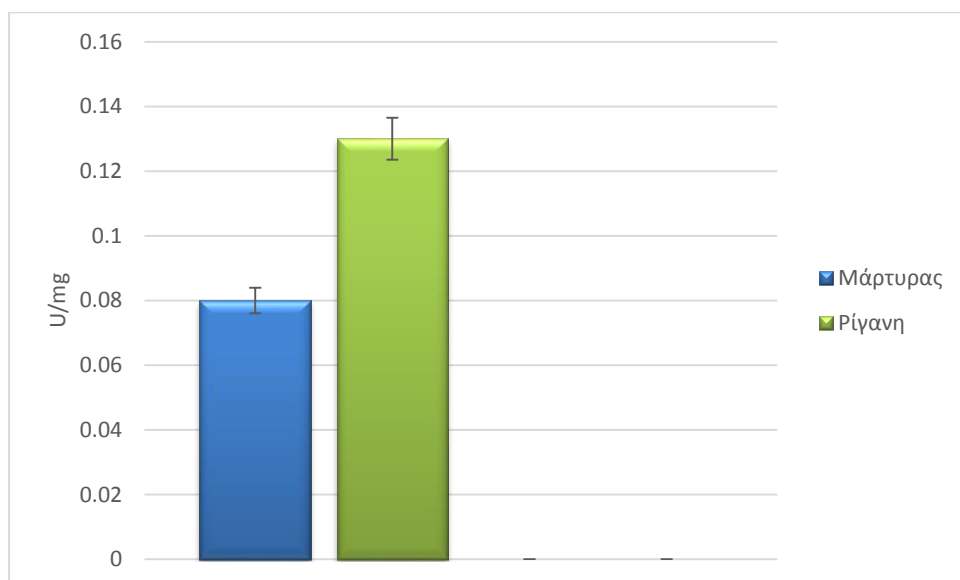
Πίνακας 6.6. Επίδραση της ρίγανης στα αντιοξειδωτικά ένζυμα στο πλάσμα του αίματος.

	Σιτηρέσιο (Σ)			Χρόνος δειγματοληψίας σε εβδ (Χ)			Επιδράσεις		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	3 ⁿ	4 ⁿ	SEM	Σ	X	Αλληλεπίδραση Σ*Χ
SOD (U/mL)	40,00	46,84	5,164	36,07	50,77	5,164	NS	NS	NS
SOD (U/mg)	4,26	4,47	0,585	4,06	4,67	0,585	NS	NS	NS
GPX (U/mL)	0,88 ^a	1,19 ^b	0,055	0,90 ^a	1,17 ^b	0,055	**	**	NS
GPX (U/mg)	0,08 ^a	0,13 ^b	0,008	0,10	0,10	0,08	***	NS	NS
RED (U/mL)	0,03 ^a	0,05 ^b	0,003	0,03	0,04	0,003	***	NS	NS
RED (U/mg)	0,003	0,005	0,000	0,004	0,004	0,000	*	NS	NS
CAT (U/mL)	20,96	23,22	3,053	20,53	23,65	3,053	NS	NS	NS
CAT (U/mg)	2,35	2,32	0,361	2,32	2,35	0,361	NS	NS	NS
GST	0,12	0,14	0,008	0,12	0,14	0,008	NS	NS	NS

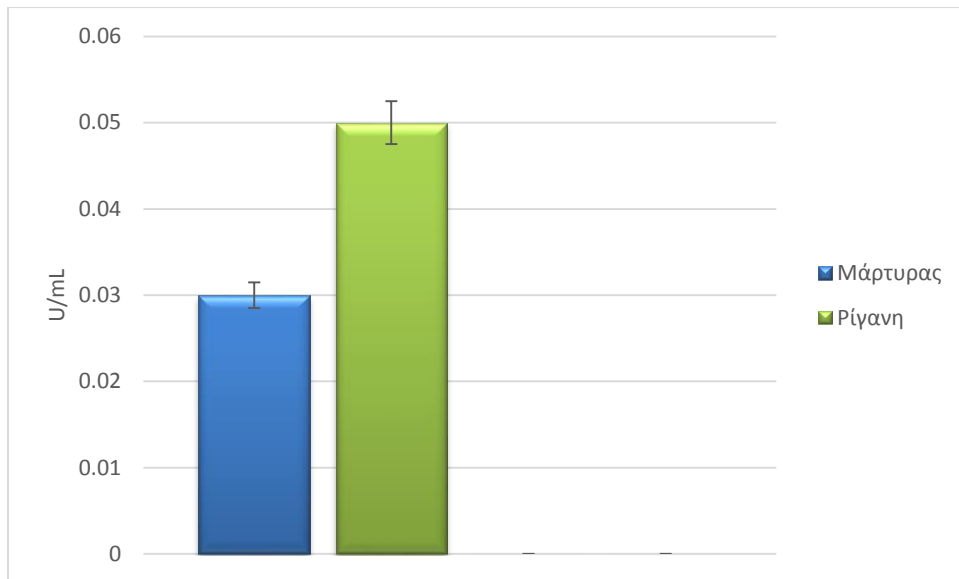
(U/mL)									
GST	0,01	0,01	0,001	0,01	0,01	0,001	NS	NS	NS
(U/mg)									



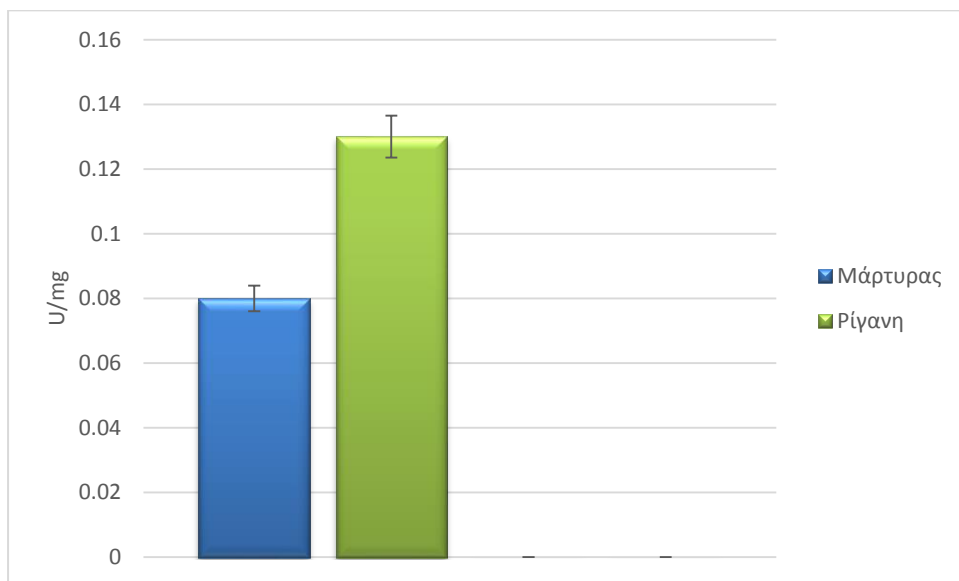
Διάγραμμα 6.6. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο πλάσμα του αίματος.



Διάγραμμα 6.7. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο πλάσμα του αίματος.



Διάγραμμα 6.8. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (U/mL) στο πλάσμα του αίματος.



Διάγραμμα 6.9. Επίδραση της ρίγανης στην ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (U/mg) στο πλάσμα του αίματος.

Οι Di Trana et al. (2006) έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των δραστικών μορφών οξυγόνου στο πλάσμα του αίματος συσχετίζονται θετικά με την ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Ωστόσο, αυτό δεν σημαίνει ότι τα ζώα εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες το οποίο συμβαίνει μόνον όταν

υπάρχει μια ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων (Fattman et al., 2003) όπως προαναφέρθηκε άλλωστε. Έτσι, η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης προστατεύουν τους ιστούς και τα χημικά μόρια (π.χ. κινητοποίηση του σωματικού λίπους) από τις δραστικές μορφές οξυγόνου κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Οι μέσες τιμές για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ήταν $0,88 \pm 0,055$ vs $1,19 \pm 0,055$ U/ml (ομάδα μάρτυρα vs ομάδα επέμβασης). Οι μέσες τιμές για τη ρεδουκτάση της γλουταθειόνης ήταν $0,03 \pm 0,003$ vs $0,05 \pm 0,003$ U/ml (ομάδα μάρτυρα vs ομάδα επέμβασης).

Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης σε διάφορα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Hayes et al., 2005). Έτσι, τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα μπορούν να αφαιρεθούν αποτελεσματικά και επομένως οι ιστοί προστατεύονται από την οξείδωση. Σε αντίθεση με την υπεροξειδάση και τη ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης δεν επηρεάστηκε από την επέμβαση. Έτσι, οι ίδιες αντιοξειδωτικές άμυνες ενισχύθηκαν από την διατροφική επέμβαση στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για παραγωγικά ζώα παρατίθενται στοιχεία που έχουν δημοσιευθεί σε ιχθείς (Saccoi et al., 2013). Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου (0,25-2 ml/kg) του φυτού *Lippia alba* σε σιτηρέσια γατόψαρων οδήγησε σε αύξηση της αντιοξειδωτικής ανταπόκρισης (όπως εκτιμήθηκε με ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς δείκτες). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά αυξημένες στον εγκέφαλο των ψαριών. Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης αυξήθηκαν στα βράγχια. Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης αυξήθηκε στο ήπαρ και τους νεφρούς. Η αύξηση ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων στον ορό του αίματος θα μπορούσε επίσης να εξηγηθεί με τη θεωρία της προετοιμασίας για το οξειδωτικό στρες. Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, τουλάχιστον σε ιχθείς, μπορεί να προκληθεί από χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου και κατά συνέπεια χαμηλότερες συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου (Lushchak et al., 2005).

6.3.5. Προφίλ λιπαρών οξέων στο αίμα και στο γάλα

Στους πίνακες 6.7 και 6.8 παρουσιάζεται η επίδραση της ρίγανης στο προφίλ των λιπαρών οξέων του αίματος και του γάλακτος, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του αίματος παρατηρούμε ότι κυριαρχούν ποσοτικά το παλμιτικό, το στεατικό και το λινελαϊκό οξύ, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τους Almeida et al. (2013) οι οποίοι έλαβαν δείγματα από την καρωτίδα γαλακτοπαραγωγών αιγών, 0,2,4,6 h μετά την λήψη της τροφής. Σημειώνεται ότι το βασσενικό οξύ (πρόδρομη ένωση σύνθεσης του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος) δεν εντοπίστηκε στο πλάσμα του αίματος.

Πίνακας 6.7. Μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) του πλάσματος του αίματος.

Λιπαρά οξέα	Σιτηρέσιο (Σ)			Χρόνος δειγματοληψίας σε εβδ. (X)			Επιδράσεις		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	3 ^η	4 ^η	SEM	Σ	X	Σ*X
C14:0	0,09	0,199	0,048	0,114	0,175	0,051	NS	NS	NS
C15:0	0,236	0,298	0,066	0,167	0,368	0,061	NS	NS	NS
C16:0	12,378	11,937	0,418	10,377	13,938	0,411	NS	NS	NS
C16:1	0,108	0,21	0,052	0,076	0,243	0,051	NS	NS	NS
C17:0	0,547	0,655	0,064	0,397 ^a	0,804 ^b	0,05	NS	*	NS
C17:1	0,148	0,247	0,062	0,189	0,205	0,066	NS	NS	NS
C18:0	17,814	17,855	0,698	15,516	20,153	0,679	NS	NS	NS
C18:1t	0,133	0,144	0,056	0,048	0,23	0,053	NS	NS	NS
C18:1c	10,481	9,975	0,776	8,517 ^a	11,939 ^b	0,64	NS	*	NS
C18:2t	0,493	0,311	0,078	0,275 ^a	0,529 ^b	0,077	NS	*	NS
C18:2c	21,361	19,413	1,055	16,892 ^a	23,882 ^b	0,931	NS	*	NS
C18:3n6	0,439	0,352	0,091	0,321	0,471	0,094	NS	NS	NS
C18:3n3	1,179	1,228	0,273	1,098	1,309	0,249	NS	NS	NS
C20:3n3+	4,579	4,237	0,542	4,115	4,701	0,428	NS	NS	NS
C22:1									
C24:0	7,55 ^a	12,655 ^b	1,41	11,71	8,495	1,221	*	NS	NS
C24:1	10,489	7,723	1,06	9,66	8,55	1,023	NS	NS	NS
C22:6	11,832	12,324	1,677	20,533 ^a	3,623 ^b	1,256	NS	*	NS

Όσον αφορά τη διατητική επέμβαση η ρίγανη επηρέασε θετικά ($P<0,05$) μόνο την εκατοστιαία αναλογία του εικοσιτετρανοϊκού οξέος (C24:0). Έτσι, συνολικά το προφίλ των λιπαρών οξέων του αίματος δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη της ρίγανης.

Πίνακας 6.8. Προφίλ λιπαρών οξέων στο γάλα (% των συνολικών λιπαρών οξέων)

Λιπαρά οξέα	Στηρέσιο (Σ)			Χρόνος δειγματοληψίας σε εβδ. (X)			Επιδράσεις		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	SEM	3 ^η	4 ^η	SEM	Σ	X	Σ*X
C4:0	2,106	2,147	0,135	1,867 ^a	2,386 ^b	0,128	NS	*	NS
C6:0	2,989	2,9	0,257	2,609 ^a	3,28 ^b	0,21	NS	*	NS
C8:0	3,99	3,43	0,264	3,708	3,713	0,191	NS	NS	NS
C10:0	12,476	11,388	0,589	12,204	11,66	0,426	NS	NS	NS
C11:0	0,288	0,336	0,036	0,327	0,297	0,027	NS	NS	NS
C12:0	5,109	4,859	0,433	5,121	4,848	0,322	NS	NS	NS
C13:0	0,038	0,078	0,027	0,055	0,062	0,021	NS	NS	NS
C14:0	10,159	11,137	0,382	10,687	10,609	0,291	NS	NS	NS
C14:1	0,318	0,325	0,021	0,295	0,348	0,021	NS	NS	NS
C15:0	0,762	0,895	0,04	0,817	0,839	0,033	NS	NS	NS
C15:1	0,316	0,391	0,038	0,393	0,313	0,033	NS	NS	NS
C16:0	27,36	30,035	1,371	28,358	29,037	1,019	NS	NS	NS
C16:1	0,647 ^a	0,953 ^b	0,078	0,843	0,757	0,08	*	NS	NS
C17:1	0,185	0,234	0,02	0,184 ^a	0,235 ^b	0,014	NS	*	NS
C18:0	9,007 ^a	7,137 ^b	0,501	8,249	7,897	0,4	*	NS	NS
C18:1t	0,553	0,387	0,096	0,432	0,508	0,086	NS	NS	NS
VA	1,035	0,981	0,12	1,088	0,928	0,099	NS	NS	NS
C18:1c9	17,809	17,922	0,798	17,956	17,775	0,584	NS	NS	NS
t10C18:1	0,589 ^a	0,468 ^b	0,022	0,543	0,514	0,018	**	NS	NS
C18:2t	0,422	0,38	0,035	0,461 ^a	0,341 ^b	0,031	NS	*	NS
C18:2c	2,425	2,369	0,244	2,391	0,136	0,186	NS	NS	NS
C20:0	0,082	0,062	0,016	0,069	0,075	0,014	NS	NS	NS
C18:3n3	0,272	0,228	0,016	0,266 ^a	0,234 ^b	0,011	NS	*	NS
e9t11C18:2	0,684	0,762	0,079	0,758	0,688	0,06	NS	NS	NS
C20:4	0,305	0,209	0,08	0,306	0,208	0,075	NS	NS	NS
SCFA	21,848	20,197	1,035	20,713	21,333	0,766	NS	NS	NS
MCFA	16,068	16,968	0,682	16,679	16,357	0,524	NS	NS	NS
LCFA	36,447	37,238	1,493	36,675	37,009	1,135	NS	NS	NS
SFA	74,363	74,402	0,967	74,066	74,698	0,733	NS	NS	NS
PUFA	4,178	3,938	0,345	4,195	3,922	0,269	NS	NS	NS
MUFA	21,46	21,658	0,772	21,742	21,377	0,577	NS	NS	NS
S/U	2,958	2,916	0,152	2,892	2,982	0,115	NS	NS	NS
C12:0+4*C14:0+C16:0/PUFA+MUFA	2,91	3,113	0,166	2,975	3,048	0,126	NS	NS	NS
C14:1/C14:0	0,032	0,031	0,002	0,028	0,034	0,002	NS	NS	NS
C16:1/C16:0	0,023	0,032	0,004	0,03	0,025	0,003	NS	NS	NS
CLA1/VA	0,799	0,829	0,16	0,745	0,883	0,131	NS	NS	NS
C18:1c9/C18:0	2,037	2,596	0,217	2,262	2,371	0,157	NS	NS	NS

Στην περίπτωση του γάλακτος κυριαρχούν ποσοτικά το ελαϊκό, το παλμιτικό και δευτερευόντως το στεατικό και το μυριστικό οξύ. Επιπλέον, σημειώνεται ότι εντοπίστηκαν τα λιπαρά οξέα καπροϊκό (C6:0), καπρυλικό (C8:0) και καπρικό (C10:0) σε υψηλές αναλογίες (π.χ καπρικό 12% επί των συνολικών λιπαρών οξέων) και τα οποία είναι χαρακτηριστικά για το αίγαιο γάλα προσδίδοντας σε αυτό την χαρακτηριστική οσμή του (Silanikove et al., 2010).

Εκ των ακόρεστων λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε αύξηση ($P < 0,05$) της εκατοστιαίας αναλογίας του δεκαεξαενοϊκού οξέος και αριθμητική αύξηση κυρίως του δεκαεπταενοϊκού οξέος και δευτερευόντως του ελαϊκού οξέος. Αντίθετα, η εκατοστιαία αναλογία του trans-10 C18:1 παρουσίασε τάση μείωσης. Επιπλέον,

παρατηρήθηκε αριθμητική αύξηση του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (cis-9,trans-11 C18:2) στην ομάδα της επέμβασης γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων του προηγούμενου πειράματος. Το συγκεκριμένο ισομερές κυριαρχεί ποσοτικά στο γάλα των μηρυκαστικών αφού αντιπροσωπεύει περίπου το 90 % των ολικών ισομερών του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (Loor and Herbein, 2003). Όπως προαναφέρθηκε, παρατηρήθηκε αριθμητική αύξηση του μικροοργανισμού *Butyrivibrio fibrisolvens* (πίνακας 21) το οποίο σχετίζεται με την παραγωγή συζευγμένου λινελαϊκού και βασσενικού οξέος (Durmic et al., 2008). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην ενεργότητα της Δ⁹ αφυδρογονάσης όπως εκτιμήθηκε έμμεσα από τους λόγους C14:1/C14:0, C16:1/C16:0, C18:1/C18:0, cis-9 trans-11 CLA/VA. Σημειώνεται ότι το μεγαλύτερο μέρος του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος παράγεται εντός του μαστού από την δράση της Δ⁹ αφυδρογονάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το βασσενικό οξύ. (Almeida et al., 2013). Μικρότερα ποσά συζευγμένου λινελαϊκού οξέος παράγονται εντός της μεγάλης κοιλίας κατά την βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος τα οποία μεταφέρονται στο γάλα κατόπιν απορρόφησης στο αίμα (Almeida et al., 2013). Το γάλα αποτελεί μια σημαντική πηγή συζευγμένου λινελαϊκού οξέος αφού οι καταναλωτές λαμβάνουν το 75 % της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης από αυτό. Επιπλέον, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος για πολλές ασθένειες (παχυσαρκία, αθηροσκλήρωση, καρκίνος, διαβήτης, φλεγμονές) επιδιώκεται από τους ερευνητές η μεγιστοποίηση της συγκέντρωσής του στο γάλα (Wahle et al., 2004).

Εκ των κορεσμένων λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε μείωση (P<0,05) της εκατοστιαίας αναλογίας του στεατικού οξέος και κατ'επέκταση μείωση (P>0,05) του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, γεγονός που συνεπάγεται βελτίωση της ποιότητας του γάλακτος για τον καταναλωτή. Στη μείωση του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα συνέβαλλε και η αριθμητική αύξηση ορισμένων μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (C16:1, C17:1, C18:1cis-9). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην ανασταλτική επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στις βιοϋδρογονώσεις των ακόρεστων λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα την μείωση της εκατοστιαίας αναλογίας των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Patra, 2011). Ωστόσο, οι μικροβιακοί πληθυσμοί των *Butyrivibrio fibrisolvens* και *Ruminococcus albus* δεν επηρεάστηκαν από την ρίγανη (πίνακας 22). Τα συγκεκριμένα βακτηριακά είδη

σχετίζονται με τις βιοϋδρογονώσεις εντός της μεγάλης κοιλίας (Lejonklev et al., 2013). Ενδεχομένως, η ρίγανη είχε ανασταλτική επίδραση σε άλλα βακτηριακά είδη τα οποία σχετίζονται με τις βιοϋδρογονώσεις των ακόρεστων λιπαρών οξέων όπως πχ. βακτήρια του γένους *Eubacterium spp.* και *Fusocillus spp.* (Kemp et al., 1975) και τα οποία δεν μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Ο αθηρωματικός δείκτης υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $C12:0+4*C14:0+C16:0$ /πολυακόρεστα +μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Ulbricht and Southgate, 1991). Βασίζεται δε σε πρόσφατες μελέτες που συνδέουν το είδος των λιπαρών οξέων με τις συγκεντρώσεις τις HDL και της LDL στο πλάσμα του αίματος. Η εξίσωση αυτή βασίζεται στην πληροφορία ότι μόνο τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με 12-16 άτομα άνθρακα αυξάνουν την LDL (το μυριστικό οξύ είναι τέσσερις φορές πιο αθηρωματικό) ενώ όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ανεξαιρέτως έχουν την αντίθετη δράση. Η μέση τιμή του αθηρωματικού δείκτη ήταν 3,01 στο γάλα των αιγών ενώ δεν επηρεάστηκε από την ρίγανη. Η τιμή αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως χαμηλή αφού οι Turan et al. (2007), προσδιόρισαν μία μέση τιμή της τάξεως των 2,37 σε ιχθύες (*Raja clavata*).

Οι καταναλωτές επιζητούν μείωση της πρόσληψης κορεσμένων και trans λιπαρών οξέων και μεγιστοποίηση στην πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών οξέων. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν αυξημένες συγκεντρώσεις της LDL χοληστερόλης στο αίμα η οποία σχετίζεται με την δημιουργία αθηρωματικών πλακών και καρδιαγγειακών προβλημάτων (Li et al., 2003). Αντιθέτως, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα δρουν προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών προβλημάτων. Έτσι, σε ερευνητικό επίπεδο, υπάρχει η τάση τροποποίησης του προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος ώστε να αυξάνεται η κατανάλωση των οφέλιμων λιπαρών οξέων και ταυτόχρονα να μειώνεται η κατανάλωση των επιζήμιων λιπαρών οξέων. Παρόλα αυτά, ερευνητικές εργασίες οι οποίες μελετάνε την επίδραση της ρίγανης στο προφίλ των λιπαρών οξέων είναι ιδιαίτερα σπάνιες στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων. Οι Malecky et al. (2009) συνολικά δεν παρατήρησαν καμία στατιστικώς σημαντική επίδραση στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος αιγών κατόπιν προσθήκης στο σιτηρέσιο 0,043-0,43 g τερπενίων (λιναλοόλη, π-κυμένιο, α-πινένιο, β-πινένιο)/kg. Ωστόσο παρατήρησαν αριθμητική αύξηση των μονοακόρεστων και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και αριθμητική μείωση ($P=0,06$) του παλμιτικού οξέος γεγονός που

έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Επίσης, οι Benchaar et al. (2007) δεν παρατήρησαν καμία απολύτως επίδραση στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος αγελάδων κατόπιν προσθήκης 750 mg Crina ruminants/ζώο/ημέρα. Από την άλλη πλευρά, σε γαλακτοπαραγωγές αίγες, οι Heidarian Miri et al. (2013), κατόπιν προσθήκης κύμινου (κύρια ουσία ήταν η κινναμαλδεΐδη) σε δοσολογίες της τάξεως των 1,27 % και 2,53 % βάση καταναλισκόμενης ξηράς ουσίας, παρατήρησαν αύξηση ($P < 0,05$) της συγκέντρωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι τα αιθέρια δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις βιοϋδρογονώσεις, τουλάχιστον σε χαμηλές δοσολογίες της τάξεως του 0,5-1,0 g αιθέριου ελαίου/ ημέρα/ζώο. Ωστόσο, η έλλειψη ερευνητικών δεδομένων γύρω από το συγκεκριμένο θέμα καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων.

6.4.Συμπεράσματα

- Το ύψος της γαλακτοπαραγωγής και η χημική σύσταση του γάλακτος (πρωτεΐνη, λίπος, λακτόζη) δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη ρίγανης στο σιτηρέσιο των αιγών.
- Ορισμένοι αντιοξειδωτικοί δείκτες επηρεάστηκαν θετικά από την επηρεάστηκαν από την προσθήκη ρίγανης στο σιτηρέσιο των αιγών, όπως η υπεροξειδάση και η ρεδουκταση της γλουταθειόνης στο γάλα και στο αίμα, η μεταφοράση της γλουταθειόνης στο αίμα και η αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος (τιμή FRAP).
- Παρατηρήθηκε περιορισμένη επίδραση της ρίγανης στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος και συγκεκριμένα μείωση του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα ενώ παράλληλα η εκατοστιαία αναλογία του CLA παρουσίασε τάση αύξησης.
- Συμπερασματικά, η προσθήκη ξηράς δρόγης ρίγανης στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αιγών, συμβάλλει στην βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου γάλακτος.

Κεφάλαιο 7. Γενικός σχολιασμός

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της απώλειας του αιθέριου ελαίου από τα αποξηραμένα φυτά της ρίγανης και από το μείγμα ΣΖ κατά την αποθήκευσή τους. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης ξηράς δρόγης ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων, καθώς επίσης και η επίδραση της στην γαλακτοπαραγωγή αιγών (ύψος, ποιότητα). Αυτός ο τριπλός στόχος προέκυψε από το ενδιαφέρον για την μελέτη των αιθέριων ελαίων στην διατροφή των μικρών, κυρίως μηρυκαστικών ζώων μιας και σχετικές εργασίες σπανίζουν (συνολικά τρεις σε αριθμό) όχι μόνο στο πλαίσιο της αντικατάστασης των αντιβιοτικών αλλά και στην συμβολή της επίτευξης της παραγωγής ζωικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Αυτή η έννοια θα πρέπει, εκτός από την αυστηρή προσέγγιση της ποιότητας (χημική σύσταση και μεταβολή αυτής) των ζωικών προϊόντων, να συμπεριλαμβάνει και την δυνατότητα της βελτίωσης της υγείας των καταναλωτών που είναι και ο τελικός αποδέκτης των προϊόντων αυτών. Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από ποικίλες και αξιοσημείωτες βιολογικές ιδιότητες όπως πχ. αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, υποχοληστεραιμική δράση κ.α. Παρόλο που οι ευεργετικές ιδιότητες τους είναι γνωστές από την αρχαιότητα, έχει παρατηρηθεί αύξηση της χρήσης αιθέριων ελαίων κυρίως κατά την τελευταία δεκαετία. Η κατανάλωση αρωματικών φυτών από τα ζώα έχει ως αποτέλεσμα την ауτούσια μεταφορά των αιθέριων ελαίων στα αυγά, στο κρέας και στο γάλα των παραγωγικών ζώων. Με αυτό τον τρόπο, τα ζωικά προϊόντα μπορούν να μετατραπούν σε λειτουργικά τρόφιμα αφού τα αιθέρια έλαια προσδίδουν σε αυτά ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία οι οποίες υπερβαίνουν την παραδοσιακή θρεπτική τους αξία.

Ωστόσο κατά την βιβλιογραφική ανασκόπηση πριν την έναρξη των *in vivo* δοκιμασιών (πείραμα ζυμωτικών φαινομένων, πείραμα γαλακτοπαραγωγής) δεν βρέθηκαν στοιχεία που να αποδεικνύουν εάν τα αιθέρια έλαια παραμένουν στην τροφή κατά την άλεση ή για ποιο χρονικό διάστημα οι απώλειες είναι σημαντικές. Έτσι, έπρεπε να προηγηθεί μια σχετική δοκιμασία (πείραμα απώλειας αιθέριου ελαίου) πριν την έναρξη των *in vivo* δοκιμασιών με στόχο να προσδιοριστεί με ακρίβεια το χρονικό διάστημα που επιτρέπει την ανάμειξη και αποθήκευση του μείγματος της ξηράς δρόγης και της τροφής. Η γνώση αυτή είναι σημαντική για τον παραγωγό διότι έτσι μόνο θα μπορεί να προγραμματίζει κάθε πότε θα πρέπει να γίνεται η άλεση και η ανάμειξη της ξηράς δρόγης με την τροφή. Στις περισσότερες

μελέτες, οι ερευνητές πραγματοποιούν την ανάμειξη των αρωματικών φυτών με το μείγμα ΣΖ ιδιαίτερα τακτικά (σε καθημερινή βάση ή κάθε 3 μέρες κ.α). Ωστόσο μια τέτοια ενέργεια είναι περιττή και οπωσδήποτε μη πρακτική για ένα παραγωγό, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, προέκυψε η ανάγκη για την δημιουργία μιας μεθοδολογίας προσδιορισμού (η οποία επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία) των αιθέριων ελαίων (ποσότητα, προφίλ) στην τροφή, η οποία δεν υπήρχε μέχρι σήμερα στην διεθνή βιβλιογραφία.

Τα *in vivo* αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έδειξαν ότι η κατανάλωση ρίγανης (20 g ξηράς δρόγης ή 1 ml αιθέριου ελαίου/ημέρα) από αίγες τροποποιεί τα ζυμωτικά φαινόμενα, μειώνει την παραγωγή μεθανίου ενώ παράλληλα βελτιώνει την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος. Η τελευταία βελτιώνεται κυρίως μέσω αύξησης της εκατοστιαίας αναλογίας των ακόρεστων λιπαρών οξέων, της ενζυμικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η αύξηση της δραστηριότητας ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων κατόπιν κατανάλωσης ρίγανης επιβεβαίωσε την θεωρία ‘προετοιμασίας για το οξειδωτικό στρες’ και σε αίγες κάτι που είχε αποδειχθεί μόνο σε ιχθείς μέχρι σήμερα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η επιλεγθείσα δοσολογία (1ml/ημ/ζώο) παρουσίασε μια σχετικά καλή ανταπόκριση στην παρούσα εργασία. Στις περισσότερες μελέτες δεν παρατηρούνται απαραίτητα κάποιες θετικές επιδράσεις αφού η ανταπόκριση των παραγωγικών ζώων στα αιθέρια ελαία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες π.χ. είδος ζώου, το σιτηρέσιο, τις συνθήκες εκτροφής, το στάδιο χορήγησης κ.α. Αντίστοιχη ερευνητική εργασία που να μελετά το σύνολο των προαναφερθέντων παραμέτρων δεν υπάρχει τουλάχιστον όσον αφορά τις αίγες.

Ωστόσο, κατά την διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψαν πολλά ερωτήματα που χρήζουν άμεσης απάντησης στο μέλλον. Καταρχήν, προκύπτει το ερώτημα ποιά είναι αντίστοιχα η απώλεια σε αιθέριο έλαιο διάφορων άλλων φυτών κατά την αποθήκευση του μείγματος ξηράς δρόγης και τροφής. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι η χώρα μας χαρακτηρίζεται από μια ιδιαίτερα πλούσια χλωρίδα η οποία περιλαμβάνει πολλά είδη αρωματικών φυτών όπως πχ. το θυμάρι, το φασκόμηλο, η μέντα κ.α. Ένα άλλο σημαντικό ερώτημα είναι το πόσο σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η συνέργεια μεταξύ των διάφορων συστατικών της ρίγανης έστω και αν η καρβακρόλη ήταν το κυρίαρχο ποσοτικά συστατικό. Ένα δεύτερο σχετικό ερώτημα είναι το αν ο συνδυασμός διάφορων αρωματικών φυτών θα είχε τις ίδιες ή

διαφορετικές επιδράσεις. Επιπλέον, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να ελεγχθεί εάν η κατανάλωση ρίγανης (στην ίδια δοσολογία) από πρόβατα θα είχε τις ίδιες ή διαφορετικές επιδράσεις (πχ. στα αντιοξειδωτικά ένζυμα). Τέλος, οφείλει να προσδιοριστεί στο μέλλον η βέλτιστη δοσολογία της ρίγανης κάτι που δεν είναι γνωστό ακόμη και σήμερα.

Γ Βιβλιογραφία

Ελληνική

Αϊναλίδου Α., (2008). Δευτερογενείς μεταβολίτες από φυτά της ελληνικής χλωρίδας με επίδραση στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Μεταπτυχιακή διατριβή. Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας. Σχολή Γεωπονίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Καραμπουρνιώτης, Γ.Α. (2003). Η άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Σε: Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες.

Παπαναγιώτου Ε., Παπανικολάου Κ., Ζαμανίδης Σ., (2001). Η καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα. *Γεωργία και κτηνοτροφία 1*: 36-42.

Σκουμπρής Γ.Β., (1998). Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

Σκουμπρής Γ.Β., (1985). Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Εκτύπωση OFFSET Γιαχούδη-Γιαπουλή Ο.Ε. Θεσσαλονίκη.

Τζουραμάνη Ε., Ναβρουζόγλου Π., Σιντόρη Α., Λιοντάκης Α., Παπαευθυμίου Μ., Καρανικόλας Π., Αλεξόπουλος Γ., (2012). Ρίγανη. *Ινστιτούτο Γεωργοοικονομικών και Κοινωνιολογικών Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, (ΕΘΙΑΓΕ)*.

Ξενόγλωσση

Aburjai T., Natscheh F., (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, 17:987-1000.

Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46: 1739-1745.

Adams R.P., (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

Ahmet C., Saban K., Hamdullah K., Ercan K., (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33:245-256.

Al-Reza S., Rahman A., Lee J., Kang S., (2010). Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry* 119: 981-986.

Alcicek A., Bozkurt M., Cabuk M., (2003). The effect of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. *S. Afr. J. Anim. Sci* 34:217-212.

Alcicek A., Bozkurt M., Cabuk M., (2004). The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in turkey and broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 33:89-94.

Allan P., Bilkei G., (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63: 716–721.

Almeida O.C., Pires A.V., Susin I., Gentil R.S., Mendes C.Q., Queiroze M.A., Ferreirac E.M., Eastridge M.L., (2013). Milk fatty acids profile and arterial blood milk fat precursors concentration of dairy goats fed increasing doses of soybean oil. *Small Ruminant Research* 114: 152– 160.

Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itacura ., (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition* 131: 955-962.

Amamcharia J.K., and Metzger L.E., (2013). Modification of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay to determine the susceptibility of raw milk to oxidation. *Accepted Unedited manuscript to appear in International Dairy journal*.

Amber K., Aijaz A., Immaculata X., Luqman K.A., Nikhat M., (2010). Anticancer effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and cetozazole. *Phytomedicine* 50: 35-40.

Anderson C., Lis-Balchin M., Kirk-Smith M., (2000). Evaluation of massage with essential oils on childhood atopic eczema. *Phytother. Res.*, 14: 452-456.

Ando S., Nishida T., Ishida M., Kochi Y., Se S., (2001). Transmission of herb essential oil to milk and change of milk flavor by feeding dried herb to lactating *Holstein* cows. *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi*, 48:142-145.

Ando S., Nishida T., Ishida M., Hosoda K., Bayara E., (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82:245-248.

Anson M.L., (1938). *J. Gen. Physiol.* (22): 79-89.

Anthony A., Caldwell G., Hutt A.G., Smith R.L., (1987). Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1-hydroxyestragole. *Food Chem. Toxicol.*, 25:799-806.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P., (2010). Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research* 24:673-679.

Ariza-Nieto C., Bandrick M., Baidoo S.K., Anil L., Molitor T.W., Hathaway M.R., (2011). Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. *J. ANIM. SCI.* 2011, 89:1079-1089.

Aurand L.W., Boone N.H., Giddings G.G., (1977). Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *Journal of Dairy Science*, 60, 363-369.

Azzouz, M.A. and L.R. Bullerman, 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs and spices, plant components and commercial antifungal agents. *J. Food Protect.*, 45: 1248-1301.

Bagetta G., Morrone L.A., Rombola L., Amantea D., Russo R., Berliocchi L., Sakurada S., Sakurada T., Rotiroti D., Corasaniti T., (2010). Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fytotherapia* 81:453-461.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446–475.

Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., Spais A.B., Chatzopoulou P.S., (2005a). Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology* 121: 285-295.

Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., Chatzopoulou P.S., Tsiligianni T., Spais A.B., (2005b). Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *Br. Poult. Sci.* 46:591-601.

Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., (2006). Effect of dried oregano leaves versus neomycin treating newborn calves with colibacillosis. *Journal of Veterinary Medicine A*, 53:154-156.

Banthorpe D.V., (1994). *Terpenoids*. In *Natural products: their chemistry and biological significance* pp 289-359 Eds J Mann, RS Davidson, JB Hobbs, DV Banthorpe and JB Harborne Longman Scientific and Technical, Harlow.

Basmacioglu H., Tokusoglu O., Ergul M., (2004). The effect of oregano and rosemary by essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFAs in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34:197-210.

Basset R., (2000). Oregano's positive impact on poultry production. *World Poult.* 16: 31-34.

Batish D.R., Harminder P.S., Kohli R.K., Kaur S., (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166-2174.

Baumman D.E., Baugmard L.H., Corl B.A., Griinari J.M., (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.

Bayramoglu B., Sahin S., Sumnu G., (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88:535-540.

Beauchemin K.A., McGinn S.M., (2006). Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. *J. Anim. Sci.*, 84:1489-1496.

Beers R.F.Jr., and Sizer I.W., (1952). *Journal of biological chemistry* 195: 133-140.

Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., Whyte T.D., Chouinard P.Y., (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89: 4352-4364.

Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., Guellet D.R., Chiquette J., Chouinard P.Y., (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial

populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.*, 90: 886-897.

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A., (2008a). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145 (2008) 209–228.

Benchaar C., McAllister T.A., Chouinard Y., (2008b). Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannins, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.*, 91: 4765-4777.

Benchaar, C., Hristov, A.N., and Greathead, H. (2009). Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. in Steiner, T. (ed.) - *Phytogenics In Animal Nutrition: Natural Concepts To Optimize Gut Health And Performance*, Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Bernfield P., (1955). *Methods in enzymology* (1):149-158.

Boadi D., Benchaar C., Chiquette J., Masse D., (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84:319-355.

Botsoglou A., Grigoropoulou S.H., Botsoglou E., Govaris A., Papageorgiou G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and [alpha]-tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65: 1193–1200.

Botsoglou A., Christaki E., Florou-Paneri P., Giannenas I., Papageorgiou G., Spais A.B., (2004). The effect of a mixture of herbal essential oils or α -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34:52-61.

Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brenes A., Roura E., (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*.

Bryant M.P., Small N., (1956). The anaerobic monotrachus butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria in the rumen. *J. Bacteriol.*, 72: 16-21.

Borchers R., (1965). Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J.Anim.Sci.* 24:1033-1038.

Bruneton J., (1999). Pharmacology, phytochemistry, medicinal plants: essential oils. 2nd ed. Lavoisier Publishing, New York, pp.461-780.

Buchbauer G., (1993). Perfum. *Flavor.*, 18:19-24.

Buddle B.M., Denis M., Attwood G.T., Altermann E., Janssen P.H., Ronimus R.S., Pinares-Patino C.S., Muetzel S., Wedlock D.N., (2010). Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*.

Burkey J.L., Sauer J.M., McQueen C.A., Sipes I.G., (2000). Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners- a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat. Res.* 453:25-33.

Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* (94): 223-253.

Burt S., Der Zee A., Koets R.V., De Graaff A.P., Van Knapen A.M., Gaastra W., (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4484-4490.

Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2005). Screening for the effects of natural plant extracts and secondary metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123/124:597-613.

Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2006). Plant extracts affect in vivo rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89:761-771.

Buzadzic, B., Spasic, M., Saicic, Z.S., Radojicic, R., Petrovic, V.M., Haliwell, B., 1990. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 407-413.

Çabuk M., Bozkurt M., Alçiçek A., Akbağ Y., Küçükyılmaz K., (2006). Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. *South African Journal of Animal Science*, 36: 135-141
Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen fermentation. *J. Dairy Sci*, 90:2580-2595.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2005a). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.*, 84: 2801-2808.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2005b). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83:2572-2579.

Carson C.E., Hammer K.A., Riley T.V., (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 19: 50-62.

- Cavaleiro C., Pinto E., Goncalves M.J., Salgueiro L., (2006). Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1333-1338.
- Casado A., Torre R., Lopez-Fernandez E., Carrascosa D., Casado M., Ramirez V., (1995). Superoxide dismutase and catalase blood levels in patients with malignant diseases. *Cancer letters* 93:187-192.
- Cassel E., Vargas R.M.F., Martinez N., Loreno D., Dellacassa E., (2009). Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Corps and Products* 29:171-176.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R., (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim.Feed S.Technol.*, 119:29-41.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A (2006). Effect of essential oils active components on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J. Dairy Sci.* 89:2649-2658.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R., (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 132: 186-201.
- Cervato G., Carabelli M., Gervasio S., Cittera A., Gazzola R., Cestaro B., (2000). Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. *J. Food Biochem.*, 24, 453-465.
- Cetin H., Cilek J.E., Aydin L., Yanikoglu A., (2009). Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari:ixodidae). *Veterinary Parasitology* 160:359-361.
- Chaves A.V., Stanford K., Gibson L.L., McAllister T.A, Benchaar C., (2008a). Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology* 145:396–408.

Chaves A.V., Stanford K., Dugan M.E.R., Gibson L.L., McAllister T.A., Van Herk F., Benchaar C., (2008b). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science* 117: 215–224.

Chen M.S., (2008). Inducible direct plant defense insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15: 101-114.

Chen, W.P., Matsuo, M., and Yasui, T. (1986). *Agric. Biol. Chem.* (50): 1183-1194.

Chen W., Lu Y., Gao m., Wu J., Wang A., Shi R., (2010). Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*.

Chizzola R., Hochsteiner W., Hajek S., (2004). GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. *Research in Veterinary Science*, 76: 77-82.

Ciftci M., Guler T., Dalkilic B., Ertas O.N., (2005). The effect of anise oil (*Pimpinella anisum* L.) on broiler performance. *International journal of poultry science* 4 (11): 851-855.

Chipault J.R., Mizuno G.R., Lundberg W.O., (1952). The antioxidant properties of spices in food. *Food Technol.* 10:209-211.

Colby K.A., Blaustein M.P., (1988). *Neuroscience* 8:4685.

Cornelison J. M. Yan F., Watkins S. E., Rigby L., Segal J. B., Waldroup P. W. (2006). *Int. J. Poultry Sci*, 5(2):134

Conha C., Hu S., and Holmberg O., (1996). The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and gingseng in vitro. *Vet. Res.* 27: 107-115.

Craig W.J., (1999). Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 491-499.

Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2: 228-243.

Daferera D., Ziogas B.N., Polissiou M.G., (2000). GS-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 48: 256-2581.

Da Porto C., Decorti D., (2009). Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavor compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation. *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 795-799.

Deans S.G., and Richie G., (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 165-180.

Demeyer D., Fievez V., (2000). Ruminants et environnement: la methanogenese. *Annales de Zootechnie* 49: 95-112.

Denli, M., Okan, F., Uluocak. A.N., (2004). Effect of dietary supplementation of herb essential oil on growth performance, carcass and intestinal characteristics of quail. *S. Afr. J. Anim. Sci* 34:174-179.

Desage M., Schaal B., Soubeyrand J., Orgeur P., Brazier J.L., (1996). Gas chromatographic-mass spectrometric method to characterize the transfer of dietary odorous compounds into plasma and milk. *Journal of Chromatography* (687): 205-210.

Di Trana A., Celi P., Claps S., Fedele v., Rubino R., (2006). The effect of hot season and nutrition on the oxidative status and metabolic profile in dairy goats during mid lactation. *Animal Science* (82): 717-722.

Dijkstra J., (1994). Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science*, 39:61-69.

Dijkstra J., Tamminga S., (1995). Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradating of fibre in the rumen. *Br.J.Nutr.*, 74:617-634.

Dordas C., (2009). Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield and essential oil yield of oregano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*). *Industrial Crops and Products* 29:599-608.

Dorman and Deans (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.

Droge W., (2002). Free radicals in the physiological control cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

Durmic Z., McSweeney C.S., Kemp G.W., Hutton P., Wallace R.J., Vercoe P.E., (2008). Australian plants with potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 271-284.

Dziba L.E., Provenza F.D., (2008). Dietary monoterpene concentrations influence feeding patterns of lambs. *Applied animal Behaviour Science*, 109:49-57.

Economou G., Panagopoulos G., Tarantilis P., Kalivas D., Kotoulas V., Travlos I.S., Polysiou M., Karamanos A., (2011). Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L., populations from the Greek island Ikaria. *Industrial Crops and Products* 33:236-241.

Edris A.E., (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research* 21: 308-323.

Edwards J.E., McEwan N.R., Travis A.J., Wallace R.J., (2004). 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:263-281.

Enan E., (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130:325-337.

Enan E., Beigler M., Kende A., (1998). Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors. *In: Proceedings of the International Symposium on Plant Protection, Gent, Belgium.*

- Estell R.E., Fredrickson L., Tellez M.R., Havstad K.M., Shupe W.L., Anderson D.M., and Remmenga M.D., (1998). Effects of Volatile Compounds on Consumption of Alfalfa Pellets by Sheep. *J. Anim. Sci.* 76:228–233.
- Estell R.E., Utsumi S.A., Cibils A.F., (2010). Measurement of monoterpenes and sesquiterpenes in serum, plasma and rumen fluid from sheep. *Animal Feed Science and Technology* (158): 104-109.
- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerotheranassis I., Troganis A., Boskou D., (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5294-5299.
- Evans J., Martin S., (2000). Effects of thymol non ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41: 336-340.
- Fan M., Chen J., (2001). Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 41: 499-504.
- Fandino I., Calsamiglia S., Ferret A., Blanch M., (2008). Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Animal Feed Science and Technology* 145 (2008) 409–417.
- Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D., (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine* (35): 236-256.
- Fellner V., Sauer F.D., Kramer J.K., (1997). Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J. Dairy Sci.*, 80:921-928.
- Florou-Paneri P., Giannenas I., Christaki E., Govaris A., Botsoglou N., (2006). Performance of chickens and antioxidative stability of the produced meat as affected by feed supplementation with oregano, vitamin C, vitamin E, and their combinations. *Arch. Geflügelkd*, 70: 232.
- Finlay B.J., Esteban G., Clarke K.J., Williams A.G., Embley T.M., Hirt R.P., (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117:157-162.

Firkins J., (1996). Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of Nutrition, Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization*.

Fox P.F., and Kelly A.L., (2006). Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects-part 2. *International dairy journal 16: 517-532*.

France J., Siddons R.C., (1993). Volatile fatty acid production. In: Forbes, J.M., France, J., (Eds). Quantative aspects of ruminal digestion and metabolism. *CAB International, Campridge, UK*.

Frankic T., Voljc M., Salobir J., Rezar V., (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta argiculturae Slovenica, 94/2:95-102*.

Franzios G., Mirotsou M., Hatzia Apostolou E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P., (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem. 45:2690-2694*.

Fricke W.F., Seedorf H., Henne A., Kruer M., Liesegang H., Hedderich R., Gottschalk G., Thauer R.K., (2006). The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J.Bacteriol, 188:642-658*.

Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E., (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritica*. *J.Food Protect. 65: 1545-1560*.

Giannenas I., Skoufos J., Giannakopoulos C., Wiemann M., Gortzi O., Lalas S., and Kyriazakis I., (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J. Dairy Sci. 94 :5569–5577*.

Granelli K., Bjorck L., Appelqvist L-A., (1995). The variation of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XO) activities in milk using an improved method to quantitate SOD activity. *J Sci Food Agric (67): 85-91*.

Greathead H., (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society, 62:279-290*.

Griinari J.M., Bauman D.E., (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Pariza M.W., Nelson G.J., (Eds), *Advances in conjugated linoleic acid research. AOCS Press, Champaign, IL, USA, pp180-185.*

Golmakani M.T., Rezaei K., (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris L.* *Food Chemistry* 109: 925-930.

Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S., (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 175-180.

Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Halliwel B., (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of nutrition*, (16): 33-50.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (45): 51–88.

Hegarty R., Nolan S., Leng R.A., (1994). The effects of protozoa and of supplementation with nitrogen and sulfur on digestion and microbial metabolism in the rumen of sheep. *Aust. J. Agric. Res.*53: 1215-1227.

Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 537–556.

Hoet S., Stevigny C., Herent M.F., Quetin-Leclercq J., (2006). Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa* plant. *Med.*, 72: 480-482.

Hossain M.A., Ismail Z., Rahman A., Kang S.C., (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Corps and Products* 27: 328-334.

Hristov A.N., Ropp J.K., Grandeem K.L., Abedi S., Etter R.P., Melgar A., Foley A.E., (2005). Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *J.Anim.Sci*, 83:408-421.

Huang M.T., Ferraro T., Ho C.T., (1994). Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 546:2-15.

Isobe N., Kubota H., Yamasaki A., Yoshimura Y., (2011). Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows. *J.Dairy Sci.* 94:3868-3874.

Isman M.B., (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 18: 603-608.

Isman M.B., (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.

Kanwar S.S., Kaushal R.K., Jawed A., Gupta R., and Chimni S.S., (2005). Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (42): 233-237.

Kepler C.R., Tove S.B., (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242: 5686-5692.

Kitchen B.J., Taylor G.C., White I.C., (1970). Milk enzymes- their distribution and activity. *Journal of Dairy Research* 37: 279-288.

Koike S., Kobayashi Y., (2009). Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and function. *Asian-Aust.J.Anim.Sci*, 22 (1):131-138.

Kraszewski J., Wawrzynczak S., Wawrzynski M. (2002). Effect of herb feeding on cow performance, milk nutritive value and technological suitability of milk for processing. *Annals of Animal Science*, 2, 1: 147–158.

Krauwieser J., Schnotzler J.P., Steinbrecher R., (1999). Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. *Plant Biol* 1:149-159.

Kyriakis S.C., Sarris K., Lekkas S., Tsinas A.C., Giannakopoulos C.G., Alexopoulos C., Saoulidis K.,(1998). *In proceedings of the 15th Internat.Pi9g Vet Soc (IPVS) Congress, Birmingham, UK:106.*

- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E., (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Leong J., Morel C.H., Purchas W., Wilkinson H.P., (2010). The production of pork with garlic flavor notes using garlic essential oil. *Meat Science* 84: 699-705.
- Lichtenhaler H.K., (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 50:47-65.
- Lovley D.R., Greening R.C., Ferry J.G., (1984). Rapidly growing rumen methanogenic organism that synthesizes coenzyme M and has a high affinity for formate. *Appl.Microbiol.*, 48: 81-87.
- Luchini N.D., Broderick G.A., Combs D.K., (1996). Characteristics of the proteolytic activities and strained ruminal fluid. *J.Anim. Sci.*,74:685-692.
- Gamiz-Garcia L., De Castro M.D., (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta* 51:1179-1185.
- George D.R., Smith T.J., Sparagano O.A.E., Guy J.H., (2008). The influence of ‘time since last blood meal’ on the toxicity of essential oils to the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Veterinary Parasitology* 155: 333-335.
- Giannenas I., Florou-Paneri P., Papazahariadou M., Christaki E., Botsoglou N.A., spais A.B., (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch. Anim. Nutr.* 57:99-106.
- Giannenas I., Skoufos J., Giannakopoulos C., Wiemann M., Gortzi O., Lalas S., and Kyriazakis I., (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 94 :5569–5577.
- Ghelardini C., Galeotti N., Salvatore G., Mawwanti G. (1999). *Planta Med.*, 65:700-703

Gollnisch K., Wald C., Berk A., (2001). Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung. Pflanzliche Nahrungsmittel e.V. In *Zusammenarbeit mit der Vereinigung für Angewandte Botanik, Jena, Germany*:259.

Gordon M.H., Kourimska (1995). The effect of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *J Sci Food Agric* 68:347-353.

Guller T., Erta O.N., Ciftci M., Dalkilic M., (2005). The effect of coriander seed (*Coriandrum sativum* L.) as diet ingredient on the performance of broilers. *S.Afr.J. Anim.Sci.* 35:261-267.

Gunther K.D., Bossow H., (1998). In proceedings of the 15th Internat. *Pig Vet. Soc. (IRVS) Congress, Birmingham UK*:223.

Gustafsson A.H., Palmquist D.L., (1993). Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J.Dairy Sci.*, 76:475-484.

Grabman J., (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones* 72: 505-535.

Greathead H., (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *proceedings of the nutrition Society*, 62: 279–290.

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation.

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.

Hagvall, L., Bäcktorp, C., Svensson, S., Nyman, G., Börje, A., Karlberg, A.T., (2007). Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 807–814.

Halle I., Thoman R., Flachowsky G., (1999). In 7th Symposium on Vitamins and Additives in the Nutrition of Man and Animals, *Jena, Germany*:469.

Halle I., Thomann R., Bauermann, U., Henning M., (2004). *Landbauforsch. Völkenrode* 4(54): 219.

- Halliwell B., (1996). Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 16: 33-50.
- Hammer K.A., Carson C.E., Riley T.V., (2004). Antifungal effects of *Melauleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicro Chem* 12: 1-5.
- Hausen, B.M., Reichling, J., Harkenthal, M., (1999). Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agents in tea tree oil. *Am. J. Cont. Derm.* 10: 68–77.
- Hart K.J., Yanez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J., (2008). Plants extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147:8-45.
- Haselmeyer A., (2007). Dissertation, University of Veterinary Medicine, Vienna.
- Heidarian Miri V., Tyagi A.K., Ebrahimi S.H., (2013). Effect of cumin (*Cuminum cuminum*) seed extract on milk fatty acid profile and methane emission in lactating goat. *Small ruminant research* 113:66-72.
- Hernandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias M.D., (2004). Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility and digestive organ size. *Poult. Sci.* 83: 169-174.
- Hijazi A.M., Salhab A.S, (2010). Effects of *Artemisia monosperma* ethanolic leaves on implantation, mid-term abortion and parturition of pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 446-451.
- Holmes C.A., (2007). IENICA European Summary Report 2000-2005.
- Horton G.M.J., Blethen D.B., Prasad B.M., (1991). The effect of garlic (*Allium sativum*) on feed palatability of horses and feed consumptions, selected performance and blood parameters in sheep and swine. *Canadian Journal of Animal Science*, 71: 607-610.
- Hristov A.N., Jouany J.P., (2005). Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. In Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: reducing the environmental impact of cattle operations pp 117-166 Eds R Pfeffer and Hristov AN. CAB international, Wallingford, UK.

Hugmuller W., Jugl-Chizzola M., itteri-Eglseer K., Gabler C., Spergser J., Chizzola R., Franz C., (2006). *Berl.Munch. Tierarzt, Wochenschr* 199:50.

Huntington G.B., Archibeque S.L., (1999). Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1-11.

Jacobsen C., Let M.B., Nielsen N.S., Meyer A.S., (2008). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavor deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends in Food Science &Technology* (19): 76-93.

Janz J.A.M., Morel P.C.H., Wilkinson B.H.P., Purchas R.W., (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat science*, 75: 350-355.

Jarvis A.P., Morgan E.D., (1997). Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction. *Phytochemical Analysis* 8:217-222.

Jian Qin C., (1993). *Encyclopaedia of food science, Food Technology and Nutrition* (1993). *Academic Press*.

Johnson K.A., Johnson D.E., (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 43:2839-2845.

Jouany J.P., (1996). Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*, 126: 1335-1346.

Juven B.J.J., Kanner F., Schved F., Weisslowicz H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76:626-631.

Keeseey J., (1987). *Biochemica Information*, pp. 49, First Edition, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN.

Kelly M.L., Berry J.R., Dwyer D.A., Griinari J.M., Chouinard P.Y., Van Amburg M.E., Bauman D.E., (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *American Society for nutritional Sciences*, pp., 881-885.

Kemp P., White R.W., Lander D.J., (1975). The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J Gen Microbiol. Sep;90(1):100-14.*

Kikuzaki H., Nakatani N., (1989). Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem., 53: 519-524.*

Kırkpınar F., Ünlü H.B., Özdemir G., (2011). Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livestock Science Volume 137, Issues 1–3, May: 219–225.*

Kintzios S.E., (2002). Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E., (ed), *Oregano: The genera Origanum and Lippia. Taylor and Francis, London, pp 3-8.*

Koike S., Kobayashi V., (2009). Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and function. *Asian-Aust.J.Anim.Sci., 22 (1):131-138.*

Kohler H, Jenzer H (1989). Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide. Formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. *Free Radic. Biol. Med. 6 (3): 323–39.*

Kokkini S., (1994). Herbs of Labiatae. In: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, R. Macrae, R., Robinson, M., Sadler, G., Fuellerlove, (eds), Academic press, London, UK, pp.2342-2348.*

Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N., Lanaras T., (1996). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry, 44: 883-886.*

Korycka-Dahl M., Richardson T., Hicks C., (1979). Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J Food Protect 42: 867-871.*

Krause E.L., Ternes W., (1999). Bioavailability of the antioxidative thyme compounds thymol and π -cymene-2,3-diol in eggs. *Eur Food Res Technol 209:140-144.*

Kreismayr A., Sehm J., Ptaffl M., Plitzner C., Foissy H., Ettle T., Screiner M., Windisch W., (2008). *J. Land Manage. Food Environ*, 59:111.

Kuehn B.M., (2005). CDC: new repellents for West Nile fight. *JAMA* 293: 2583.

Kung Jr.L., P. Williams, R. J., Schmidt,* and Hu W., (2008). A Blend of Essential Plant Oils Used as an Additive to Alter Silage Fermentation or Used as a Feed Additive for Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:4793–4800.

Lai E.Y., Chyuau C.C., Mau J.L., Chen C.C., Lai Y.J., Shih C.F., Lin L.L., (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. *The American Journal of Chinese Medicine* 32: 281-290.

Lahlou M., (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J.*, 19:159-165.

Lambert R.,J.,W., Scandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453-462.

Lee W., Everts H., Kappert H.J., Frehner M., Losa R., Beynen A.C., (2003). Effect of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, 44:450.

Lejonklev J., Storm A.C., Larsen M.K., Mortensen G., Weisbjerg M. R., (2013). Differences in rate of ruminal hydrogenation of C18 fatty acids in clover and ryegrass. *The Animal Consortium: 7:10*, pp 1607–1613.

Li D., Bode O., Drummond H., Sinclair A.J., (2003). Omega-3 (n-3) fatty acids. In: Gunstone F.D., (E.D), *Lipids for functional foods Nutraceuticals*. *The Oily Press, UK*, pp.225-262.

Lindmark-Mansson H., and Akesson B.,(2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition* 84: *Suppl.*, 1, S103-S110.

Lindmark-Mansson H., Chen J., Paulsson M., Alden G., Ren B., Ladenstein R., Akesson B., (2001). The effects of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey. *International dairy journal* 11: 71-81.

Lippens M., Huyghebaert G., Cerchiari E. (2005). Effect of the use of coated plant extracts and organic acids as alternatives for antimicrobial growth promoters on the performance of broiler chickens. *European poultry Science*, 6: 48–56.

Liu Q., Wang C., Pei C.X., Li H.Y., Wang Y.X., Zhang S.L., Zhang Y.L., He J.P., Wang H., Yang W.Z., Bai Y.S., Shi Z.G., Liu X.N., (2014). Effects of isovalerate supplementation on microbial status and rumen enzyme profile in steers fed on corn stover based diet. *Livestock science* 161: 60-68.

Loo A., Richard H., (1992). Nature, origine et proprietes des epices et des aromates bruts. In: Epices et Aromates. Richard H., (ed.), *Paris, Lavoisier*:18-22.

Loor , J.J., Herbein J.H., (2003). Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 103: 63–83.

Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am.J. Physiol.* 280, R100–R107.

Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B., (2005). Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1319–1330.

Lykkesfeldt J., and Svendsen O., (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet. J.*, 173:502-511.

MacCord J.M., and Fridovich I., (1969). *J Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

Machado M., Santoro G., Sousa C., Salgueiro L., Cavaleiro C., (2010). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastogotes. *Flavour fragr J* 25:156-160.

Macedo T.F., Bevilaqua M.L., Oliveira M.B., Camurca-Vasconcelos L.F., Vieira L., Oliveira F.R., Queiroz-junior M., Tome A.R., Nascimento N.R.F., (2010). Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 173: 93-98.

Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J., (1993). Spices and flavouring crops: Properties and analysis. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Academic press.

Maiti S., Bhatt C., Patel P., Ghosh P.K., (2012). Use of solar thermal energy in the hydrodistillation of essential oil.:

Maffei M.E., (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76 (2010) 612–631.

Malecky M., Fedele V., Broudiscou L., (2008). In vitro degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilica rangelands (southern Italy). *J Sci Food Agri* 89:531-536.

Malecky M., Broudiscou L.P, Schmidely P., (2009). Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Animal Feed Science and Technology* 154 (2009) 24–35.

Marino M., Bersani C., Comi G., (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L., measured using a bioimpedometric method. *J Food Protect*, 62: 1017-1023.

Marino M., Bersani C., Comi G., (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 6: 187-195.

Marounek M., Bartos S., Brezina P., (1985). Factors influencing the production of volatile fatty acids from hemicelluloses, pectin and starch by mixed culture of rumen

microorganisms. *Zeitschrift fur Tierphysiology, Tierernahrung und Futtermittelkunde*, 53: 50-58.

Martin B., Priolo A., Valvo M.A., Micol D., Coulon J.B., (2005). Effect of grass feeding on milk, cheese and meat sensory properties. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneens* 67: 213-223.

Martin C., Morgavi P., Doreau M., (2009). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *The animal consortium*, 3:351-355.

Matsuda H, Morikawa T, Managi H, Yoshikawa M. (2003). Antiallergic principles from *Alpinia galanga*: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF-alpha and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 13(19):3197-202.

Matsuda H., Tewtrakul S., Morikawa T., Nakamura A., Yoshikawa M., (2004). Antiallergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF-alpha and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12: 5891-5898.

Mavis, R.D. and Stellwagen, E. (1968). *Journal of Biological Chemistry* 243, 809-814.

Meyer N.F., Erickson G., Klopfenstein T., Greenquist M.A., Luebbe M., (2009). Effect of essential oil tylosin and monensin on finishing steer performance carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation and digestibility. *Faculty Papers and Publication in Animal Science*, paper 607.

Mayland-Quellhorst D., (2002). Master's Thesis, *Fachhochschule, Osnabrück, Germany*.

McDermott P.F., Zhao S., Wanger D.D., Simjee S., Walker R.D., White D.G., (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotechnol*. 13:71-84.

MacKenzie H.A., (1971). Milk proteins chemistry and molecular biology. Edited by Hugh A. McEnzie. *Volume II. Academic press, New York and London*.

McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace J., Beever D.A., Newbold C.J., (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5011-5014.

McGinn N.M., Beauchemin K.A., Contes T., Colombatto D., (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J. Anim. Sci.*, 82:3346-3356.

Meyer N.F., Erickson G.E., Klopfenstein T.J., Greenquist M.A., Luebbe M.K., Williams P., and Engstrom M.A., (2009). Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *J. Anim. Sci.*, 87:2346–2354.

Melo A.C.F.L., Reis I.F., Bevilacqua C.M.L., Vieira L.S., Echevarria F.A.M., Melo L.M., (2003). Nematodeos resistentes a anti-helminticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceara, Brazil, *Cienc. Rur*, 33, 339-344.

Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.*, 17: 235-248.

Michiels, J, Missotten, J, Dierick, N, Fremaut, D, Maene, P and De Smet, S., (2008). *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and *trans*-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *J Sci Food Agric*, 88: 2371–2381.

Michiels J., Missotten J., Hoorick A.V., Obyn A., Fremaut D., De Smet S., Dierick N., (2011). Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 64:136-154.

Milos M., Makota D., (2012). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and π -cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry* 131: 296-299.

- Misharina, T.A, Polshkov, A.N., Ruchkina, E.L., Medvedeva, I.B., (2003). Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39: 311–316.
- Misra G., Pavlostathis S.G., (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 572-577.
- Mumcuoglu K.Y., Galun R., Bach U., Miller J., Magdassi S., (1996). Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol. Experiment. Appl.*, 78:309-314.
- Muyima N.Y.O., Zulu G., Bhengu T., Popplewell D., (2002). The potential application of some novel essential oils as natural cosmetics preservatives in an aqueous cream formulation. *Flavor and Fragrance Journal* 17: 258-266.
- Molero R., Ibars M., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R., (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*, 114:91-104.
- Naderi G., Asgary S., Sarraf-Zadegan N., Safari M., (2004). Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. *Mol Cell Biochem* 267: 59-66.
- Nagajara T., Towne G., Beharka A.A., (1992). Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2410-2414.
- Nagy G.J., Tengerdy R., (1968). Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. *Applied microbiology* 16: 441-444.
- Namkung H., Li M., Gong J., Yu H., Cottrill M., Lange C.F.M. (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 4: 697–704.
- Nasel B., Nasel C., Samec P., Shindler E., Buchbauer G., (1994). Chemical senses, 19: 359.

Navarro Dde F., Souza M.M., Neto R.A., Golin V., Niero R., Yunes R.A., Delle Monache F., Cechinel Filho V., (2002). Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. *Phytomedicine* 9: 427-432.

Nelson RRS (2000). Selection of resistance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 45:549-550

Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E., (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101: 372-378.

Newbold C.J., McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 114: 105-112.

Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M., (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural products report* 17: 215-234.

Nes I.F., Skjelkvale R., (1982). Effect of natural spices and oreoresins on *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of dry sausage. *Journal of food Science*, 47: 1618-1625.

O'Fallon JV., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T., (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J Anim Sci.* 85(6):1511-21.

Packryasothy E.V., Kyle S., (2002). Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia* 54:384-387.

Papageorgiou G., Botsoglou N., Govaris A., Giannenas I., Iliadis S., Botsoglou E., (2003). Effect of dietary oregano oil and α -tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87: 324-335.

Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., Chaves-Lopez C., Serio A., Marsilio F., Suzzi G., (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 19: 1174-1182.

Park Y.W., Juarez M., Ramos M., Haenlein G.F.W., (2007). Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research* 68: 88-113.

Patra, A.K., (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6: 413-428.

Patra A.,K., Saxena J., (2010). A new prospective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in rumen. *Phytochemistry* 71, 1198-1222.

Paré P.W., Tumlinson J.H., (1999). Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores *Plant Physiology* 121: 325-332.

Patra A.K., Saxena J., (2010). A new prospective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in ruminants. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.

Patra A.K., (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6:416-428.

Pauli, A., (2006). α -bisabolol from chamomile—a specific ergosterol biosynthesis inhibitor?. *International Journal of Aromatherapy* 16, 21–25.

Pizzoferrato L., Manzi P., Marconi S., Fedele V., Claps S., Rubino R., (2007). Degree of antioxidant protection: A parameter to trace the origin and quality of goat's milk and cheese. *J. Dairy Sci.* (90): 4569-4574.

Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S., (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163: 2-24.

Priestley C.M., Burgess I.F., Williamson E.M., (2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus* and its eggs. *Fitotherapy*, 77: 303-309.

Pedro A.S., Cabral-Albuquerque E., Ferreira D., Sarmiento B., (2009). Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?. *Carbohydrate Polymers* 76: 501-508.

Offen N.W., Bell J.F., Roberts D.J., (2005). The effect of feeding an essential oil on dairy cow performance. *Br.Soc. Anim. Sci., Annu. confer., Univ. York*, 4-6, April.

Oh H.K., Jones M.B., Longhurst W.M., (1967). Effect of various essential oils isolated from douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied Microbiology*, 777-784.

Ohene-Adjei S., Chaves A.V., McAllister T.A., Benchaar C., Teather R.M., Forster R.J., (2008). Evidence of increased diversity of methanogenic Archaea with plant extract supplementation. *Microb Ecol*, 56: 234-242.

Onodera R., (1986). Contribution of protozoa to lysine synthesis in the in vitro rumen microbial ecosystem. *Applied and Enviromental Microbiol*:1350-1351.

Orskov E.R., (1982). Protein nutrition in ruminants. *Academic press, London and New York*.

Ozcan M., (1998). Inhibitory effects of spice extracts on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 strain. *European Food Research & Technology*, 207: 253-255.

Rabenhorst J., (1996). Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:470-474.

Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R., (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties-an overview. *Forsch Komplementmed* 16:79-90.

Rezapour A., and Taghinejad-Roudbaneh M., (2011). *Effects of food restriction on oxidative stress indices in Ghezel ewes. Journal of animal and veterinary advances* 10 (8): 980-986.

Rochfort S., Parker A.J., Dunshea F.R., (2008). *Phytochemistry* 69(2):299.

Rosado, L.D.S., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., de Jesus, H.C.R., Alves, P.B., (2013). Changes in the content and composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. during storage. *J. Essential oil Res.* 25: 227-232.

Rowe A.J., Wulff C., Fraser H.M., (2004). Angiogenesis and microvascular development in the marmoset (*Callithrix jacchus*) endometrium during early pregnancy. *Reproduction* 128: 107-116.

Russell J.B., Hespell R.B., (1981). Microbial rumen fermentation. *J.Dairy Sci.*, 64:1153-1169.

Russell J.B., O'Connor J.D., Fox D.G., Van Soest P.J., Sniffen C.J., (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J.Anim.Sci.*, 70: 3551-3561.

Russell J.B., Onodera R., Hino T., (1991). Ruminant protein fermentation: New prospective on previous contradictions. In: Tsuda T., Sasaki Y., Kawasima R., (Eds), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. *Academic press Limited, London*, pp. 691-697.

Saccol E.M.H., Uczay J., Pês T.S., Finamor I.A., Ourique G.M., Riffel A.P.K., Schmidt D., Caron B.O., Heinzmann B.M., Llesuy S.F., Lazzari R., Baldissotto B., Pavanato M.A., (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture* 416-417: 244-254.

Sangwan N.K., Verma B.S., Verma K.K., Dhindsa K.S., (1990). Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pestic. Sci.*, 28:331-335.

Santos F.A., Rao V.S.N., (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. res.* 14: 240-244.

Santos M.B., Robinson P.H., P. Williams P., Losa R., (2010). Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal Feed Science and Technology* 157:64–71.

Santra A., Karim S.A., Chaturvedi O.H., (2007). Rumen enzyme profile and fermentation characteristics in sheep as affected by treatment with sodium lauryl sulfate as defaunating agent and presence of ciliate protozoa. *Small Ruminant Research* 67: 126–137.

Sarica S., Ciftci A., Demir E., Kilinc K., Yildirim Y., (2005). Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets. *S. Afr. J. Anim. Sci.*35:61-72.

Silanikove N., Leitner G., Merin U., Prosser C.G., (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant research* 89:110-124.

Simitzis P.E., Bizelis J.A., Fegeros K., Deligeorgis S.G., (2007).Effect of dietary oregano oil supplementation on sheep milk characteristics. *Animal science review*, (37): 69-78.

Simitzis P.E., Bizelis J.A., Fegeros K., Deligeorgis S.G., (2007).Effect of dietary oregano oil supplementation on sheep milk characteristics. *Animal science review*, (37): 69-78.

Simitzis P.E., Deligeorgis S.G., Bizelis J.A., Dardamani A., Theodosiou I., Fegeros K., (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science* 79: 217-223.

Seifu E., Buys E.M., Donkin E.F., Petzer I.M., (2004). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food control* 15: 447-452.

Seung-Joo L., Umamo K., Shibamoto T., Kwang-Geun L., (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91: 131-137.

Serbester U., Çınar M., Ceyhan A., Erdem H., Görgülü M., Kutlu H.R, Baykal L., Yücelt O., Cardozo P.W., (2012). Effect of essential oil combination on performance, milk composition, blood parameters and pregnancy rate in early lactating dairy cows during heat exposure. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(3): 2012, Page: 556-563

Sertkaya E., Kaya K., Soylu S., (2010). Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.)(Acarina: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products* 31: 107-112.

Schafer FQ, Buettner GR., (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple". *Free Radic. Biol. Med.* 30 (11): 1191–212.

Sharma P.R., Mondhe D.M., Muthian S., Pal H.C., Shahi A.K., Saxena A.K., Qazi G.N., (2009). Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-Biological Interaction* 79:160-168.

Schone F., Vetter A., Hartung H., Bergmann H., Lutz J., Richter G., Muller S., (2004). *In 8 Tagung Schweine und Geflugelernahrung, Jena, Germany:12.*

Schone F., Vetter A., Hartung H., Bergmann H., Biertupfel A., Richter G., Muller S., Breitschuh G., (2006). *J. Anim.Phys. Anim. Nutr.* 90:500.

Smet K., Raes K., De Block J., Herman L., Dewettinck K., Coudijzer K., (2008). A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *International Dairy Journal* (18): 520-530.

Schumacher A., Hofmann M., Boldt E., Gropp M., (2002). *In forum angewandte. Forschung in der Rinder und Schweinefütterung, Fulda, Germany:85.*

Slyter L.L., Satter L.D., Dinius D.A., (1979). Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. *J.Anim.Sci.*, 48:906-912.

Soltan M.A., (2009). Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre- and post-weaning periods. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (5): 642-652.

Soltan M.E., Shewita R.S., Al-Sultan S.I., (2009). Influence of essential oils supplementation on digestion, rumen fermentation, rumen microbial populations and productive performance of dairy cows. *Asian journal of animal sciences* 3 (1): 1-12.

Spanghero M., Robinson P.H., Zanfi C., Fabbro E., (2009). Effect of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Animal feed science and Technology* 153: 153-157.

Steinfeld H., Gerber P., Wessenaar T., Castel V., Rosales M., De Haan C., (2006). Livestock's long shadow-Environmental issues and options. Rome: FAO.

Steflitsch, W. and Steflitsch, M. (2008) Clinical aromatherapy. *J. Men's Health*, 5, 74-85.

Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P., (1997). The rumen bacteria. In:the rumen microbial ecosystem (Ed.P.N. Hobson and C.S. Stewart). pp.10-72. *Blackie Academic and Professional Publishers, London*.

Stumm C.K., Zwart K.B., (1986). Symbiosis of hydrogen utilizing methanogenesis. *Microbiol. Sci.*, 3:100-105.

Srinivasan K., (2005). Spices as influencers of body metabolism: An overview of three decades of research. *Food Research International* (38): 77-86.

Sung H.G., Kobayashi Y., Chang J., Ha A., Hwang I.H., Ha J.K., (2007). Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Aust.J.Anim.Sci.*20:200-207.

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control* 21: 1199-1218.

Tassoul M.D., and Shaver R.D., (2009). Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92: 1734-1740.

Tekippe J.A., Hristov A.N., Heyler K.S., Cassidy T.W., Zheljazkov V.D., Ferreira F.S., Karnati S.K., Varga G.A., (2011). *J.Dairy Sci.* 94: 5065-5079.

Tartrakoon W., Sukkasem K., Ter Muelen U., Vearasilp T., (2003). *Deutscher Tropentag, Gottingen, Germany*.

Tekippe J.A., Hristov A.N., Heyler K.S., Cassidy T.W., Zheljazkov V.D., Ferreira J.F.S., Karnati S.K., Varga G.A., (2011). Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J.Dairy Sci.*, 94: 5065-5079.

Tolouee M., Alinezhad S., Saberi R., Eslamifar A., Javad Zad S., Jaimand K., Taeb J., Rezaee M., Kawachi M., Ghahfarokhi M., Razzaghi-Abyaneh M., (2010). Effect of

Matricaria chamomilla L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* 139: 127–133.

Turan H., Sonmez G., and Kaya Y., (2007). Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea. *Journal of Fisheries Sciences.com DOI: 10.3153/jfscom.20070121 (2):97-103*.

Turek C, Stintzing FC., (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 40-53.

Trigg J.K., (1996). Evaluation of eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. *J. Ame. Mosquito Cont. Assoc.*, 12: 243-246.

Trujillo A.J., Pozo P.I., Guamis B., (2007). Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in caprine milk. *Small ruminant Research* 67: 243-246.

Tsimidou M., Papavergou E., Boskou D., (1995). Evaluation of oregano antioxidant activity in marcerel oil. *Food Res. Intern.*, 28: 431-433.

Uegaki R., Ando S., Ishida M., Takada O., Sasakura K., Nakanish K., Kochi Y., (2001). Antioxidative activity of milk from cow fed herbs. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 75:669-671.

Ulbricht T.L., Southgate D.A., (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet. Oct 19;338(8773):985-92*.

Ultee A., Gorris L.G., Smid E.J., (1998). Bacterial activity of carvacrol towards the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 211-218.

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1561-1568.

Ungerhofer E., (2004). Dissertation, University of Veterinary Medicine, Vienna.

Urdang G., (1948). The origin and development of the essential oil industry. In the essential oils pp 3-13 Ed E Guenther. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Van Never C.J., Demeyer D.I., (1988). Manipulation of rumen fermentation. The rumen microbial ecosystem 387-443, Hobson P.N. *London and New York, Elsevier Applied Science*.

Varel V.H., Dehority B.A., (1989). Ruminant cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids and cattle fed three alfalfa-corn diets. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:148-153.

Varel V.H., Miller D.N., Lindsay A.D., (2004). Plant oils thymol and eugenol affect cattle and swine wastes emissions differently. *Water Science and Technology*, 50: 207-213.

Verma, R.S., Rahman ,L.U., Mishra, S., Verma, R.K., Chauhan, A., Singh, A., (2011). Changes in essential oil content and composition of leaf and leaf powder of *Rosmarinus officinalis* cv.CIM-Hariyali during storage. *Maejo Int. J. Sci. Techn.* 5: 181-190.

Vicuna G.C., Stashenko E.E., Fuentes J.L., (2009). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitotherapia*.

Villalba J.J., Provenza F.D., Banner R.E., (2002). Influence of macronutrients and activated charcoal on intake of sagebrush by sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 80: 2099-2109.

Villalba J.J., Provenza F.D., Olson K.C., (2006). Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation digestibility, intake and preference in sheep. *J.Anim.Sci.* 84: 2463-2473.

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.M., (1993). Geographic Variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Essential Oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 21, No. 2, pp. 287-295.

Wada S., Fang X., (1992). The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *J.Food Process. Preserv.* 16: 263-274.

- Wahle K., Heys S., Rotondo D., (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?. *Progress in Lipid Research* 43:553-587.
- Wald C., (2002). PhD Thesis, *University of Halle-Wittenberg, Germany*.
- Wald C., Kluth H., Rodehutschord M.,. *In proceedings of the 10th symposium of the society for Nutritional Physiology, Göttingen, Germany: 156.*
- Waldenstedt L., (2003). Effect of vaccination against coccidiosis in combination with an antibacterial oregano (*Oreganum vulgare*) compound in organic broiler production. *Acta Agric Scand. A-Anim.Sci. 53: 101-109.*
- Wallace R.J., (1996). Ruminant microbial metabolism of peptides and amino acids. *J.Nutr.*126:1326S-1334S.
- Wallace R.J., McEwan N.R., McIntosh F.M., Teferedegne B., Newbold C.J., (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Aust.J.Anim.Sci., 10:1458-1468.*
- Wallace R.J., (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society, 63:621-629.*
- Wang C.J., Wang S.P., Zhou H., (2009). Influences of flavomycin, ropadiar and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep. *Animal Feed Science and Technology, 16: 157-166.*
- Wendel A., (1980). Enzymatic basis of detoxication, Volume 1, p. 333, Academic press, NY.
- Westendarp H., Klaus P., Halle I., Mörlein D., Henning M., Köhler P., (2006) *Landbauforsch. Völkenrode 3/4 56:149.*
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39:971-974.
- Wolin M.J., Miller T.L., (1988). Microbe-microbe interactions. In: P.N., Hobson (Editor), Rumen Microbial Ecosystem. *Elsevier Science Publishers, UK, pp. 343-359.*
- Worthington C.E., (1988). Worthington enzyme manual, pp. 76-79, Worthington Biochemical corporation, Freehold, NJ.

- Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G., (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.*, 64: 59-66.
- Yanishlieva N., Marinova E., Pokorny J (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur.J.Lipid. Sci.Technol.* 108: 776-793.
- Yang W.Z., Benchaar C., Ametaj B.N., Chaves A.V., He M.L., McAllister T.A., (2007). Effects of garlic and juniper essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *J.Dairy Sci.*, 90:5671-5681.
- Yang W.Z., Ametaj B.N., Benchaar C., He M.L., Beauchemin K.A., (2010). Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: intake, growth performance, carcass characteristics and blood metabolites. *J.Ani. Sci.*, 88: 1082-1092.
- Yu Z., Yu M., Morrison M., (2006). Improved serial analysis of VI ribosomal sequence sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environ. Microbiol.*8:603-611.
- Zani F., Massino G., Benvenuti S., Bianchi A., Albasini A., Melegari M., Vampa G., Bellotti A., Mazza P., (1991). Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Med.*, 57: 237-241.
- Zigger D., (2001). Helathier pigs on diet with garlic and cinnamon. *Feedtech*, 5, 8/9: 17. http://www.allaboutfeed.net/allabouts/id935-3370/application_in_pig_diets.html (20. 11. 2013).
- Zhou S., Koh H.L., Gao Y., Gong Z.Y., Lee E.J., (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci.* 74: 935-968.
- Zygadlo J.A., Grosso N.R., (1995). Comparative study of the antifungal activity of some essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavour Frag. J.*, 10: 113-118.